



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 695**

(51) Int. Cl.:

**C07D 403/06** (2006.01)

**C07D 405/12** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 409/12** (2006.01)

**C07D 403/12** (2006.01)

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03811651 .3**

(86) Fecha de presentación : **01.08.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1529044**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

(54) Título: **Deshidrofenilhistinas y sus análogos y la síntesis de deshidrofenilhistinas y sus análogos.**

(30) Prioridad: **02.08.2002 US 401074 P**  
**16.09.2002 US 411128 P**  
**24.02.2003 US 450063 P**

(73) Titular/es: **Nereus Pharmaceuticals, Inc.**  
**10480 Wateridge Circle**  
**San Diego, California 92121, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2008**

(72) Inventor/es: **Hayashi, Yoshio;**  
**Grodberg, Jennifer y**  
**Palladino, Michael**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2008**

(74) Agente: **Gallego Jiménez, José Fernando**

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

Deshidrofenilhistinas y sus análogos y la síntesis de deshidrofenilhistinas y sus análogos.

## 5 Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y métodos para la preparación sintética en los campos de la química y la medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos y procedimientos para elaborar compuestos útiles en el tratamiento del cáncer y el tratamiento de infecciones por hongos.

## Breve descripción de la técnica relacionada

Se considera que un solo mecanismo celular universal controla la regulación del proceso del ciclo celular eucariótico. Ver, e.g., Hartwell, L.H. *et al.*, Science (1989), 246: 629-34. También se sabe que cuando surge una anomalía en el mecanismo de control del ciclo celular, puede ocurrir el cáncer o un trastorno inmune. De acuerdo con lo anterior, también se sabe que los agentes antitumorales y los inmuno supresores pueden estar entre las sustancias que regulan el ciclo celular. Así, son necesarios nuevos métodos para producir inhibidores del ciclo celular eucariótico como compuestos antitumorales e inmuno mejoradores y deben ser útiles en el tratamiento del cáncer humano como agentes quimioterapéuticos, anti-tumorales. Ver, e.g., Roberge, M. *et al.*, Cancer Res. (1994), 54, 6115-21.

Los hongos, especialmente los hongos patógenos e infecciones relacionadas representan un reto clínico incrementado. Los agentes antifungales existentes son de eficacia y toxicidad limitada como el desarrollo y/o descubrimiento de cepas de hongos patógenos que son resistentes a las drogas actualmente disponibles o bajo desarrollo. A manera de ejemplo, los hongos que son patógenos en humanos incluyen entre otros *Candida* spp. incluyendo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. galbrata*; *Aspergillus* spp. incluyendo *A. fumigatus* y *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces* spp. incluyendo *Blastomyces dermatitidis*; *Pneumocystis carinii*; *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus ranarum*; *Conidiobolus* spp.; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus* spp. incluyendo *R. oryzae* y *R. microsporus*; *Cunninghamella* spp. *Rhizomucor* spp.; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; y *Sporothrix schenckii* (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992 Medical Mycology, Lea y Febiger, Malvern, PA).

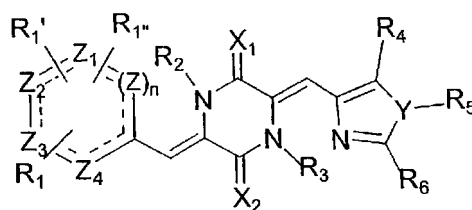
Recientemente, se ha reportado que las triprostatinas A y B (las cuales son dicetopiperazinas que consisten en residuos de prolina y triptofano isoprenilado) y otras cinco dicetopiperazinas estructuralmente relacionadas, la progresión del ciclo celular inhibido en la fase M, ver Cui, C. *et al.*, 1996 J Antibiotics 49:527-33; Cui, C. *et al.*, 1996 J Antibiotics 49: 534-40 y que estos compuestos también afectan el ensamble de microtúbulo, ver Usui, T. *et al.*, 1998 Biochem J 333: 543-48; Kondon, M. *et al.*, 1998 J Antibiotics 51: 801-04. Además, se ha reportado que los compuestos naturales y sintéticos inhiben la mitosis, inhibiendo así el ciclo celular eucariótico, mediante el enlace hacia el sitio de enlace de colchicina (sitio CLC) en la tubulina, la cual es una macromolécula que consiste de dos subunidades de 50 kDa ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulina) y es el constituyente principal de los microtúbulos. Ver, e.g., Iwasaki, S., 1993 Med Res Rev 13: 183-198; Hamel, E. 1996 Med Res Rev 16: 207-31; Weisenberg, R.C. *et al.*, 1969 Biochemistry 7: 4466-79. Los microtúbulos se cree que se encuentran involucrados en varias funciones celulares esenciales, tales como el transporte axonal, la motilidad celular y la determinación de la morfología celular. Por lo tanto, los inhibidores de la función del microtúbulo pueden tener una amplia actividad biológica y ser aplicables para propósitos medicinales y agroquímicos. También es posible que los ligandos del sitio de colchicina (CLC) tales como CLC esteganacina, ver Kupchan, S.M. *et al.*, 1973 J Am Chem Soc 95: 1335-36, podofilotoxina, ver Sackett, D.L., 1993 Pharmacol Ther 59: 163-228 y combretastatinas, ver Pettit G.R. *et al.*, 1995 J Med Chem 38: 166-67, puedan probar ser valiosos como inhibidores del ciclo celular eucariótico y así pueden ser útiles como agentes quimioterapéuticos.

Aunque se han aislado los metabolitos tipo dicetopiperazina a partir de varios hongos como micotoxinas, ver Horak R.M. *et al.*, 1981 JCS Chem Comm 1265-67; Ali M, *et al.*, 1898 Toxicology Letters 48: 235-41 o como metabolitos secundarios, ver Smedsgaard J. *et al.*, 1996 J Microbiol Meth 25: 5-17, se conoce poco acerca de la estructura específica de los metabolitos tipo dicetopiperazina o sus derivados y su actividad antitumoral, particularmente *in vivo*. No solamente se han aislado estos compuestos como micotoxinas, la síntesis química de un tipo de metabolito tipo dicetopiperazina, fenilhistina se ha descrito por Hayashi *et al.*, en J. Org. Chem. (2000) 65, página 8402. En la técnica, se ha preparado un derivado del metabolito tipo dicetopiperazina, deshidrofenilhistina mediante deshidrogenación enzimática de su fenilhistina original. Con las incidencias de cáncer en aumento, existe una necesidad particular para producir químicamente una clase de derivados de metabolitos tipo dicetopiperazina sustancialmente purificados que tienen actividad que inhibe la proliferación celular específica animal y alta actividad y selectividad antitumoral. Existe por lo tanto una necesidad particular para un método eficiente para producir sintéticamente derivados de metabolito tipo dicetopiperazina sustancialmente purificados y estructural y biológicamente caracterizados.

También, la Publicación de PCT WO/0153290 (Julio 26, 2001) describe un método no sintético para producir deshidrofenilhistina mediante la exposición de fenilhistina o un análogo de fenilhistina particular a una deshidrogenasa obtenida a partir de *Streptomyces albulus*.

## 5 Sumario de la invención

Los compuestos y métodos para la elaboración sintética de los compuestos se describen para una clase de compuestos que tienen la estructura de la Fórmula (I):



(I)

Los compuestos descritos tienen la estructura de la Fórmula (I) en donde:

$R_1$ ,  $R_4$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$ , en donde  $R_7$  se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$ , en donde  $R_7$  se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  son un enlace covalente entre sí para formar un anillo o no son un enlace covalente entre sí;

$R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

$X_1$  y  $X_2$  se seleccionan de manera separada del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre siendo cada uno ya sea sustituido o no sustituido con un grupo  $R_5$  como se definió anteriormente;

$Y$  se selecciona del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo  $R_5$  a partir de lo anterior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

$n$  es un entero igual a cero, uno o dos;

$Z$  para cada  $n$  separada, si no es cero y  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  se seleccionan cada uno de manera separada a partir de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

los enlaces a trazos pueden ser enlaces sencillos o dobles.

## ES 2 295 695 T3

Los métodos comprenden las etapas de:

hacer reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermediario;

y

hacer reaccionar dicho compuesto intermediario con un segundo aldehído para producir dicho compuesto, en el que

dicho primer aldehído y dicho segundo aldehído se seleccionan del grupo que consiste en un oxazolcarboxialdehído, imidazolcarboxialdehído, un benzaldehído, derivados de imidazolcarboxialdehído y derivados de benzaldehído, formando un compuesto.

Los compuestos descritos tienen la estructura de la Fórmula (I) en la que:

$R_1$ ,  $R_4$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alqueno  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alqueno  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alqueno  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alqueno  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueno, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  son un enlace covalente entre sí para formar un anillo o no son un enlace covalente entre sí;

$R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado, alqueno  $C_1$ - $C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

$X_1$  y  $X_2$  se seleccionan de manera separada del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre siendo cada uno ya sea sustituido o no sustituido con un grupo  $R_5$  como se definió anteriormente;

$Y$  se selecciona del grupo que consiste en un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo  $R_5$  a partir de lo anterior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

$n$  es un entero igual a cero, uno o dos;

$Z$  para cada  $n$  separada, si no es cero y  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  se seleccionan cada uno de manera separada a partir de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

los enlaces a trazos pueden ser enlaces sencillos o dobles.

En las realizaciones preferidas del compuesto y método, el imidazolcarboxialdehído es 5-(1,1-dimetil-2-etil)imidazol-4-carboxialdehído y el benzaldehído comprende un grupo metoxi sencillo. Las realizaciones adicionales preferidas de los compuestos descritos en la presente incluyen los compuestos que tienen un grupo *t*-butilo, un grupo dimetoxi, un grupo cloro y un grupo metiltiofeno y métodos para elaborar tales compuestos, así como los compuestos descritos en las Tablas 2, 3 y 4 así como los métodos para elaborar tales compuestos.

También se describen los métodos y materiales para el tratamiento de tejido neoplásico o prevenir cánceres o infección por un hongo patógeno. Estos métodos y materiales se encuentran particularmente bien situados para el tratamiento de sujetos mamíferos, más particularmente humanos e involucran administrar al sujeto una deshidrofenilalhistina o su análogo. El método comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad antitumoral o antifungal efectiva de una deshidrofenilalhistina o su análogo.

## Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan y forman parte de la especificación, solo ilustran ciertas realizaciones preferidas de la presente invención. Junto con el resto de la especificación, tienen la intención de servir para explicar los modos preferidos de elaborar ciertos compuestos de la invención para aquellos expertos en la técnica. En los dibujos:

La Figura 1 ilustra un esquema de reacción para producir las deshidrofenilhistinas al hacer reaccionar una diacildicetopiperazina 1 con un imidazolcarboxaldehído 2 para producir un compuesto intermediario 3 que se hace reaccionar con un benzaldehído 4 para producir una deshidrofenilhistina.

La Figura 2 representa el perfil HPLC de la deshidrofenilhistina sintética cruda.

La Figura 3 ilustra un esquema de reacción para producir deshidrofenilhistinas al hacer reaccionar una diacildicetopiperazina 1 con un benzaldehído 4 para producir un compuesto intermediario 17 que se hace reaccionar con un imidazolcarboxaldehído 15 para producir una deshidrofenilhistina.

La Figura 4 representa los perfiles HPLC de tBu-deshidrofenilhistidina sintética cruda producida a partir de la Ruta A y a partir de la Ruta B.

La Figura 5 ilustra dos estrategias de modificación para deshidroPLH para la actividad citotóxica potente.

La Figura 6 representa la conformación activa putativa de deshidroPLH en el residuo de fenilo.

La Figura 7 representa el metabolismo de Citocromo P450 de la fenilhistina.

La Figura 8 ilustra la migración Z-E de tBu-deshidroPLH.

La Figura 9 representa la síntesis y la imagen de prodroga de acil-E-tBu-deshidroPLH.

La Figura 10 representa el gradiente de temperatura de 3-Z-Benciliden-6-[5''-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetil]-piperazin-2,5-diona.

La Figura 11 representa el gradiente de temperatura de 3-Z-benciliden-6-(5''-ter-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetil)-piperazin-2,5-diona.

La Figura 12 representa el efecto de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina en comparación con la colchicina y taxol sobre la permeabilidad de la monocapa de HuVEC a FITC-Dextrano.

La Figura 13 representa el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre el crecimiento tumoral estimado en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 14 representa el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre el peso de tumores extirpados en la autopsia de ratones individuales en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 15 representa el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre el crecimiento tumoral estimado en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 16 representa el efecto de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre el peso de tumores extirpados en la autopsia de ratones individuales en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 17 representa los efectos de: A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilhistina solos y en combinación con CPT-11 sobre el crecimiento tumoral estimado en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 18 representa los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilhistina solos y en combinación con CPT-11 sobre el peso de los tumores extirpados en la autopsia de ratones individuales en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano.

La Figura 19 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre el crecimiento tumoral en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano: comparación de tres estudios.

La Figura 20 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con CPT-11 sobre los pesos del tumor finales en el modelo HT-29 Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano: comparación de tres estudios.

La Figura 21 representa los efectos de KPU-2 solo o en combinación con Taxotere sobre el crecimiento tumoral estimado en el Modelo DU-145 Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano.

## ES 2 295 695 T3

La Figura 22 representa los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilhistina solos y en combinación con Taxotere sobre el crecimiento tumoral estimado en base a las observaciones hechas durante la porción en vida del Modelo DU-145 Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano.

La Figura 23 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere sobre los pesos del tumor individual extirpado en la autopsia en el Modelo DU-145 Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano.

La Figura 24 representa los efectos de KPU-35 solo y en combinación con Taxotere sobre los pesos de tumores individuales extirpados en autopsia en el Modelo DU-145 Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano.

La Figura 25 representa los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilhistina solos y en combinación con Taxotere en el Modelo MCF-7 Xenoinjerto de Tumor de Mama Humano.

La Figura 26 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere sobre el crecimiento tumoral estimado en el Modelo A549 Xenoinjerto de Tumor de Pulmón Humano.

La Figura 27 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Taxotere sobre los pesos de tumores extirpados en autopsia en el Modelo A549 Xenoinjerto de Tumor de Pulmón Humano.

La Figura 28 representa los efectos de KPU-2 solo y en combinación con Paclitaxel sobre el peso estimado del tumor en la almohadilla de grasa mamaria de murino implantada del Modelo MDA-231 Xenoinjerto de Tumor de Mama Humano.

La Figura 29 representa los efectos de A. KPU-2, B. KPU-35 y C. t-butil-fenilhistina solos y en combinación con Paclitaxel en el Melanoma Murino del Modelo B16 F10 Tumor Metastásico. En ciertas Figuras, los compuestos se identifican utilizando una designación alternativa. Un esquema completo para convertir estas designaciones alternativas es como sigue:

Designación alternativa	Designación utilizada en la presente
NPI-2350	(-)-fenilhistina
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05
NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-02
NPI-2359	KPU-08
NPI-2360	KPU-09

# ES 2 295 695 T3

NPI-2361	KPU-10
NPI-2362	KPU-11
NPI-2363	KPU-12
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14
NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34
NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43

# ES 2 295 695 T3

NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55
NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77

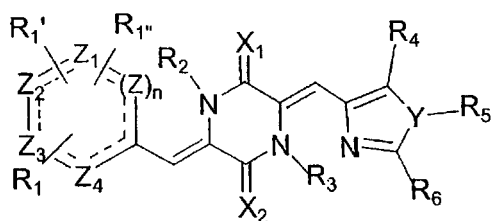


NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96
NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98
NPI-2460	t-butil-fenilhistina

#### Descripción detallada de la modalidad preferida

La descripción proporciona los métodos para la preparación sintética de compuestos, incluyendo nuevos compuestos, incluyendo deshidrofenilhistina y análogos de deshidrofenilhistina y proporciona métodos para producir inhibidores del ciclo celular farmacéuticamente aceptables, agentes antitumorales y agentes antifúngicos con rendimientos relativamente altos, donde dichos compuestos y/o sus derivados se encuentran entre los ingredientes activos en estos inhibidores del ciclo celular, agentes antitumorales y agentes antifúngicos. Otros objetivos incluyen proporcionar nuevos compuestos no obtenibles por métodos no sintéticos actualmente disponibles. También es un objetivo proporcionar un método para tratar el cáncer, particularmente cáncer humano, que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva que inhiba el crecimiento tumoral de un miembro de una clase de los nuevos compuestos antitumorales. Esta invención también proporciona un método para prevenir o tratar un hongo patógeno en un sujeto lo cual involucra administrar al sujeto una cantidad efectiva anti-fúngica de un miembro de una clase de los nuevos compuestos anti-fúngicos, *e.g.*, administrar una deshidrofenilhistina o su análogo en una cantidad y forma la cual proporcione el efecto antifúngico propuesto. En la realización preferida de los compuestos y métodos para elaborar y utilizar tales compuestos descritos en la presente, pero no necesariamente en todas las realizaciones de la presente invención, estos objetivos se cumplen.

Descritos en la presente también se encuentran los compuestos y métodos para producir una clase de compuestos, donde los compuestos se representan por la Fórmula (I):



(I)

## ES 2 295 695 T3

en la que:

5  $R_1$ ,  $R_4$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

15  $R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

20  $R_1'$  y  $R_1''$  se enlazan ya sea covalentemente entre si para formar un anillo o se enlazan no covalentemente entre si.

25  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

$X_1$  y  $X_2$  se seleccionan de manera separada del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre siendo cada uno ya sea sustituido o no sustituido con un grupo  $R_5$  como se definió anteriormente;

30 Y se selecciona del grupo que consiste en un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo  $R_5$  a partir de lo anterior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

35 n es un entero igual a cero, uno o dos;

Z para cada n separada, si no es cero y  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  se seleccionan cada uno de manera separada a partir de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

40 los enlaces a trazos pueden ser enlaces sencillos o dobles.

El método comprende un método para producir los compuestos de la Fórmula (I) mediante las etapas de:

hacer reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermediario; y

45 hacer reaccionar dicho compuesto intermediario con un segundo aldehído para producir dicho compuesto, en donde

dicho primer aldehído y dicho segundo aldehído se seleccionan del grupo que consiste en un oxazolcarboxialdehído, imidazolcarboxialdehído, un benzaldehído, derivados de imidazolcarboxialdehído y derivados de benzaldehído, formando por lo tanto un compuesto de la Fórmula (I) en donde

50  $R_1$ ,  $R_4$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

60  $R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en donde  $R_7$  se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquienilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquienilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

65  $R_1'$  y  $R_1''$  se enlazan ya sea covalentemente entre si para formar un anillo o se enlazan no covalentemente entre si.

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno de manera separada del grupo que consiste de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> saturado, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan de manera separada del grupo que consiste de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre y

Y se selecciona del grupo que consiste de un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con un grupo R<sub>5</sub> a partir de lo anterior, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

Z para cada n separada, si no es cero y Z1, Z2, Z3 y Z4 se seleccionan cada uno de manera separada a partir de un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

los enlaces a trazos pueden ser enlaces sencillos o dobles.

También se proporcionan sales farmacéuticamente aceptables y ésteres de pro-droga del compuesto de la Fórmula (I) y (II) y se proporcionan los métodos para sintetizar tales compuestos mediante los métodos descritos en la presente.

El término “éster de pro-droga” especialmente cuando se refiere a un éster de pro-droga del compuesto de la Fórmula (I) sintetizado por los métodos descritos en la presente, se refiere a un derivado químico del compuesto que se transforma rápidamente *in vivo* para producir el compuesto, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre o tejidos internos. El término “éster de pro-droga” se refiere a los derivados de los compuestos descritos en la presente formados mediante la adición de cualquiera de varios grupos que forman el éster que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos de éster de pro-droga incluyen pivoxilometilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo así como otros grupos conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il) metilo. Otros ejemplos de grupos de éster de pro-droga pueden encontrarse en por ejemplo, T. Higuchi y V. Stella en “Pro-drugs as Novel Delivery Systems” Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y “Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application”, editado por E.B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (que proporciona los ejemplos de ésteres útiles como prodrogas para los compuestos que contienen grupos carboxilo).

El término “éster de pro-droga” como se utiliza en la presente, también se refiere a un derivado químico del compuesto que se transforma rápidamente *in vivo* para producir el compuesto por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre. El término “éster de pro-droga” se refiere a los derivados de los compuestos descritos en la presente formados mediante la adición de cualquiera de los diversos grupos que forman el éster que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos de éster de pro-droga incluyen pivoxilometilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo así como otros grupos conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il) metilo. Otros ejemplos de grupos de éster de prodroga pueden encontrarse en por ejemplo T. Higuchi y V. Stella en “Pro-drugs as Novel Delivery Systems” Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y “Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application”, editado por E.B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (proporcionando los ejemplos de ésteres útiles como prodrogas para los compuestos que contienen grupos carboxilo).

El término “sal farmacéuticamente aceptable” especialmente cuando se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la Fórmula (I) sintetizada mediante los métodos descritos en la presente, se refiere a cualquiera de las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto y preferentemente se refiere a una sal de adición ácida de un compuesto. Ejemplos preferidos de sal farmacéuticamente aceptable son las sales del metal alcalino (sodio o potasio), las sales de metal alcalinotérreo (calcio o magnesio) o sales de amonio derivadas a partir de amoníaco o a partir de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo alquilamina C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, ciclohexilamina, trietanolamina, etilenodiamina o tris-(hidroximetil)-aminometano. Con respecto a los compuestos sintetizados por el método que son aminas básicas, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición ácida de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo ácido hidrohálico, sulfúrico, fosfórico o ácido carboxílico o sulfónico alifáticos o aromáticos, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico o naftalenosulfónico.

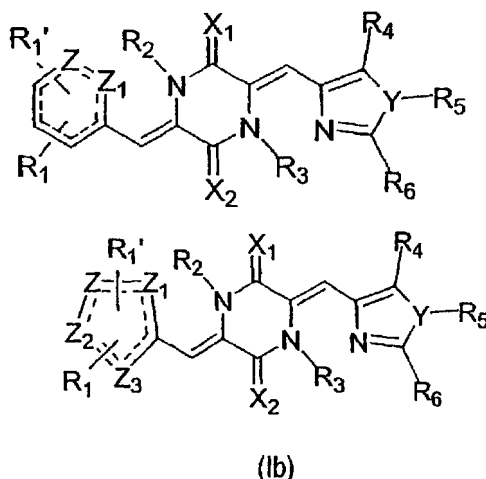
El término “sal farmacéuticamente aceptable” como se utiliza en la presente, también se refiere a cualquiera de las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto y preferentemente se refiere a una sal de adición ácida de un compuesto. Ejemplos preferidos de sal farmacéuticamente aceptable son sales de metal alcalino (sodio o potasio), sales de metal alcalinotérreo (calcio o magnesio) o sales de amonio derivadas a partir de amoníaco o a partir de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, alquilamina C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, ciclohexilamina, trietanolamina, etilenodiamina o tris-(hidroximetil)-aminometano. Con respecto a los compuestos que son aminas básicas, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición ácida de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, ácido hidrohálico, sulfúrico, fosfórico o ácido carboxílico o sulfónico alifáticos o aromáticos, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico o naftalenosulfónico.

Las composiciones farmacéuticas preferidas descritas en la presente incluyen sales y ésteres de prodroga farmacéuticamente aceptables del compuesto de la Fórmula (I) sintetizado por el método descrito en la presente. De acuerdo con lo anterior, si la elaboración de las formulaciones farmacéuticas involucra el mezclado íntimo de los excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo en su forma de sal, entonces se prefiere utilizar los excipientes farmacéuticos que no son básicos, es decir, ya sea excipientes ácidos o neutros.

En las realizaciones preferidas de los métodos de los compuestos descritos en la presente, puede formarse una pseudo estructura, de tres anillos, plana relativamente rígida. Para estabilizar tal pseudo estructura, de tres anillos plana, relativamente rígida, puede seleccionarse preferentemente  $R_3$  para ser hidrógeno.

En otras realizaciones preferidas de los compuestos y métodos descritos en la presente,  $n$  es igual a cero o uno, más preferentemente uno, y  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  y cada uno de manera separada se selecciona de un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de carbono, más preferentemente al menos uno de  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  es un átomo de carbono, y más preferentemente al menos dos de  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  es un átomo de carbono. Todas las  $Z$ 's pueden ser simultáneamente átomos de carbono.

Aún otras realizaciones preferidas de los métodos y composiciones descritos en la presente involucran compuestos que tienen las estructuras de las Fórmulas (Ia) y (Ib) de abajo:



en donde los grupos variables son como se define en la presente.

El término "átomo de halógeno" como se utiliza en la presente se refiere a cualquiera de los átomos radio-estables de la columna 7 de la Tabla Periódica de los Elementos, *i.e.*, flúor, cloro, bromo o yodo, siendo preferidos el flúor y el cloro.

El término "alquilo" como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier hidrocarburo saturado sustituido o no sustituido ramificado o no ramificado, siendo preferidos los hidrocarburos  $C_1$ - $C_6$  no sustituidos, saturados, no ramificados, siendo los más preferidos metilo, etilo, isobutilo y *ter*-butilo. Entre los hidrocarburos saturados sustituidos, se prefieren los hidrocarburos  $C_1$ - $C_6$  saturados, de mono- y di- y *per*-halógeno sustituidos y los hidrocarburos amino-sustituidos siendo los más preferidos *per*fluorometilo, *per*clorometilo, *per*fluoro-*ter*-butilo y *per*cloro-*ter*-butilo. El término "sustituido" tiene su significado ordinario, como se encuentra en numerosas patentes contemporáneas de la técnica relacionada. Ver, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 6,583,143; 6,509,331; 6,506,787; 6,500,825; 5,922,683; 5,886,210; 5,874,443; y 6,350,759. Específicamente, la definición de sustituido es tan amplia como aquella que se proporciona en la Patente U.S. No. 6,583,143, la cual define el término sustituido como cualquiera de los grupos tales como alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclo y heterocicloalquilo, en donde al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza con un sustituyente. El término "sustituido" es también tan amplio como la definición proporcionada en la Patente U.S. No. 6,509,331, la cual define el término "alquilo sustituido" de modo que se refiere a un grupo alquilo, preferentemente desde 1 hasta 10 átomos de carbono, teniendo desde 1 hasta 5 sustituyentes y preferentemente 1 hasta 3 sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste en alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiacilamino, ciano, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carboxilalquilo, ceto, tioceto, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterocíclico, heterociclooxi, hidroxiamino, alcóxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo. Las otras patentes anteriormente listadas también proporcionan definiciones estándar para el término "sustituido" que se entienden bien por aquellos con experiencia en la técnica. El término "cicloalquilo" se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, preferentemente teniendo de cinco

hasta doce átomos que comprenden el anillo. El término “acilo” se refiere a grupos alquilo o arilo derivados a partir de un oxoácido, siendo preferido un grupo acetilo.

El término “alqueno” como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier hidrocarburo insaturado sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado incluyendo hidrocarburos poliinsaturados, siendo preferidos los hidrocarburos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituidos, no ramificados, mono-insaturados y di-insaturados y siendo más preferidos los hidrocarburos sustituidos mono-insaturados, di-halógeno. En las posiciones R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub>, del compuesto de la estructura (I) se prefiere particularmente un residuo de *z*-isoprenilo. El término “cicloalqueno” se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, que preferentemente tiene de cinco hasta doce átomos que comprenden el anillo.

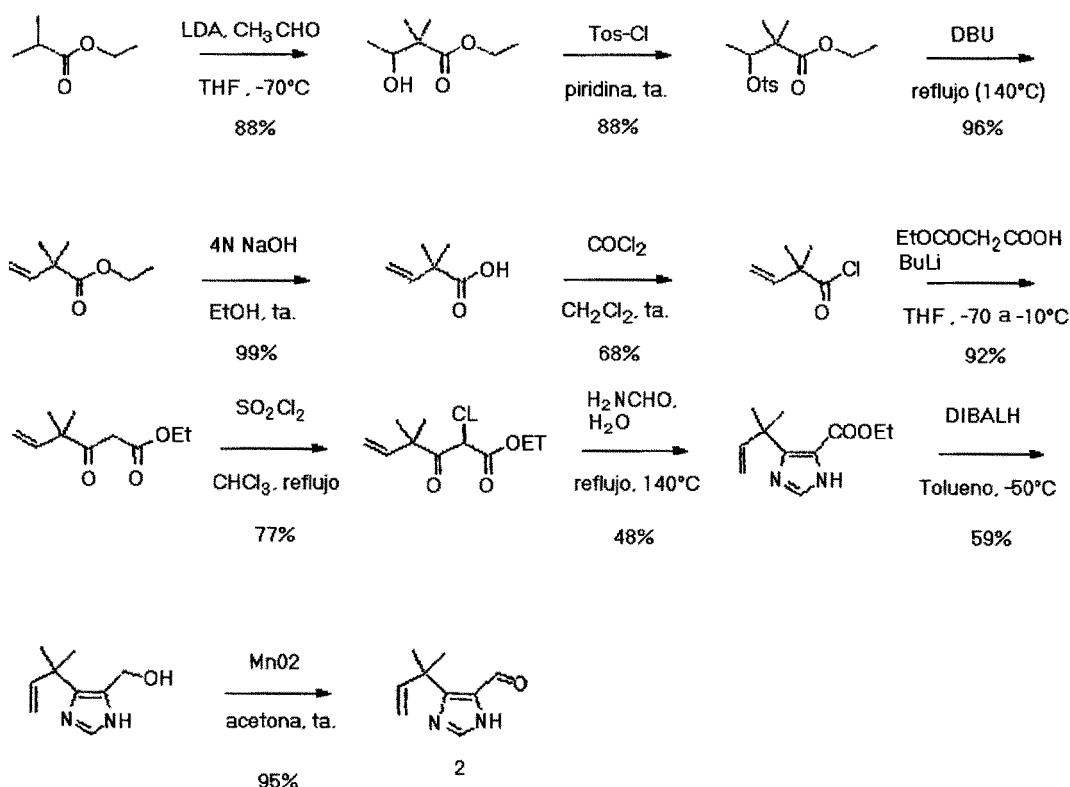
Los términos “arilo”, “arilo sustituido”, “heteroarilo” y “heteroarilo sustituido” como se utilizan en la presente se refieren a los anillos de hidrocarburo aromáticos, que preferentemente tienen cinco, seis o siete átomos y más preferentemente tienen seis átomos que comprenden el anillo. “Heteroarilo” y “heteroarilo sustituido” se refieren a anillos de hidrocarburo aromáticos en los cuales al menos un heteroátomo, *e.g.*, átomo de oxígeno, azufre o nitrógeno se encuentra en el anillo con al menos un átomo de carbono.

El término “alcoxi” se refiere a cualquier éter saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, prefiriéndose éteres C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituidos, saturados, no ramificados, prefiriéndose metoxi, y también prefiriéndose dimetil, dietil, metil-isobutil y metil-ter-butil éteres. El término “cicloalcoxi” se refiere a cualquier anillo de hidrocarburo no aromático, que preferentemente tiene de cinco hasta doce átomos que comprenden el anillo.

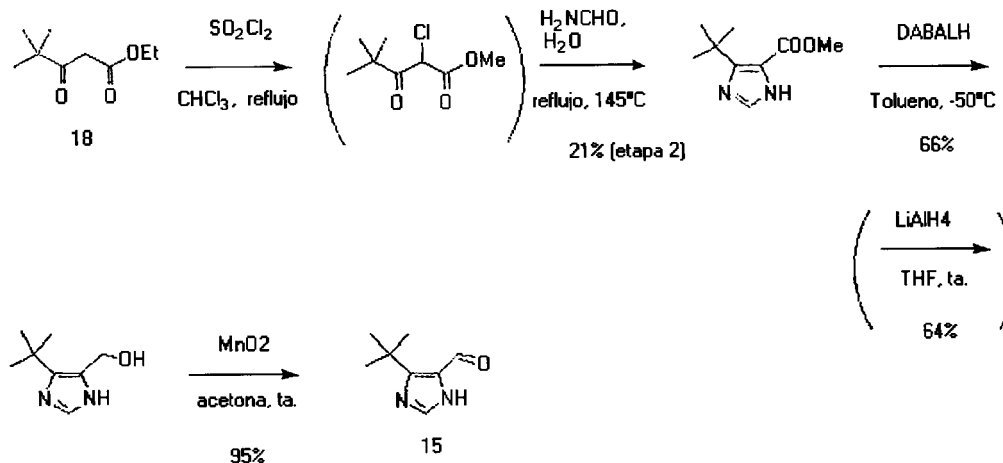
Los términos “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado” como se utiliza en la presente se refiere al compuesto que se encuentra libre de otros compuestos diferentes con los cuales el compuesto se asocia normalmente en su estado natural, de modo que el compuesto de la invención comprende al menos 0.5%, 1%, 5%, 10% o 20% y más preferentemente al menos 50% o 75% de masa, por peso de una muestra dada.

El compuesto de la Fórmula (I) puede sintetizarse o producirse químicamente a partir de reactivos conocidos y disponibles en la técnica. Por ejemplo, se han descrito las modificaciones de por ejemplo diacetildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina), por Loughlin *et al.*, 2000 *Bioorg Med Chem Lett* 10: 91 o por Brocchini *et al.*, en WO 95/21832. Puede prepararse por ejemplo la diacetildicetopiperazina (diacetildicetopiperazina) mediante diacetilación de 2,5-piperazinadiona económica (TCI Cat. No. G0100, 25 g) con acetato de sodio y anhídrido de sodio. La estructura de diacetilo de la descetopiperazina activada puede reemplazarse con otros grupos acilo, para incluir carbamatos tales como Boc (t-butoxicarbonilo), Z(benzoiloxicarbonilo).

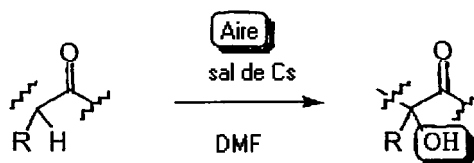
Puede prepararse el imidazolcarboxaldeído por ejemplo de acuerdo con el procedimiento descrito en Hayashi *et al.*, 2000 *J Organic Chem* 65: 8402 como se representa abajo:



Otro ejemplo de un derivado de imidazolcarboxaldehído es un derivado de imidazol-4-carboxaldehído 15 el cual puede producirse a partir de por ejemplo un beta-cetoéster 18 comercialmente disponible (TCI Cat. No. P1031, 25 ml) mediante la siguiente ruta:



El método sintético descrito en la presente puede llevarse a cabo preferentemente en presencia de carbonato de cesio como una base en DMF y en una atmósfera desoxigenada. La atmósfera inerte evita la oxidación probable de los átomos de  $\alpha$ -carbono activado del anillo de dicetopiperazina durante el tratamiento con carbonato de cesio (ver abajo) como se reportó por ejemplo, por Watanabe *et al.*, 18th International Congress of Heterocyclic Chemistry in Yokohama, Japón (30 de Julio de 2001), Resumen, página 225.



#### Oxidación por Aire de Compuestos de Carbonilo Activado con Sales de Cesio

Otras realizaciones del método sintético involucran las modificaciones a los compuestos utilizados o de otro modo involucrados en la síntesis de los compuestos representados por la Fórmula (I). Tales derivados pueden incluir modificaciones al anillo de fenilo, la introducción de otros sistemas de anillo aromático, la posición del anillo aromático, las alteraciones al sistema de anillo de imidazol y/o modificaciones adicionales en la posición 5 del anillo de imidazol. Ejemplos de tales modificaciones se tratan por ejemplo en el Ejemplo 4. El resultado de tales modificaciones incluye el contenido de nitrógeno incrementado del anillo de fenilo y/o el compuesto el cual puede incrementar la solubilidad del compuesto. Otras modificaciones pueden incorporar derivados de inhibidores de tubulina conocidos, imitando por lo tanto la actividad de los inhibidores de tubulina. Otras modificaciones pueden simplificar la síntesis del  $\beta$ -cetoéster involucrado en la producción del imidazolcarboxaldehído utilizado en los métodos descritos en la presente.

#### Composiciones Farmacéuticas

La presente invención también abarca los compuestos descritos en la presente, opcional y preferentemente producidos por los métodos descritos en la presente, en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable preparado para el almacenamiento y administración subsecuente, el cual tiene una cantidad farmacéuticamente efectiva de los productos anteriormente descritos en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Los conservadores, estabilizadores, tinturas y aún agentes saborizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Por ejemplo, pueden agregarse como conservadores benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse agentes antioxidantes y de suspensión.

Pueden formularse las composiciones de deshidrofenilhistina o análogos de deshidrofenilhistina y utilizarse como tabletas, cápsulas o elixires para administración oral; supositorios para administración rectal; soluciones estériles, suspensiones para administración inyectable; parches para administración transdérmica y depósitos sub-dermales y lo similar. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido antes de la inyección o infusión o como emulsiones. Los excipientes adecuados son por ejemplo, agua, salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, hidrocloreuro de cisteína, albúmina de suero humano y lo similar. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores de pH y lo similar. Si se desea, pueden utilizarse las preparaciones que mejoran la absorción (por ejemplo, liposomas).

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en la forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, pomelo o almendra o ésteres de ácido graso sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse al combinar los compuestos activos con el excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después agregar auxiliares adecuados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son en particular rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma, tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes desintegrantes, tales como polivinil pirrolidona reticulado, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Se proporcionan los núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden utilizarse soluciones de azúcar concentrada, las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilén glicol y/o dióxido de titanio, soluciones laqueadas y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Las materias colorantes o pigmentos pueden agregarse a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar las diferentes combinaciones de la dosis del compuesto activo. Para este propósito, pueden utilizarse las soluciones de azúcar concentrada, las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilén glicol y/o dióxido de titanio, soluciones laqueadas y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Pueden agregarse materias colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de la dosis del compuesto activo. Tales formulaciones pueden elaborarse utilizando los métodos conocidos en la técnica (ver por ejemplo, las Patentes U.S. No. 5,733,888 (composiciones inyectables); 5,726,181 (compuestos deficientemente solubles en agua); 5,707,641 (proteínas o péptidos terapéuticamente activos); 5,667,809 (agentes lipofílicos); 5,576,012 (agentes poliméricos solubilizantes); 5,707,615 (formulaciones anti-virales); 5,683,676 (medicamentos de particulado); 5,654,286 (formulaciones tópicas); 5,688,529 (suspensiones orales); 5,445,829 (formulaciones de liberación prolongada); 5,653,987 (formulaciones líquidas); 5,641,515 (formulaciones de liberación controlada); y 5,601,845 (formulaciones esferoides).

Se describen además en la presente varias composiciones farmacéuticas bien conocidas en la técnica farmacéutica para usos que incluyen la administración intraocular, intranasal e intraauricular. Las formulaciones farmacéuticas incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, tales como gotas para ojos o en goma de gelatina (Shedden *et al.*, 2011 *Clin Ther* 23(3): 440-50) o hidrogeles (Mayer *et al.*, 1996, *Ophthalmologic* 210: 101-3); ungüentos oftálmicos; suspensiones oftálmicas tales como microparticulados, partículas poliméricas pequeñas que contienen droga que se suspenden en un medio portador líquido (Joshi, A., 1994 *J Ocul Pharmacol* 10: 29-45), formulaciones solubles en lípidos (Alm *et al.*, 1989 *Prog Clin Biol Res* 312: 447-58) y microesferas (Mordenti, 1999 *Toxicol Sci* 52: 101-6); e insertos oculares. Tales formulaciones farmacéuticas adecuadas son más frecuentes y se formulan preferentemente para ser estériles, isotónicas y amortiguadas para estabilidad y confort. Las composiciones farmacéuticas pueden también incluir gotas y pulverizadores preparados con frecuencia para estimular en muchos aspectos las secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing, 18.ª Edición) y se conoce bien por los expertos en la técnica, las formulaciones adecuadas son más frecuentes y preferentemente isotónicas, ligeramente amortiguadas para mantener un pH de 5.5 hasta 6.5 y más frecuente y preferentemente incluyen conservadores antimicrobiales y estabilizadores de droga apropiados. Las formulaciones farmacéuticas para administración intraocular incluyen suspensiones y ungüentos para aplicación tópica en el oído. Los solventes comunes para tales formulaciones aurales incluyen glicerina y agua.

Cuando se utiliza como un inhibidor del ciclo celular, un compuesto que inhibe el crecimiento del tumor o que inhibe el crecimiento del hongo, puede administrarse el compuesto de la Fórmula (I) ya sea mediante vía oral o no oral. Cuando se administra oralmente, puede administrarse en cápsula, tableta, gránulo, pulverizador, jarabe u otra forma. Cuando se administra no oralmente, puede administrarse como una suspensión acuosa, una preparación oleosa o lo similar o como goteo, supositorio, ungüento, pomada o lo similar, cuando se administra a través de la

inyección o infusión, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o lo similar. De manera similar, puede administrarse tópica, rectal o vaginalmente, como se considera apropiado por aquellos de experiencia en la técnica para poner el compuesto en contacto óptimo con un tumor, inhibiendo así el crecimiento del tumor. También se contempla la administración local en el sitio del tumor ya sea antes o después de la resección del tumor, como son las formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito y liberación por bombeo de infusión.

#### Métodos de Administración

La presente invención también abarca los métodos para elaborar y para administrar los compuestos químicos descritos y las composiciones farmacéuticas descritas. Tales métodos descritos incluyen entre otros, (a) la administración a través de vía oral, cuya administración incluye la administración en cápsula, tableta, gránulo, pulverizado, jarabe u otras formas; (b) la administración a través de vías no orales, cuya administración incluye la administración como una suspensión acuosa, una preparación oleosa o lo similar o como un goteo, supositorio, ungüento o lo similar; la administración a través de la inyección o infusión, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o lo similar; así como (c) la administración tópica, (d) la administración rectal o (e) la administración vaginal, como se considere apropiado por aquellos con experiencia en la técnica para poner el compuesto en contacto con el tejido vivo; y (f) la administración a través de formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito y de suministro por bombeo de infusión. Como ejemplos adicionales de tales modos de administración y como descripción adicional de modos de administración descritos en la presente se encuentran varios métodos para la administración de los compuestos químicos y composiciones farmacéuticas descritos incluyendo los modos de administración a través de vías intraoculares, intranasales e intraauriculares.

La cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición de deshidrofenilhistina o análogo de deshidrofenilhistina requerida como una dosis que dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluyendo el humano, a tratarse y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede adaptarse para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que se reconocerán por el experto en las técnicas médicas.

Al practicar los métodos, los productos o composiciones pueden utilizarse solos o en combinación entre sí o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por ejemplo, como se describe en la presente, los compuestos descritos en la presente son efectivos en el tratamiento del cáncer cuando se utilizan en combinación con otros activos, específicamente otros quimioterapéuticos por ejemplo, quimioterapéuticos CPT-11 biológicos y específicos, Taxoteno (docataxel) y paclitaxel. Los compuestos descritos en la presente también son efectivos en el tratamiento del cáncer cuando se utilizan en combinación con otros activos, incluyendo agentes anti-vasculares, agentes anti-angiogénicos, tales como Erbitux (Imclone/bristol-Myers) e Iressa (AstraZeneca), otros inhibidores VEGF y biológicos, más específicamente al menos un anticuerpo anti-VEGF, especialmente anticuerpos monoclonales para el receptor VEGF, incluyendo DC101, un anticuerpo monoclonal de rata, el cual bloquea el receptor 2 de VEGF de ratón (flk-1). Pueden utilizarse tales combinaciones *in vivo*, comúnmente en un mamífero, preferentemente en un humano o *in vitro*. Al emplearlos *in vivo* los compuestos descritos solos o en combinación con otros quimioterapéuticos u otros productos biológicos pueden administrarse al mamífero en una variedad de formas incluyendo la parenteral, intravenosa, a través de infusión o inyección, subcutánea, intramuscular, colonica, rectal, vaginal, nasal o intraperitonealmente, empleando una variedad de formas de dosis. Tales métodos también pueden aplicarse para actividad química de prueba *in vivo*.

Como será fácilmente aparente para el experto en la técnica, la utilidad de la dosis *in vivo* para administrarse y el modo particular de administración variará dependiendo de la edad, peso y especie de mamífero tratado, los compuestos particulares empleados y el uso específico para el cual se emplean estos compuestos. La determinación de los niveles de dosis efectiva, es decir, los niveles de dosis necesarios para lograr el resultado deseado, pueden llevarse a cabo por un experto en la técnica utilizando los métodos farmacológicos de rutina. Típicamente, las aplicaciones clínicas a humanos de los productos se inician en niveles de dosis inferiores, incrementándose el nivel de dosis hasta que se logra el efecto deseado. Alternativamente, pueden utilizarse los estudios *in vitro* aceptables para establecer la dosis útil y las rutas de administración de las composiciones identificadas por los métodos presentes utilizando los métodos farmacológicos establecidos.

En estudios animales no humanos, las aplicaciones de los productos potenciales se inician a niveles de dosis elevadas, decreciendo la dosis hasta que el efecto deseado ya no se logra o los efectos colaterales adversos desaparecen. La dosis puede variar ampliamente, dependiendo de las efectos deseados y de la indicación terapéutica. Típicamente las dosis pueden ser entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100 mg/kg del peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente las dosis pueden basarse y calcularse en el área de superficie del paciente, como se entenderá por el experto en la técnica. La administración puede ser oral, sobre una base de cada tres días, cada tercer día, diariamente, dos veces al día o tres veces al día.

La ruta de administración y dosis de la formulación exacta puede seleccionarse mediante el médico individual en vista de la condición del paciente. Ver por ejemplo, Fingl *et al.*, en The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975. Debe notarse que el médico que atiende puede conocer cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad o a las disfunciones del órgano. A la inversa, el médico que atiende también puede saber ajustar



el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no es la adecuada (evitando la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la severidad de la condición a tratarse y con la ruta de administración. La severidad de la condición puede evaluarse por ejemplo, en parte mediante los métodos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y tal vez la frecuencia de la dosis también variará de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente particular. Un programa comparable a lo tratado anteriormente puede utilizarse en la medicina veterinaria.

Dependiendo de las condiciones específicas a tratarse, tales agentes pueden formularse y administrarse sistémica o localmente. Puede encontrarse una variedad de técnicas para la formulación y administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.º Ed. Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Las rutas de administración adecuadas pueden incluir la administración oral, rectal, transdermal, vaginal, transmucosal o intestinal; la administración parenteral incluyendo las inyecciones intramuscular, subcutánea, intramedular así como las inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, vía infusión, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Para la inyección o infusión, los agentes pueden formularse en soluciones acuosas, por ejemplo en amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o amortiguador de salina fisiológica. Para tal administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetradores apropiados para la barrera a penetrar. Tales penetradores se conocen generalmente en la técnica. El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos descritos en la presente para la práctica de la invención en dosis adecuadas para la administración sistémica se encuentra dentro del alcance de la invención. Con la selección apropiada del vehículo y la práctica de elaboración adecuada, las composiciones descritas en la presente, en particular, aquellas formuladas como soluciones, pueden administrarse parenteralmente, tal como mediante inyección o infusión intravenosa. Los compuestos pueden formularse fácilmente utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para la administración oral. Tales vehículos permiten que los compuestos se formulen como tabletas, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas, suspensiones y similares para la ingestión oral por un paciente a tratar.

Los agentes propuestos para administrarse intracelularmente pueden administrarse utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, tales agentes pueden encapsularse en liposomas, después administrarse como se describió anteriormente. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales se protegen ambos del micro-ambiente externo y debido a que los liposomas se fusionan con membranas celulares, se administran eficientemente en el citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, las moléculas orgánicas pequeñas pueden administrarse directamente de manera intracelular.

La determinación de las cantidades efectivas se encuentra dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables comprendiendo excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para la administración oral pueden estar en la forma de tabletas, grageas, cápsulas o soluciones. Las composiciones farmacéuticas pueden elaborarse en una forma que es conocida por sí misma, por ejemplo, por medio del mezclado convencional, disolución, granulación, elaboración de grageas, levitación, emulsificación, encapsulando, inclusión o procesos de liofilización.

Los compuestos descritos en la presente pueden evaluarse por su eficacia y toxicidad utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular o de un subconjunto de los compuestos, que comparte ciertos residuos químicos, puede establecerse al determinar la toxicidad *in vitro* hacia una línea celular, tal como un mamífero y preferentemente la línea celular humana. Los resultados de tales estudios con frecuencia son predictivos de la toxicidad en animales, tales como mamíferos o más específicamente humanos. Alternativamente, la toxicidad de los compuestos particulares en un modelo animal, tales como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse utilizando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse utilizando varias técnicas de métodos reconocidos, tales como los métodos *in vitro*, modelos animales o pruebas clínicas humanas. Los modelos *in vitro* reconocidos en la técnica existen para una clase muy cercana de condición, incluyendo las condiciones disminuidas por los compuestos descritos en la presente, incluyendo cáncer, enfermedad cardiovascular y varias infecciones fúngicas. De manera similar, pueden utilizarse los modelos animales aceptables para establecer la eficacia de químicos para tratar tales condiciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el técnico experto puede guiarse mediante el estado de la técnica para seleccionar un modelo, dosis y vía de administración y régimen adecuados. Por supuesto, también pueden utilizarse las pruebas clínicas humanas para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

Cuando se utiliza como un agente anti-cáncer o un compuesto que inhibe el crecimiento del tumor, los compuestos descritos en la presente pueden administrarse mediante vías orales o no orales. Cuando se administra oralmente, puede administrarse en cápsula, tableta, gránulo, pulverizador, jarabe u otra forma. Cuando no se administra oralmente, puede administrarse como una suspensión acuosa, una preparación oleosa o similar como un goteo, supositorio, bálsamo, ungüento o similar, cuando se administra a través de inyección o infusión, en forma subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradermal o similar. De manera similar, puede administrarse tópica, rectal o vaginalmente, como se considere apropiado por los expertos en la técnica para poner el compuesto en contacto óptimo con un tumor, inhibiendo así el crecimiento del tumor. La administración local en el sitio del tumor u otra condición de enfermedad

## ES 2 295 695 T3

también se contempla, ya sea antes o después de la resección del tumor o como parte de un tratamiento reconocido en la técnica de la condición de la enfermedad. De manera similar se contemplan las formulaciones de liberación controlada, formulaciones de depósito y administración por bombeo de infusión.

5 Cuando se utiliza como un agente anti-cáncer o un agente anti-tumoral, puede administrarse oralmente o no oralmente a un paciente humano en la cantidad de aproximadamente .0007 mg/día hasta aproximadamente 7,000 mg/día del ingrediente activo y más preferentemente aproximadamente 0.07 mg/día hasta aproximadamente 70 mg/día del ingrediente activo, preferentemente una vez al día o menos preferentemente de dos hasta aproximadamente diez veces al día. Alternativa y también preferentemente, el compuesto puede administrarse preferentemente en las cantidades  
10 establecidas continuamente por ejemplo, un goteo intravenoso. Así, para un paciente que pesa 70 kilogramos, la dosis diaria preferida del ingrediente antitumoral activo puede ser de aproximadamente 0.0007 mg/kg/día, hasta aproximadamente 35 mg/kg/día incluyendo 1.0 mg/kg/día y 0.5 mg/kg/día, y más preferible desde 0.007 mg/kg/día hasta aproximadamente 0.050 mg/kg/día incluyendo 0.035 mg/kg/día. Sin embargo, como se entenderá por el experto en la técnica, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar el compuesto antitumoral en cantidades que excedan o  
15 aún excedan mas allá del rango de dosis preferido anteriormente establecido para tratar efectiva y agresivamente de manera particular los tumores avanzados o letales.

Cuando se utiliza un agente anti-fúngico la cantidad preferible de deshidrofenilhistina o su análogo efectivo en el tratamiento o prevención de un patógeno fúngico particular dependerá en parte de las características de los hongos y el grado de la infección y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los rangos de dosis óptimos. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas a partir del análisis *in vitro* o preferentemente a partir de modelos animales. El nivel de dosis preciso debe determinarse mediante el médico que atiende u otro proveedor del cuidado de la salud y dependerá de los factores bien conocidos, incluyendo la ruta de administración y la edad,  
20 peso corporal, sexo y salud general del individuo; la naturaleza, severidad y etapa clínica de la infección; el uso (o no) de terapias concomitantes.

La dosis efectiva de la deshidrofenilhistina o su análogo estará típicamente en el rango de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 50 mg/kgs, preferentemente aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del mamífero por día, administrada en una sola o múltiples dosis. Generalmente, el compuesto puede administrarse a pacientes con la necesidad de tal tratamiento en un rango de dosis diario de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2000 mg por paciente.  
30

Para formular la dosis incluyendo los compuestos descritos en la presente como un compuesto que inhibe el crecimiento del tumor, pueden utilizarse los agentes activos de superficie, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión y sustancias de formación de película farmacéuticamente aceptables y auxiliares de recubrimiento y similar. Preferentemente pueden utilizarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similar como agentes activos de superficie; pueden utilizarse como excipientes sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, anhídrido silicato ligero, aluminato de magnesio, aluminato de metasilicato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato de ácido sódico, fosfato de hidrógeno de calcio, carboximetil celulosa de calcio y similar; pueden utilizarse como agentes suavizantes estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y similar; pueden utilizarse como agentes de suspensión o lubricantes aceite de coco, aceite de olivo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja; pueden utilizarse ftalato de acetato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar o copolímero de metilacetato-metacrilato como un derivado de polivinilo como agentes de  
40 suspensión; y pueden utilizarse plastificantes tales como ftalatos de éster y similar como agentes de suspensión. Además de los ingredientes anteriores preferidos, pueden agregarse edulcorantes, fragancias, colorantes, conservadores y similar para la formulación administrada del compuesto, particularmente cuando el compuesto se va a administrar oralmente.

Las composiciones descritas en la presente también pueden comprender en las composiciones farmacéuticas un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden prepararse para almacenamiento y para administración subsecuente. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, tales composiciones pueden formularse y utilizarse como tabletas, cápsulas o soluciones para administración oral; supositorios para administración rectal o vaginal; soluciones o suspensiones estériles para administración inyectable. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en el líquido antes de la inyección o infusión o como emulsiones. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, hidrocloreuro de cisteína y similar. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes amortiguadores del pH y similar. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones que mejoran la absorción (por ejemplo liposomas).  
50  
55  
60

La cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición requerida como una dosis dependerá de la ruta de administración, el tipo de animal a tratar y las características físicas del animal específico bajo consideración. La dosis puede diseñarse para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores los cuales reconocerán aquellos expertos en la técnica de la medicina.  
65

Los productos o composiciones, como se describió anteriormente, pueden utilizarse solos o en combinación entre si o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Específicamente, los productos de los compuestos descritos pueden utilizarse solos o en combinación con otros quimioterapéuticos o biológicos incluyendo los anticuerpos para el tratamiento del cáncer o en combinación con otros anti-infectivos para el tratamiento de la infección fúngica. Estos productos o composiciones pueden utilizarse *in vivo* o *in vitro*. Las dosis útiles y los modos más útiles de administración variarán dependiendo de la edad, peso y animal tratado, de los compuestos particulares empleados y del uso específico para el cual esta composición o composiciones se emplean. La magnitud de una dosis en el manejo o tratamiento para un trastorno particular variará con la severidad de la condición a tratar y de la ruta de administración y dependiendo de las condiciones de la enfermedad y su severidad, las composiciones pueden formularse y administrarse ya sea sistémica o localmente. Puede encontrarse una variedad de técnicas para la formulación y administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.º ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

Para formular los compuestos de la Fórmula (I), producidos preferentemente en forma sintética de acuerdo con los métodos descritos en la presente, como un inhibidor del ciclo celular, un inhibidor del crecimiento del tumor o un compuesto antifúngico, pueden utilizarse los agentes activos de superficie conocidos, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión y sustancias de formación de película farmacéuticamente aceptables y los auxiliares de recubrimiento y similar. Preferentemente pueden utilizarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similar como agentes activos de superficie; pueden utilizarse como excipientes sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, anhídrido silicato ligero, aluminato de magnesio, aluminato de metasilicato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato de ácido sódico, fosfato de hidrógeno de calcio, carboximetil celulosa de calcio y similar; pueden utilizarse como agentes suavizantes estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y similar; pueden utilizarse como agentes de suspensión o lubricantes aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja; el ftalato de acetato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar o copolímero de metilacetato-metacrilato pueden utilizarse como un derivado de polivinilo como agentes de suspensión; y los plastificantes tales como ftalatos de éster y similar pueden utilizarse como agentes de suspensión. Además de los ingredientes anteriormente preferidos, pueden agregarse edulcorantes, fragancias, colorantes, conservadores y similar para la formulación administrada del compuesto producido mediante el método, particularmente cuando el compuesto se va a administrar oralmente.

Los inhibidores del ciclo celular, los agentes antitumorales y los agentes antifúngicos que pueden producirse mediante el método pueden administrarse oralmente o no oralmente a un paciente humano en la cantidad de aproximadamente 0.001 mg/kg/día hasta aproximadamente 10,000 mg/kg/día del ingrediente activo y más preferentemente de aproximadamente 0.1 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día del ingrediente activo, preferentemente una vez cada tres días sobre una base cíclica, una vez cada tercer día, una vez al día, dos veces al día o menos preferentemente, de dos hasta aproximadamente diez veces al día. Alternativa y también preferentemente, el compuesto producido mediante el método puede administrarse preferentemente en las cantidades establecidas continuamente mediante por ejemplo, un goteo intravenoso. Así, para el ejemplo de un paciente que pesa 70 kilogramos, la dosis diaria preferida del ingrediente antitumoral activo puede ser de aproximadamente 0.07 mg/día hasta aproximadamente 700 gramos/día y más preferible 7 mg/día hasta aproximadamente 7 gramos/día. Sin embargo, como se entenderá por el experto en la técnica, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar el compuesto antitumoral producido por el método en cantidades que excedan o aún excedan mas allá el rango de dosis preferido anteriormente establecido para tratar efectiva y agresivamente de manera particular los tumores avanzados o letales.

En el caso de utilizar el inhibidor del ciclo celular producido mediante los métodos como un reactivo de prueba bioquímica, el compuesto producido mediante los métodos de la invención inhibe la progresión del ciclo celular cuando se disuelven en un solvente orgánico o solvente orgánico acuoso y se aplica directamente a cualquiera de varios sistemas celulares cultivados. Los solventes orgánicos utilizables incluyen por ejemplo, metanol, metilsulfóxido y similar. La formulación puede por ejemplo, ser un inhibidor en polvo, granular u otro sólido o un inhibidor líquido preparado utilizando un solvente orgánico o un solvente orgánico acuoso. Mientras que una concentración preferida del compuesto producido mediante el método de la invención para utilizarse como inhibidor del ciclo celular generalmente se encuentra en el rango de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 µg/ml, la cantidad de uso más apropiada varía dependiendo del tipo de sistema celular cultivado y el propósito de uso, como se apreciará por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. También, en ciertas aplicaciones puede ser necesario o preferido para las personas de experiencia ordinaria en la técnica utilizar una cantidad fuera del rango anterior.

A partir de una perspectiva farmacéutica, ciertas realizaciones proporcionan métodos para prevenir o tratar infecciones fúngicas y/o hongos patógenos en un sujeto, involucrando administrar al sujeto una composición que incluye una deshidrofenilhistina o su análogo por ejemplo, administrar la deshidrofenilhistina o su análogo en una cantidad y forma la cual proporcione el efecto antifúngico propuesto.

Otras realizaciones incluyen el tratamiento o prevención de la infección en un paciente mediante un hongo patógeno tal como el listado anteriormente o referido abajo.

Otra realización se refiere al tratamiento o prevención de la infección en un paciente mediante un hongo patógeno el cual es resistente a uno o más agentes antifúngicos diferentes, especialmente un agente diferente a la deshidro-

fenilhistina o su análogo, incluyendo e.g., anfotericina B o análogos o derivados de la misma (incluyendo 14(s)-hidroxianfotericina B metil éster, la hidrazida de anfotericina B con 1-amino-4-metilpiperazina y otros derivados) u otros antibióticos de polieno macrolida, incluyendo e.g., nistatina, candicidina, pimaricina y natamicina; flucitosa; griseofulvina; echinocandinas o aureobasidinas, incluyendo análogos semi-sintéticos que ocurren de manera natural; 5 dihidrobenzo[a]naptacenoquinonas; antifúngicos de péptido de nucleosido incluyendo las polioxinas y nicomicinas; alilaminas tales como naftifina y otros inhibidores de epoxidasa de escualeno; y azoles, imidazoles y triazoles tales como e.g., clotrimazol, miconazol, cetoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, terconazol, itraconazol o fluconazol y similar. Para agentes antifúngicos convencionales adicionales y nuevos agentes bajo desarrollo, ver, e.g., Turner y Rodríguez, 1996 *Current Pharmaceutical Design*, 2: 209-224. Otra realización involucra el tratamiento o prevención 10 de la infección en un paciente mediante un hongo patógeno en casos en los cuales el paciente es alérgico o de otro modo intolerante o no sensible a uno o más de los agentes antifúngicos o en el cual el uso de otros agentes antifúngicos se encuentra de otro modo contra-indicado. Aquellos otros agentes antifúngicos incluyen entre otros, aquellos agentes antifúngicos descritos arriba y en otra parte en la presente.

15 En los métodos precedentes para el tratamiento o prevención, una deshidrofenilhistina o su análogo, se administra al sujeto en una cantidad antifúngica efectiva.

Otras realizaciones se refieren al tratamiento o prevención de la infección mediante un hongo patógeno en una paciente mediante la administración de una deshidrofenilhistina o su análogo, junto con la administración de uno o 20 más agentes antifúngicos diferentes incluyendo por ejemplo, cualquiera de los agentes o tipos de agentes previamente mencionados (e.g., en combinación con el tratamiento con anfotericina B, preferentemente en una formulación lipídica o de liposoma; un azol o triazol tal como fluconazol, por ejemplo; una aureobasidina; dihidrobenzo[a]naptacenoquinona; o una echinocardina) así como con una deshidrofenilhistina diferente o su análogo.

25 La deshidrofenilhistina o su análogo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que se administren otros agentes antifúngicos. En ciertas realizaciones, la terapia de combinación permitirá el uso de cantidades reducidas de uno o ambos componentes antifúngicos, relacionados con la cantidad utilizada si se utiliza solo.

Aún otras realizaciones se refieren a la administración de una deshidrofenilhistina o su análogo a un sujeto para 30 el tratamiento o prevención de la infección mediante un hongo patógeno, en donde el sujeto se inmunoinhibe o inmunocompromete e.g., como resultado de trastorno genético, enfermedades tales como diabetes o VIH u otra infección, quimioterapia o tratamiento por radiación para cáncer u otro trastorno o droga o de otro modo la inmunoinhibición inducida en relación con el trasplante de tejido u órgano o el tratamiento de un trastorno autoinmune. En donde el paciente es o se va a tratar con un agente inmunoinhibidor e.g., junto con un trasplante de tejido u órgano, puede co- 35 administrarse una deshidrofenilhistina o su análogo con el(los) agente(s) inmunoinhibidores para tratar o prevenir una infección fúngica patógena.

Otro aspecto de esta invención es el tratamiento o prevención de la infección mediante un hongo patógeno en un paciente infectado o sospechoso de ser infectado con VIH, mediante la administración de una deshidrofenilhistina 40 antifúngica o su análogo, junto con la administración de uno o más terapéuticos anti-VIH (incluyendo e.g., inhibidores de la proteasa VIH, inhibidores de transcriptasa inversos o agentes anti-virales). La deshidrofenilhistina o su análogo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo de la administración del agente(s) anti-VIH.

Otro aspecto de esta invención es el tratamiento o prevención de la infección mediante un hongo patógeno en un 45 paciente mediante la administración de una deshidrofenilhistina antifúngica o su análogo, junto con la administración de uno o más compuestos antibióticos diferentes, especialmente uno o más agentes antibacteriales, preferentemente en una cantidad y régimen efectivo para tratar o prevenir la infección bacteriana. De nuevo, la deshidrofenilhistina o su análogo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo de la administración de otro(s) agente(s).

50 Las infecciones fúngicas patógenas que pueden tratarse o evitarse mediante los métodos descritos incluyen entre otras, Aspergilosis, incluyendo aspergilosis pulmonar invasiva; Blastomycosis, incluyendo las infecciones profundas o que progresan rápidamente y blastomycosis en el sistema nervioso central; Candidiasis, incluyendo candidiasis retrógrada del tracto urinario, e.g., en pacientes con piedras en el riñón, obstrucción del tracto urinario, trasplante renal o diabetes mellitus deficientemente controlada; Coccidioidomycosis, incluyendo trastorno crónico el cual no responde bien a otras quimioterapias; Criptococosis; Histoplasmosis; Mucormycosis, incluyendo e.g., mucormico- 55 sis craneofacial y mucormycosis pulmonar; Paracoccidioidomycosis; y Sporotricosis. Debe notarse que puede ser útil particularmente la administración de una composición que comprende una cantidad antifúngica de una o más deshidrofenilhistinas o sus análogos, para tratar o prevenir una infección fúngica patógena en un sujeto mamífero en donde el hongo es resistente a una o más terapias antifúngicas o en donde se contraindica el uso de una o más terapias 60 antifúngicas, e.g., como se mencionó anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas antifúngicas que contienen al menos una deshidrofenilhistina antifúngica o su análogo, también se proporcionan para utilizarse en la práctica de los métodos descritos. Estas composiciones farmacéuticas pueden envasarse juntas con un envase apropiado conteniendo inserto *inter alia* las instrucciones e 65 información relativa a su uso antifúngico. También se proporcionan realizaciones farmacéuticas que contienen una o más deshidrofenilhistina o su análogo junto con un segundo agente antifúngico.

### Métodos para Tratar Infecciones Fúngicas

Ciertas realizaciones descritas en la presente se refieren a los métodos para tratar o prevenir una infección fúngica patógena, incluyendo por ejemplo Aspergilosis, incluyendo aspergilosis pulmonar invasiva; Blastomycosis, incluyendo las infecciones profundas o que progresan rápidamente y blastomycosis en el sistema nervioso central; Candidiasis, incluyendo candidiasis retrógrada del tracto urinario, *e.g.*, en pacientes con piedras en el riñón, obstrucción del tracto urinario, trasplante renal o diabetes mellitus deficientemente controlada; Coccidioidomycosis, incluyendo trastorno crónico el cual no responde bien a otras quimioterapias; Criptococosis; Histoplasmosis; Mucormycosis, incluyendo *e.g.*, mucormycosis craneofacial y mucormycosis pulmonar; Paracoccidioidomycosis; y Sporotricosis. Los métodos pueden involucrar administrar al menos una deshidrofenilhistina antifúngica o su análogo como se describió anteriormente, a un sujeto humano de manera que la infección fúngica se trate o se evite. En ciertas modalidades la deshidrofenilhistina o su análogo puede administrarse junto con la administración de uno o más agentes antifúngicos que no son deshidrofenilhistina o su análogo tales como anfotericina B o un agente imidazol o triazol tal como los anteriormente mencionado.

La infección fúngica patógena puede ser tópica, *e.g.*, causada por, entre otros organismos, las especies de *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton* o mucosal, *e.g.*, causada por *Candida albicans* (*e.g.*, candidiasis afta y vaginal). La infección puede ser sistémica, *e.g.*, causada por *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* o *Blastomyces* spp. La infección puede también involucrar el micetoma eumicótico, cromoblastomycosis, meningitis o fomicosis criptococal.

Realizaciones adicionales relacionadas con los métodos para tratar o prevenir una infección fúngica patógena seleccionados del grupo que consiste de *Candida* spp. incluyen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. galbrata*; *Aspergillus* spp. incluyendo *A. fumigatus* y *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces* spp. incluyendo *Blastomyces dermatitidis*; *Pneumocystis carinii*; *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus ranarum*; *Conidiobolus* spp.; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus* spp. incluyendo *R. oryzae* y *R. microsporus*; *Cunninghamella* spp.; *Rhizoglyphus* spp.; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; y *Sporothrix schenckii*. De nuevo, el método puede involucrar administrar una deshidrofenilhistina antifúngica no inmunosupresora o su análogo a un paciente con necesidad del mismo de tal manera que la infección fúngica se trata o evita sin inducir un efecto inmunosupresor adverso.

Realizaciones adicionales se refieren a los métodos para tratar o prevenir una infección fúngica patógena la cual es resistente a otra terapia antifúngica, incluyendo infecciones fúngicas patógenas que son resistentes a uno o más agentes antifúngicos mencionados en otra parte en la presente tales como anfotericina B, flucitosina, uno de los imidazoles o triazoles (incluyendo *e.g.*, fluconazol, cetoconazol, itraconazol y los otros ejemplos anteriormente mencionados). Los métodos pueden involucrar administrar al paciente una o más deshidrofenilhistina antifúngica o su análogo en una cantidad y régimen de dosis tal que se trata o se evita la infección fúngica resistente hacia otra terapia antifúngica en el sujeto.

Realizaciones adicionales se refieren a métodos para tratar o prevenir una infección fúngica patógena en un paciente que es alérgico, intolerante o no sensible a otra terapia antifúngica o en el cual el uso de otros agentes antifúngicos se encuentra de otro modo contra-indicado, incluyendo uno o más agentes antifúngicos diferentes mencionados en otra parte en la presente tales como anfotericina B, flucitosina, uno de los imidazoles o triazoles (incluyendo *e.g.*, fluconazol, cetoconazol, itraconazol y los otros ejemplos anteriormente mencionados). Los métodos pueden involucrar administrar a tal paciente una o más deshidrofenilhistina antifúngica o su análogo en una cantidad tal que se trata o se evita una infección fúngica.

### Deshidrofenilhistina o sus Análogos Envasados

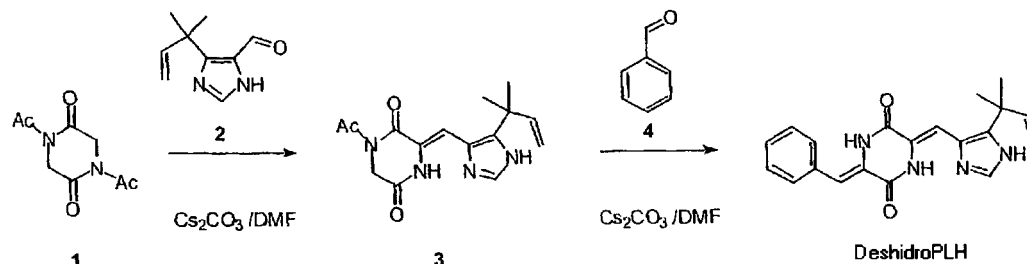
Ciertas realizaciones se refieren a la deshidrofenilhistina o sus análogos envasados, preferentemente deshidrofenilhistina o su análogo antifúngico no inmunosupresores envasados, cuyo término se intenta que incluya al menos una deshidrofenilhistina o su análogo como se describió anteriormente, envasado con las instrucciones para administrar la deshidrofenilhistina o su(s) análogo(s) como un agente antifúngico sin provocar un efecto inmunosupresor adverso en un sujeto humano. En algunas realizaciones, la deshidrofenilhistina o su análogo antifúngico no inmunosupresor es un miembro de uno de los subconjuntos preferidos de los compuestos descritos arriba. La deshidrofenilhistina o su análogo puede envasarse sola con las instrucciones o puede envasarse con otra deshidrofenilhistina o su análogo, rapamicina u otro ingrediente o aditivo, *e.g.*, uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. El envase puede contener uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente asociado con tal contenedor(es) puede encontrarse un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la elaboración, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleje la aprobación por la agencia de la elaboración, uso o venta para la administración humana.

Los siguientes ejemplos no limitantes se refieren a describir los métodos preferidos utilizando ciertas realizaciones preferidas. Las variaciones en los detalles de los métodos particulares empleados y las composiciones químicas precisas se apreciarán indudablemente por aquellos expertos en la técnica.

## Ejemplo 1

## A. Síntesis de la Deshidrofenilhistina

Se sintetizó deshidrofenilhistina mediante condensación de acuerdo con el siguiente esquema de reacción básico, como se muestra en la Figura 1:

*N,N'*-diacetyl-2,5-piperazinadiona

Se mezclaron 25.0 g de 2,5-piperazinadiona 1 global [2,5-piperazinadiona (Aldrich G640-6), 25.0 g, 0.218 mol] en 100 ml de anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O) con acetato de sodio (NaOAc) (17.96 g, .0218 mol). La mezcla se calentó a 110°C durante 8 h utilizando un condensador de doble espiral bajo una atmósfera Ar. Después se retiró Ac<sub>2</sub>O mediante evaporación, el residuo se disolvió en AcOEt, lavado con 10% de ácido cítrico, 10% de NaHCO<sub>3</sub> y NaCl saturado (tres veces cada uno), secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado *in vacuo*. El residuo se trituroó con éter para formar un sólido. El sólido se recrystalizó a partir de EtOAc con éter-hexano para proporcionar 26.4 g (61%) de N,N'-diacetyl-2,5-piperazinadiona 1.

*1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-1H-4-imidazolil]metilideno]]-2,5-piperazinadiona 2*

A una solución de 5-(1,1-dimethyl-2-propenyl)imidazol-4-carboxaldehído (100 mg, 0.609 mmol) en DMF (2 ml) se agregó el compuesto 1 (241 mg, 1.22 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para remover el oxígeno y llenado con Ar seguido mediante la adición de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (198 mg, 0.609 mmol) y se preparó de nuevo el proceso de evacuación-llenado. La mezcla resultante se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Después se retiró el solvente mediante evaporación, el residuo se disolvió en la mezcla de EtOAc y 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y la fase orgánica se lavó de nuevo con 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaCl saturado tres veces, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado *in vacuo*. El aceite residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre sílice utilizando CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0 a 50:1) como un eluyente para dar 60 mg (33%) de un sólido amarillo pálido 2.

*Deshidrofenilhistina*

A una solución de 2 (30 mg, 0.099 mmol) en DMF (0.8 ml) se agregó benzaldehído (51 ml, 0.496 mmol, 5 eq) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para remover el oxígeno y llenar con Ar, seguido por la adición de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 eq) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó durante 2.5 h a 80°C. (La temperatura debe incrementarse lentamente. El calentamiento rápido incrementa la producción del isómero E en el residuo de bencilideno). Después de que se retiró el solvente mediante evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavado con agua dos veces y NaCl saturado durante tres veces, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado *in vacuo*. Sobre TLC utilizando CHCl<sub>3</sub>-MeOH (10:1), se puede observar una mancha con luminiscencia verde-amarillo brillante a 365 nm UV. La pureza de este producto crudo fue de más de 75% a partir del análisis HPLC. El residuo resultante se disolvió en 90% de MeOH acuoso y se aplicó a la columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y se eluyó utilizando un gradiente lineal desde 70 hasta 74% de MeOH en agua durante 16 min a una tasa de flujo de 12 ml/min y la fracción deseada se recolectó y concentró mediante evaporación para dar 19.7 mg (60%) de deshidrofenilhistina coloreada de amarillo. El perfil HPLC de la deshidrofenilhistina sintética cruda se representa en la Figura 2.

En la purificación de la deshidrofenilhistina, como se muestra en la Figura 4, un pico principal fue el compuesto de forma Z deseado de deshidrofenilhistina. Se observó la formación de un isómero E como un componente menor (aproximadamente 10%), el cual se eluyó y como un pico más polar que el isómero Z. Como otros picos menores, también se observaron los compuestos E y Z reducidos y en los cuales se redujo la parte de dimetilalilo de deshidrofenilhistina. La formación de estos compuestos reducidos fue debido a que el aldehído 2 con una impureza reducida, el cual se generó durante la reducción con DIBAL-H y no se separó en el proceso subsecuente.

Estos compuestos menores pueden retirarse mediante la purificación HPLC preparativa, proporcionando deshidrofenilhistina con la configuración Z en la parte de bencilideno en una producción del 60% (20% producido en dos etapas) con más de 95% de pureza. Los compuestos con la configuración E en el lado de imidazol del anillo de dice-

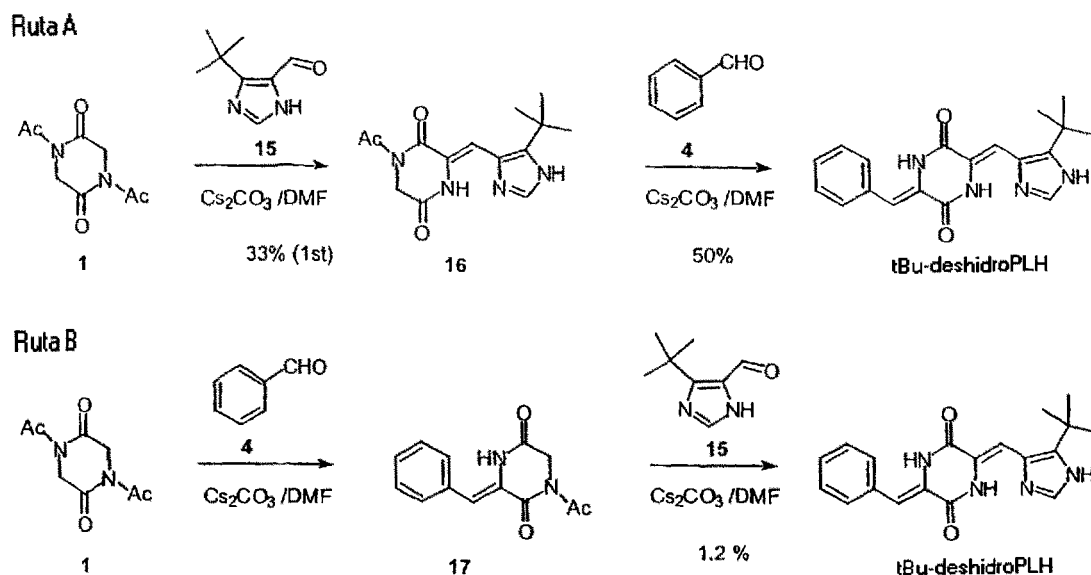
### B. Características químicas

El compuesto de deshidrofenilhistina anterior es un sólido amarillo pálido. Su estructura se confirma mediante análisis NMR estándar.

### Ejemplo 2

#### Síntesis y Caracterización Física de los Derivados de tBu-deshidrofenilhistina

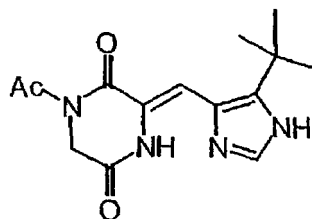
Los derivados estructurales de la deshidrofenilhistina se sintetizaron de acuerdo con los siguientes esquemas de reacción para producir tBu-deshidrofenilhistina. La síntesis mediante la Ruta A (ver Figura 1) es similar en ciertos aspectos a la síntesis de deshidrofenilhistina sintetizada como en el Ejemplo 1.



#### Ruta A

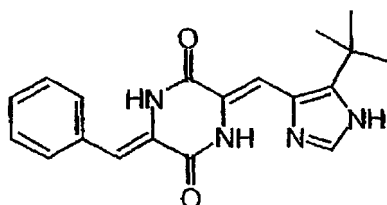
N,N'-diacetil-2,5-piperazinadiona 1 se preparó como en el Ejemplo 1.

1) 1-Acetil-3-((Z)-1-[5-ter-butil-1H-4-imidazolil] metilideno)-2,5-piperazinadiona (16)



A una solución de 5-ter-butilimidazol-4-carboxaldehído 15 (3.02 g, 19.8 mmol) en DMF (30 ml) se agregó el compuesto 1 (5.89g, 29.72 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y llenarlo con Ar seguido por la adición de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9.7 g, 29.72 mmol) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Después el solvente se retiró mediante evaporación, el residuo se disolvió en la mezcla de EtOAc y 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y la fase orgánica se lavó de nuevo con 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y NaCl saturado durante tres veces, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado *in vacuo*. El aceite residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre sílice utilizando CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0 hasta 50:1) como un eluyente para dar 1.90 g (33%) de un sólido amarillo pálido 16. <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12.14 (d, br-s, 1H), 9.22 (br-s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.47 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

## 2) *t*-Bu-deshidrofénilahistina



A una solución de 1-Acetil-3-[(Z)-1-[5-ter-butil-1H-4-imidazolil]metilideno]-2,5-piperazinadiona (16) (11 mg, 0.038 mmol) en DMF (1.0 ml) se agregó benzaldehído (19  $\mu$ l, 0.19 mmol, 5 eq) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y llenarlo con Ar seguido por la adición de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (43 mg, 0.132 mmol, 3.5 eq) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó durante 2.5 h a 80°C. Después el solvente se retiró mediante evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavado con agua dos veces y NaCl saturado tres veces, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrado *in vacuo*. El residuo resultante se disolvió en 90% de MeOH acuoso y aplicado a la columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y se eluyó utilizando un gradiente lineal desde 70 hasta 74% de MeOH en agua durante 16 min a una tasa de flujo de 12 ml/min y la fracción deseada se recolectó y concentró mediante evaporación para dar 6.4 mg (50%) de ter-butil-deshidrofénilahistina coloreada de amarillo. <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12.34 (br-s, 1H), 9.18 (br-s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.31-7.49 (m, 5H), 7.01 (s, 2H), 1.46 (s, 9H).

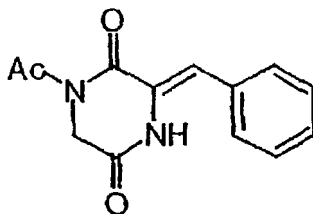
La reacción de la deshidrofénilahistina para producir tBu-deshidrofénilahistina es idéntica al Ejemplo 1.

La producción total de tBu-deshidrofénilahistina recuperado fue 16.5%.

## Ruta B

N,N'-diacetil-2,5-piperazinadiona 1 se preparó como en el Ejemplo 1

## 1) 1-Acetil-3-[(Z)-bencilideno]-2,5-piperazinadiona (17)

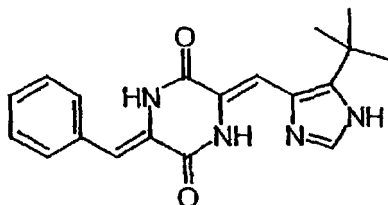


A una solución de benzaldehído 4 (0.54 g, 5.05 mmol) en DMF (5 ml) se agregó el compuesto 1 (2.0 g, 10.1 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para remover el oxígeno y llenarse con Ar, seguido por la adición de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.65 g, 5.05 mmol) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se agitó durante 3.5 h a temperatura ambiente. Después el solvente se retiró mediante evaporación, el residuo se disolvió en la mezcla de EtOAc y 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y la fase orgánica se lavó de nuevo con 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y NaCl saturado



tres veces, secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y concentrado *in vacuo*. El sólido residual se recrystalizó a partir de MeOH-éter para obtener un sólido sin blanco de 17; produciendo 1.95 g (79%).

## 2) *t*-Bu-deshidrofenilhistina



A una solución de 1-Acetil-3-[(Z)-bencilideno 1]-2,5-piperazinadiona (17) (48 mg, 0.197 mmol) en DMF (1.0 ml) se agregó 5-ter-butilimidazol-4-carboxaldehído 15 (30 mg, 0.197 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para retirar el oxígeno y llenarlo con Ar seguido por la adición de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (96 mg, 0.296 mmol) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó durante 14 h a 80°C. Después el solvente se retiró mediante evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavado con agua dos veces y NaCl saturado tres veces, secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y concentrado *in vacuo*. El residuo resultante se disolvió en 90% de MeOH acuoso y aplicado a la columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y se eluyó utilizando un gradiente lineal desde 70 hasta 74% de MeOH en agua durante 16 min a una tasa de flujo de 12 ml/min y la fracción deseada se recolectó y concentró mediante evaporación para dar 0.8 mg (1.2%) de ter-butil-deshidrofenilhistina coloreada de amarillo.

La producción total de tBu-deshidrofenilhistina recuperada fue 0.9%.

El perfil de HPLC de t.Bu-deshidrofenilhistina sintética cruda a partir de la Ruta A y a partir de la Ruta B se representa en la Figura 4.

Se sintetizaron otros dos derivados de tBu-deshidrofenilhistina de acuerdo con el método de la Ruta A. En la síntesis de los derivados de tBu-deshidrofenilhistina adicionales, se hicieron las modificaciones al compuesto 4 de benzaldehído.

La Figura 4 ilustra la similitudes de los perfiles HPLC (Columna: YMC-Pack ODS-AM (20 x 250 mm); Gradiente: 65% hasta 75% en un sistema de metanol-agua durante 20 min, diez min en un 100% del sistema de metanol; Tasa de flujo: 12 ml/min; O.D. 230 nm) a partir de deshidrofenilhistina sintetizada del Ejemplo 1 (Fig. 2) y el compuesto de tBu-deshidrofenilhistina anteriormente ejemplificado producido mediante la Ruta A.

La secuencia de la introducción de los aldehídos es un relevante para la producción y es por lo tanto el aspecto de la síntesis. Se sintetizó un análogo de deshidrofenilhistina, como un control o modelo, en donde el grupo dimetilalilo se cambió al grupo ter-butilo con una obstrucción estérica similar en la posición 5 del anillo de imidazol.

La síntesis de esta “ter-butil(tBu)-deshidrofenilhistina” que utiliza la “Ruta A” fue como se muestra arriba: Particularmente, la secuencia de introducción del aldehído sigue exactamente la síntesis de deshidrofenilhistina y exhibe una producción total de 16.5% de tBu-deshidrofenilhistina. Esta producción fue similar a aquella de deshidrofenilhistina (20%). Utilizando la “Ruta B” en donde es opuesta la secuencia de introducción de aldehídos a aquella de la Ruta “A” para la síntesis de deshidrofenilhistina, solamente se obtuvo una cantidad menor del tBu-deshidroPHL deseado con una producción total de 0.9% aunque en la introducción del primer benzaldehído 4 dio una producción de 76% del compuesto intermedio 17. Este resultado indica que puede ser difícil introducir los imidazol-4-carboxaldehídos 15 altamente voluminosos con un grupo sustituyente que tiene un carbón cuaternario sobre la posición 5 adyacente en el anillo de imidazol en el compuesto 17 intermedio, sugiriendo que la secuencia para la introducción de aldehídos es un aspecto importante para obtener una alta producción de deshidrofenilhistina o un análogo de deshidrofenilhistina que emplea la síntesis descrita en la presente.

A partir del análisis HPLC de los productos crudos finales, como se muestra en la Figura 4, se observaron un muy alto contenido de tBu-deshidrofenilhistina y una pequeña cantidad de formaciones de sub-producto en la muestra cruda de la Ruta A (izquierda). Sin embargo, se observaron una cantidad relativamente menor de la tBu-deshidrofenilhistina deseada y varios otros sub-productos en la muestra obtenida utilizando la Ruta B (derecha).

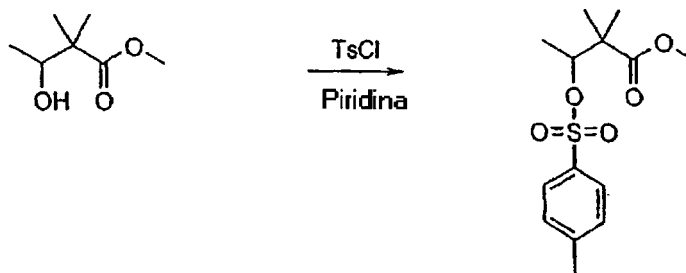


## ES 2 295 695 T3

resultante se agitó durante 30 min. Se agregó cloruro de amonio saturado (50 ml) y se dejó calentar la solución a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con etil acetato y los extractos se lavaron con HCl (2 M), bicarbonato de sodio, después salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, filtrado, evaporado entonces para dar un aceite claro (52.6 g). La destilación a 76-82°/30 mmHg dio ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-butírico metil éster puro (42.3 g, 74%). (Burk *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 117:4423-4424 (1995)).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.15 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H); 1.17 (s, 6H); 2.66 (d,  $J=6.2$  Hz, 1H, -OH); 3.71 (s, 3H, -OMe); 3.87 (app quintet,  $J=6.4$  Hz, 1H, H3).

### Ácido 2,2-Dimetil-3-(tolueno-4-sulfonilo)-butírico metil éster

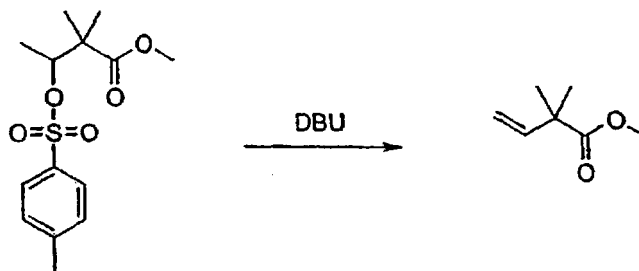


A una solución enfriada (0°) de ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-butírico metil éster (52.0 g, 0.36 mol) en piridina (100 ml) se agregó gradualmente cloruro de p-tolueno sulfonilo (69.0 g, 0.36 mol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 60 h. La reacción se enfrió de nuevo en hielo y se acidificó mediante la adición de HCl (2 M). La solución resultante se extrajo con etil acetato, los extractos se lavaron con HCl, después con salmuera, secados y evaporados para dar un aceite el cual formó un precipitado blanco hasta que se estableció. Esta mezcla se disolvió en la cantidad mínima de etil acetato y después se agregó petróleo ligero para proporcionar un precipitado blanco el cual se recolectó y lavó con más petróleo ligero. El filtrado fue parcialmente evaporado y una segunda cantidad de cristales se recogió y añadió a la primera para proporcionar ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfonilo)-butírico metil éster (81.2 g, 76%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.12 (s, 3H); 1.13 (s, 3H); 1.24 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H); 2.45 (s, 3H, -PhMe) 3.58 (s, 3H, -OMe); 4.94 (cuarteto,  $J=6.4$  Hz, 1H, H3), 7.33 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 7.78 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H).

La evaporación del filtrado final proporcionó ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfonilo)-butírico metil éster crudo adicional (19.0 g, 18%).

### Ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico metil éster



Una solución de ácido 2,2-dimetil-3-(tolueno-4-sulfonilo)-butírico metil éster (18.06 g, 0.06 mol) en DBU (15 ml) se calentó a 140-160° durante 3.5 h. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó entonces con éter. La mezcla se lavó con HCl (1 M), bicarbonato de sodio, después salmuera. La capa etérea se secó y se evaporó parcialmente para dar una solución concentrada de ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico metil éster (10 g). (Savu y Katzenellenbogen, J. Org. Chem. 46:239-250 (1981)). Además la evaporación se abstuvo debido a la volatilidad del producto (bp 102°). (Tsaconas *et al.*, Aust. J. Chem., 53:435-437 (2000)).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.31 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 5.06 (d,  $J=17.1$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.11 (d,  $J=10.7$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6.03 (dd,  $J=17.1, 10.7$  Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

## Ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico



La solución etérea anterior de ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico metil éster (10 g) se diluyó con etanol (25 ml), se agregó hidróxido de sodio (4 M, 22 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La solución se evaporó parcialmente para remover el etanol y la mezcla resultante se agregó a HCl (1 M, 100 ml). El producto se extrajo con etil acetato y los extractos se secaron y se evaporaron para dar ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (6.01 g, 88% 2 etapas). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65: 8402-8405 (2000).

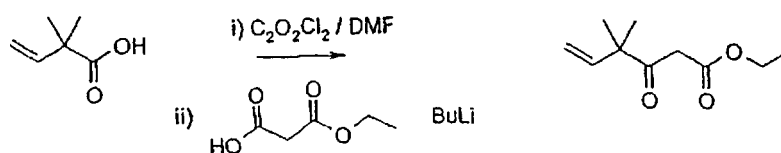
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.33 (s, 6H); 5.11 (d, J=10.8 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.15 (d, J=17.2 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6.05 (dd, J=17.2, 10.8 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

Monoetil malonato de hidrógeno (Wierenga y Skulnick, "Aliphatic and Aromatic β-keto Esters from Monoethyl Malonate: Ethyl 2-Butyrylacetate" Organic Syntheses Collective Volume 7, 213).



Se suspendió etil malonato de potasio (25.0 g, 0.15 mol) en agua (15.6 ml) y se enfrió en baño de hielo. Se agregó a gotas HCl concentrado (12.5 ml) durante 30 min, después la mezcla se agitó durante 10 min adicionales. El precipitado se filtró, después se lavó dos veces con éter. El filtrado se separó y la fase acuosa se extrajo con éter. Las soluciones etéreas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y evaporaron para proporcionar como un aceite, monoetil malonato de hidrógeno (19.2 g, 99%) el cual se secó bajo vacío durante la noche (o 50°/1 mm durante 1 h) antes de su uso.

## Ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico etil éster

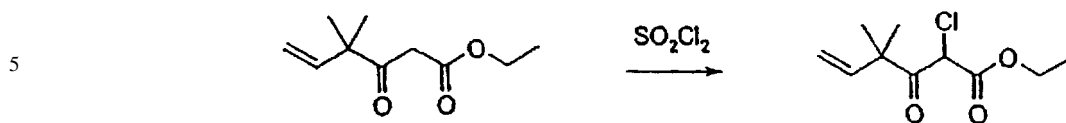


Se agregó a gotas cloruro de oxalilo (3.83 ml, 43.9 mmol) a una solución enfriada (0°) de ácido 2,2-dimetil-but-3-enóico (5.0 g, 43.9 mmol) y DMF (1 gota) en diclorometano anhídrido (25 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a 0°, después durante 16 h a temperatura ambiente. La destilación fraccional (121°/760 mmHg) proporcionó 2,2-dimetil-but-3-enoil cloruro (4.1 g, 71%).

Se disolvieron malonato de monoetil hidrógeno (7.2 g, 0.05 mol) y biperidilo (algunos miligramos) en THF (90 ml) y el sistema se llenó con nitrógeno. La solución se enfrió a -70°, después se agregó BuLi (2.5 M en hexanos, 37 ml, 0.09 mol). Después de la adición de solo ~10 ml de BuLi la solución se volvió rosa y se requirió THF adicional (15 ml) para permitir la agitación magnética. Se retiró el baño en frío y se agregó el BuLi remanente, la temperatura se dejó que alcanzar los -10°, en la cual la solución se volvió incolora. La mezcla se enfrió de nuevo a -60° y se agregó a gotas una solución de 2,2-dimetil-but-3-enoil cloruro (4.1 g, 0.03 mol) en THF (12 ml). Después que se completó la adición, la mezcla se dejó calentar a 0° y agitar durante 3 h, después se agregó a 1:1 de mezcla de éter/1M HCl (260 ml) a 0° y se agitó durante 1.5 h adicional. Se retiró la capa orgánica, se lavó con HCl (1 M), solución de bicarbonato de sodio, salmuera después se secó y evaporó para dar ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico etil éster (5.6 g, 98%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65: 8402-8405 (2000). La destilación con un horno Kugelrohr (160°/1 mmHg) proporcionando material puro.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26 (s, 6H); 1.27 (t, J=6.9 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.51 (s, 2H); 4.18 (q, J=6.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.20 (d, J=17.7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.21 (d, J=9.6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.89 (dd, J=17.7, 9.6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

## Ácido 2-Cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico etil éster



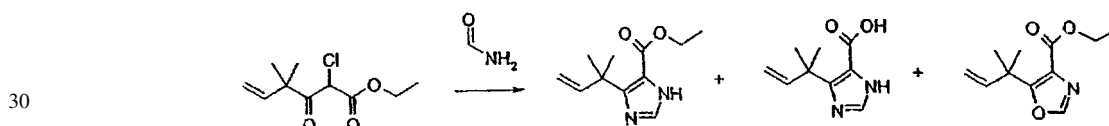
10 Se agregó sulfúrico cloruro (0.84 ml, 10.4 mmol) a una solución enfriada (0°) de etil éster de ácido 4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico (1.83 g, 9.93 mmol) en cloroformo (7 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y agitar durante 30 min, después de lo cual se calentó bajo reflujo durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó en cloroformo, después se lavó con bicarbonato de sodio, agua, después salmuera. La fase orgánica se secó y se evaporó para proporcionar como un aceite marrón, ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico etil éster (2.01 g, 93%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000).

15 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.28 (t, J=7.0 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.33 (s, 3H); 1.34 (s, 3H); 4.24 (q, J=7.0 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.19 (s, 1H); 5.28 (d, J=16.9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.29 (d, J=10.9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.96 (dd, J=16.9, 10.9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

20 LC/MS t<sub>R</sub> = 8.45 (219.3 [M(Cl<sup>37</sup>)+H]<sup>+</sup> min

Este material se hizo reaccionar sin purificación adicional.

## Ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico etil éster



35 Una suspensión de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-hex-5-enóico etil éster (19.4 g, 0.09 mol) y agua (1.94 ml, 0.11 mol) en formamida (36.8 ml) se agitó brevemente, después se colocó en viales de 15 x 18 ml. Los viales se sellaron y se calentaron a 150° durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, los contenidos de los viales se combinaron y se extrajeron exhaustivamente con cloroformo. Los extractos se secaron y evaporaron para proporcionar una solución de formamida concentrada (14.7 g). Esto se agregó a una columna de sílice (7 cm de diámetro, 11 cm de altura) envasada en 1% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N en cloroformo. La elución de la columna con 2 l de esta mezcla seguida por 2 l de 2% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N en cloroformo proporcionó en fracciones tempranas, un compuesto sospechoso de tener etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-oxazol-4-carboxílico (1.23 g, 7%).

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 8.68 (50.4%) min.

45 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.40 (t, J=7.2 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.54 (s, 6H); 4.38 (t, J=7.2 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.03 (d, J=17.4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.02 (d, J=10.4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6.26 (dd, J=17.4, 10.4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7.83 (s, 1H).

LCMS t<sub>R</sub> = 8.00 (210.1 [M+H]<sup>+</sup>, 361.1 [2M+H]) min.

50 Se recuperó de las fracciones anteriores el ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico etil éster deseado (3.13 g, 17%) (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65: 8402-8405 (2000)).

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 5.52 (96.0%) min.

55 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.38 (t, J=7.0 Hz, 3H); 1.57 (s, 6H); 4.35 (q, J=7.0 Hz, 2H); 5.04-5.14 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6.28 (dd, J=18.0, 10.4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7.52 (s, 1H).

LC/MS t<sub>R</sub> = 5.30 (209.1 [M+H]<sup>+</sup>, 417.2 [2M+H]<sup>+</sup>) min.

60 También se recuperó etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico adicional a partir de la columna (3.59 g, 19%) el cual fue de pureza inferior pero aún suficiente para reacción adicional.

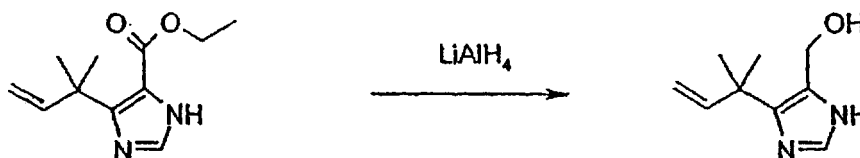
Otro subproducto aislado a partir de una reacción similar (a menor escala) mediante elución adicional de la columna con 5% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N en cloroformo fue un compuesto sospechoso de ser ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico (0.27 g, 9%).

HPLC (245 nm) t<sub>R</sub> = 5.14 (68.9%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.45 (s, 6H); 4.97 (d,  $J=10.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{H}_2$ ); 5.01 (d,  $J=17.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.28 (dd,  $J=17.7, 10.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7.68 (s, 1H).

LCMS  $t_R = 4.72$  (181.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 361.1  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

[5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol



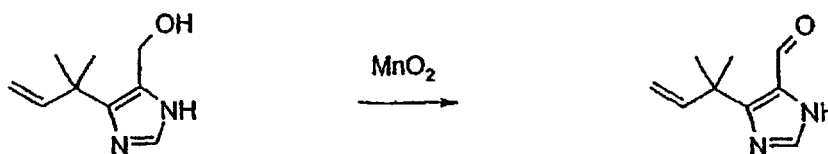
Una solución de etil éster de ácido 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carboxílico (3.13 g, 15.0 mmol) en THF (60 ml) se agregó a gotas a una suspensión de hidruro de aluminio de litio (95% de suspensión, 1.00 g, 25.0 mmol) en THF (40 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se agregó agua hasta que cesó la evolución del gas, la mezcla se agitó durante 10 min, después se filtró a través de un embudo sinterizado. El precipitado se lavó con THF, después con metanol, el filtrado y los lavados se combinaron, evaporaron, después se secaron mediante congelación para proporcionar [5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2.56 g, 102%). Se retiró el agua residual al tratar con azeótropo con cloroformo antes de la reacción adicional. (Ver, Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65: 8402-8405 (2000)).

HPLC (240 nm)  $t_R = 3.94$  (56.8%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.43 (s, 6H); 4.57 (s, 2H); 5.01 (d,  $J=10.05$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5.03 (d,  $J=17.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.10 (dd,  $J=17.7, 10.05$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7.46 (s, 1H).

LC/MS  $t_R = 3.77$  (167.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído



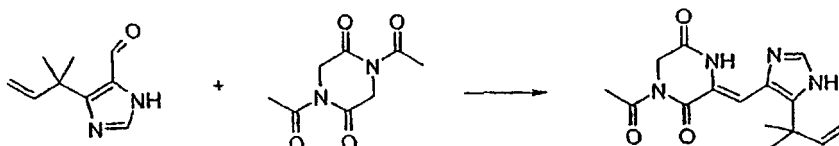
Se agregó dióxido de manganeso (20 g, 0.23 mol) a una solución de [5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-il]-metanol (2.56 g, 0.02 mmol) en acetona (300 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se filtró a través de papel filtro y el residuo se lavó con acetona. El filtrado y los lavados se combinaron y evaporaron para proporcionar 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído (1.82 g, 51%). (Hayashi *et al.*, J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000)).

HPLC (240 nm)  $t_R = 4.08$  (91.5%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.56 (s, 6H); 5.16 (d,  $J=10.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5.19 (d,  $J=17.3$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.22 (dd,  $J=17.3, 10.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7.75 (s, 1H), 10.02 (s, 1H, HCO).

LC/MS  $t_R = 3.75$  (165.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona



A una solución de 5-(1,1-dimetil-alil)-3H-imidazol-4-carbaldehído (1.78 g, 0.01 mmol) en DMF (35 ml) se agregó 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona (8.59 g, 0.04 mol) y la mezcla se evacuó, después se llenó con argón. El proceso de evacuación-llenado se repitió dos veces más, después se agregó carbonato de cesio (3.53 g, 0.01 mol). El proceso de evacuación-llenado se repitió tres veces más, después la mezcla resultante se calentó a  $45^\circ$  durante 5 h. La mezcla de reacción se evaporó parcialmente (calentado bajo alto vacío) hasta un pequeño volumen remanente y la solución

## ES 2 295 695 T3

resultante se agregó a gotas al agua de hielo (50 ml). Se recolectó el precipitado amarillo, se lavó con agua, después se secó en hielo para proporcionar 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.18 g, 36%). (Hayashi, Personal Communication (2001)).

5 HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6.01 (72.6%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.53 (s, 6H); 2.64 (s, 3H); 4.47 (s, 2H); 5.19 (d,  $J=17.3$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5.23 (d,  $J=10.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.06 (dd,  $J=17.3, 10.7$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7.16 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 9.47 (bs, 1H); 12.11 (bs, 1H) [observado ~2% de contaminación de 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona  $\delta$  2.59 (s, 6H); 4.60 (s, 4H)]

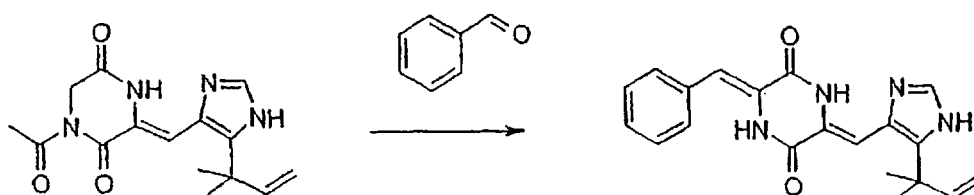
10

LC/MS  $t_R$  = 6.65 (303.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 605.5  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ) min. (n.b. sistema diferente utilizado).

*3-Z-benciliden-6-[5'-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona*

15

20



25

A una solución de 1-acetil-3-[5'-(1,1-dimetil-alil)-1H-imidazol-4'-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (2.91 g, 9.62 mmol) en DMF (70 ml) se agregó benzaldehído (4.89 ml, 48.1 mmol) y la solución se evacuó, después se llenó con argón. El proceso de evacuación-llenado se repitió dos veces más, después se agregó carbonato de cesio (4.70 g, 14.4 mmol). El proceso de evacuación-llenado se repitió tres veces más, después la mezcla resultante se calentó bajo la temperatura gradiente adicional mostrada abajo.

30

Después de un tiempo total de 5 h, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se agregó al agua fría de hielo (500 ml). Se recolectó el precipitado, se lavó con agua (300 ml), después se secó congelando para proporcionar un sólido amarillo (2.80 g). Este material se disolvió en cloroformo (250 ml) se filtró a través de papel filtro y se evaporó para el agua remanente del azeótropo. El precipitado amarillo residual (2.70 g, HPLC (214 nm)  $t_R$  = 7.26 (93.6%) min) se disolvió parcialmente en cloroformo (20 ml), la suspensión se sonicó durante 5 min, después se recolectó el sólido y se secó al aire para proporcionar 3-Z-benciliden-6-[5'-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.82 g, 54%) (Hayashi, Personal Communication (2001)), m.p. 239-240° (dec).

35

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6.80 (1.92) min. 7.33 (95.01%).

40

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.53 (s, 6H); 5.18 (d,  $J=17.6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5.21 (d,  $J=11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.06 (dd,  $J=17.6, 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.99 (s, 1H,  $-\text{C}=\text{C}=\text{CH}$ ); 7.00 (s, 1H,  $-\text{C}=\text{C}=\text{CH}$ ); 7.30-7.50 (m, 5 x ArH); 7.60 (s, H $_{2''}$ ); 8.07 (bs, NH); 9.31 (bs, NH); 12.30 (bs, NH).

45

LC/MS  $t_R$  = 6.22 (349.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , isómero E), 6.73 (349.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 697.4  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , isómero Z) min.

ESMS  $m/z$  349.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 390.3  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

La evaporación de la solución de cloroformo dio 3-Z-benciliden-6-[5'-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona adicional (0.76 g, 29%).

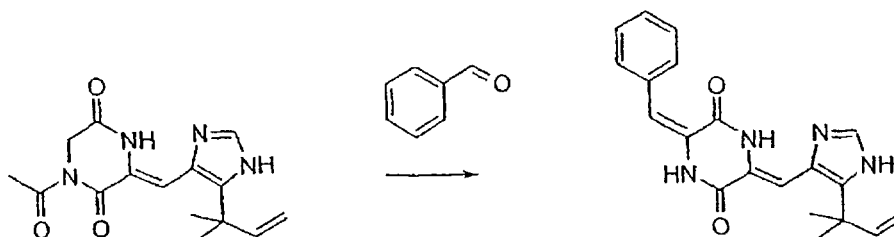
50

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 7.29 (84.5%) min.

*3-E-benciliden-6-[5'-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona*

55

60



65

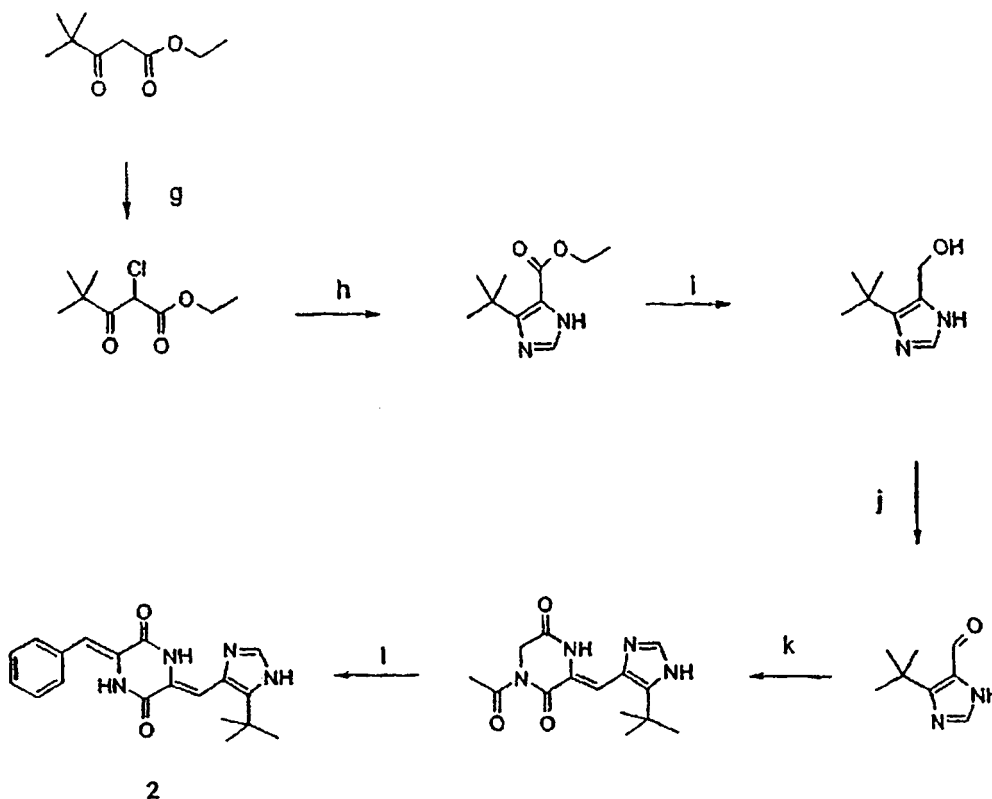
La purificación HPLC preparativa de una muestra cruda del material sintetizado como se proporcionó anteriormente el isómero geométrico 3-E-benciliden-6-[5'-(1,1-dimetilalil)-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen]-piperazin-2,5-diona (1.7 mg).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6.75$  (87.79) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.52 (s, 6H); 5.19 (d,  $J=20.8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5.22 (d,  $J=14.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.05 (dd,  $J=18.0, 10.4$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6.33 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ); 6.90-7.65 (m, 7H).

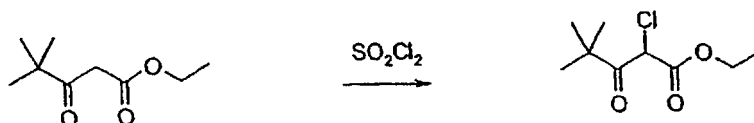
ESMS  $m/z$  349.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 390.4  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

Síntesis de 3-Z-benciliden-6-(5"-ter-butil-1H-imidazol-4"-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2)



Reactivos: g)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ; h)  $\text{H}_2\text{NCHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; i)  $\text{LiAH}_4$ ; j)  $\text{MnO}_2$ ; k) 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; l) benzaldehído,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$

Etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanóico



Se agregó sulfúrico cloruro (14.0 ml, 0.17 mol) a una solución enfriada ( $0^\circ$ ) de etil pivaloilacetato (27.17 g, 0.16 mol) en cloroformo (100 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min, después de lo cual se calentó bajo reflujo durante 2.5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con cloroformo, después se lavó con bicarbonato de sodio, agua, después salmuera.

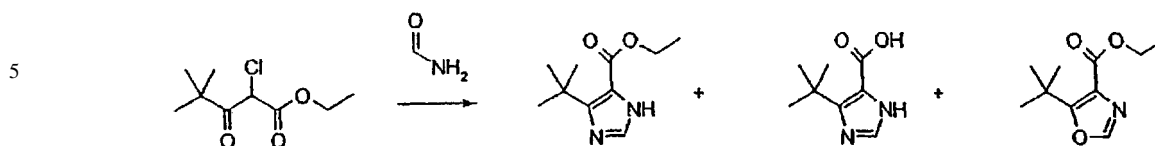
La fase orgánica se secó y se evaporó para proporcionar, como un aceite claro, etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanóico (33.1 g, 102%). (Durant *et al.*, "Aminoalkilimidazoles and Process for their Production" Patente No. GB1341375 (Gran Bretaña 1973)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 8.80$  (92.9%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.27 (s, 9H); 1.29 (t,  $J=7.2$  Hz, 3H); 4.27 (q,  $J=7.2$  Hz, 2H); 5.22 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.8, 26.3, 45.1, 54.5, 62.9, 165.1, 203.6.



*Etil éster de ácido 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carboxílico*

10 Una solución de etil éster de ácido 2-cloro-4,4-dimetil-3-oxo-pentanóico (25.0 g, 0.12 mol) en formamida (47.5 ml) y agua (2.5 ml) se agitó, después se colocó en viales de 15 x 18. Todos los viales se sellaron y después se calentaron a 150° durante 3.5 h. Los viales se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después se agregó agua (20 ml) y la mezcla se extrajo exhaustivamente con cloroformo. El cloroformo se retiró para dar una solución de formamida concentrada (22.2 g) la cual se agregó a una columna de sílice rápida (6 cm de diámetro, 12 cm de altura) envasada en 1% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N en cloroformo. La elución de la columna con 2.5 l de esta mezcla seguido de 1 l de MeOH 2%/Et<sub>3</sub>N 1% en cloroformo sí en las primeras fracciones, un producto sospechoso de ser etil éster de ácido 5-ter-butil-oxazol-4-carboxílico (6.3 g, 26%).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 8.77 min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.41 (t, J=7.2 Hz, 3H); 1.43 (s, 9H); 4.40 (q, J=7.2 Hz, 2H); 7.81 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  14.1, 28.8, 32.5, 61.3, 136.9, 149.9, 156.4, 158.3.

ESMS m/z 198.3 [M+H]<sup>+</sup>, 239.3 [M+CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

LC/MS  $t_R$  = 7.97 (198.1 [M+H]<sup>+</sup>) min.

Se recuperó de las fracciones anteriores etil éster de ácido 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carboxílico (6.20 g, 26%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production" Patente No. GB1341375 (Gran Bretaña, 1973)).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 5.41 (93.7%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.38 (t, J=7.0 Hz, 3H); 1.47 (s, 9H); 4.36 (q, J=7.2 Hz, 2H); 7.54 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13.7, 28.8, 32.0, 59.8, 124.2, 133.3, 149.2, 162.6.

ESMS m/z 197.3 [M+H]<sup>+</sup>, 238.3 [M+CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

La elución adicional de la columna con 1 l de 5% de MeOH/1% de Et<sub>3</sub>N dio un compuesto sospechoso de ser ácido 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carboxílico (0.50 g, 2%).

HPLC (245 nm)  $t_R$  = 4.68 (83.1%) min.

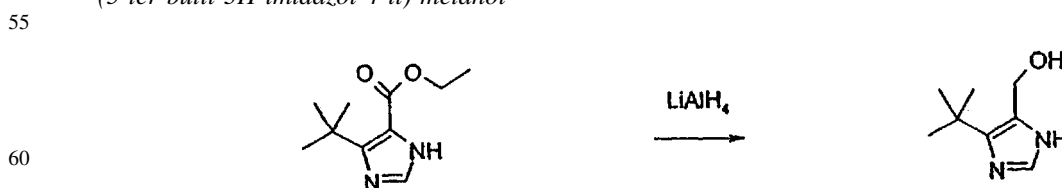
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  1.36 (s, 9H); 7.69 (s, 1H)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.37 (s, 9H); 7.74 (s, 1H)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>SO)  $\delta$  1.28 (s, 9H); 7.68 (s, 1H)

ESMS m/z 169.2 [M+H]<sup>+</sup>, 210.4 [M+CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

(5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol



Una solución de etil éster de ácido 5-ter-butil-3-imidazol-4-carboxílico (3.30 g, 16.8 mmol) en THF (60 ml) se agregó a gotas a una suspensión de hidruro de aluminio de litio (95% de suspensión, 0.89 g, 22.2 mmol) en THF (40 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se agregó agua hasta que la evolución del gas cesó, la mezcla se agitó durante 10 min, después se filtró a través de un embudo sinterizado. El precipitado se lavó con THF, después con metanol, el filtrado y los lavados se combinaron y evaporaron. El residuo se secó congelando durante

## ES 2 295 695 T3

la noche para producir, como un sólido blanco (5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol (2.71 g, 105%). (Durant *et al.*, "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production" Patente No. GB1341375 (Gran Bretaña, 1973)).

HPLC (240 nm)  $t_R = 3.70$  (67.4%) min.

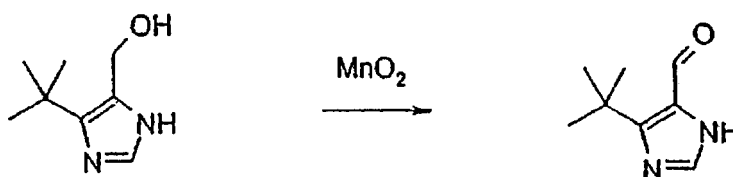
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1.36 (s, 9H); 4.62 (s, 2H); 7.43 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  31.1, 33.0, 57.9, 131.4, 133.9, 140.8.

LC/MS  $t_R = 3.41$  (155.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

Este material se utilizó sin purificación adicional.

*5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído*



Se agregó dióxido de manganeso (30 g, 0.35 mmol) a una solución heterogénea de (5-ter-butil-3H-imidazol-4-il)-metanol (4.97 g, 0.03 mmol) en acetona (700 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celita y la almohadilla se lavó con acetona. El filtrado y los lavados se combinaron y evaporaron. El residuo se trituró con éter para proporcionar, como un sólido sin color, 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído (2.50 g, 51%). (Hayashi Personal Communication (2000)).

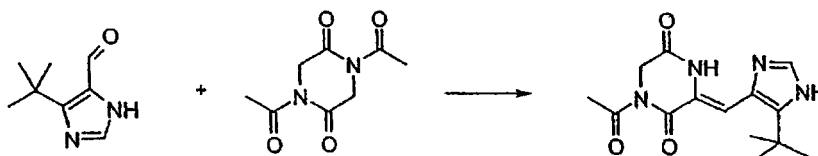
HPLC (240 nm)  $t_R = 3.71$  (89.3%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.48 (s, 9H); 7.67 (s, 1H); 10.06 (s, 1H).

LC/MS  $t_R = 3.38$  (153.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

La evaporación del filtrado a partir de la trituración dio 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído adicional (1.88 g, 38%).

*1-Acetil-3-(5'-ter-butil-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona*



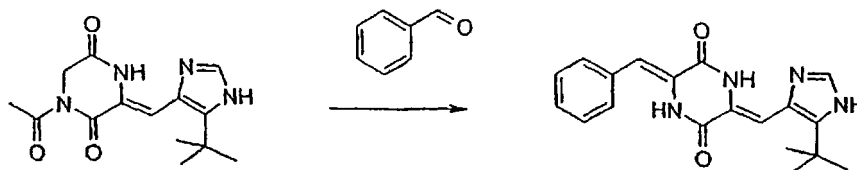
A una solución de 5-ter-butil-3H-imidazol-4-carbaldehído (2.50 g, 164.4 mmol) en DMF (50 ml) se agregó 1,4-diacetil-piperazin-2,5-diona (6.50 g, 32.8 mmol) y la solución se evacuó, después se llenó con argón. El proceso de evacuación-llenado se repitió dos veces más, después se agregó carbonato de cesio (5.35 g, 16.4 mmol). El proceso de evacuación-llenado se repitió tres veces más, después la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se evaporó parcialmente (calor y alto vacío) hasta que permaneció un pequeño volumen y la solución resultante se agregó a gotas al agua (100 ml). Se recolectó el precipitado amarillo, después se secó congelando para producir 1-acetil-3-(5'-ter-butil-1H-imidazol-4'-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2.24 g, 47%). (Hayashi, Personal Communication (2000)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 5.54$  (94.4%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.47 (s, 9H); 2.65 (s, 3H); 4.47 (s, 2H); 7.19 (s, 1H); 7.57 (s, 1H); 9.26 (s, 1H); 12.14 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  27.3, 30.8, 32.1, 46.5, 110.0, 123.2, 131.4, 133.2, 141.7, 160.7, 162.8, 173.0.

LC/MS  $t_R = 5.16$  (291.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 581.6  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ) min.

*3-Z-Benciliden-6-(5''-ter-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona*

A una solución de 1-acetil-3-(5''-ter-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (2.43 g, 8.37 mmol) en DMF (55 ml) se agregó benzaldehído (4.26 ml, 41.9 mmol) y la solución se evacuó, después se llenó con nitrógeno. El proceso de evacuación-llenado se repitió dos veces más, después se agregó carbonato de cesio (4.09 g, 12.6 mmol). El proceso de evacuación-llenado se repitió tres veces más, después la mezcla resultante se calentó bajo la temperatura gradiente como se muestra abajo. Después de un tiempo total de 5 h la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se agregó al agua de hielo (400 ml). Se recolectó el precipitado, se lavó con agua, después de secó congelando para proporcionar un sólido amarillo (2.57 g, HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6.83 (83.1%) min). Este material se disolvió en cloroformo (100 ml) y se evaporó hasta que el azeótropo permaneció en el agua, dando como resultado un aceite marrón. Este se disolvió en cloroformo (20 ml) y se enfrió en hielo. Después de 90 minutos se recolectó el precipitado amarillo y se secó al aire para proporcionar 3-Z-benciliden-6-(5''-ter-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona (1.59 g, 56%). (Hayashi, Personal Communication (2000)).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6.38 (2.1%), 6.80 (95.2) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.46 (s, 9H); 7.01 (s, 1H, -C-C=CH); 7.03 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30-7.50 (m, 5H, Ar); 7.60 (s, 1H); 8.09 (bs, NH); 9.51 (bs, NH); 12.40 (bs, NH).

LC/MS  $t_R$  = 5.84 (337.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , isómero E), 6.25 (337.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 673.4  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , isómero Z) min.

ESMS  $m/z$  337.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 378.1  $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

La evaporación de la solución de cloroformo dio 3-Z-benciliden-6-(5''-ter-butil-1H-imidazol-4''-Z-ilmetilen)-piperazin-2,5-diona adicional (0.82 g, 29%). HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6.82 (70.6%) min.

*Experimentación General*

Bicarbonato de sodio se refiere a un 5% de la solución.

Los solventes orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio a menos que se establezca de otro modo.

*Condiciones Analíticas**Condiciones NMR*

El análisis de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) se llevó a cabo en una máquina de NMR de la Unidad Varian Inova 400 MHz. Las muestras se corrieron en cloroformo deuterizado que contiene 0.1% de TMS (a menos que se especifique de otro modo). Los cambios químicos (ppm) se referenciaron con relación a TMS (0.00 ppm) o  $\text{CH}_3\text{OH}$  a 3.30 ppm para correr las muestras  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Las constantes de acoplamiento se expresaron en hertz (Hz).

*Condiciones HPLC Analíticas*

Condiciones del sistema 6:

RP-HPLC se hizo en una columna de 50 x 4.6 mm Raini Microsorb-MV C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100 Å).

Amortiguador A: 0.1% de TFA acuoso

Amortiguador B: 0.1% de TFA en 90% de MeCN acuoso

Gradiente: 0-100% de Amortiguador B en 11 min

Tasa de flujo: 1.5 ml/min

## ES 2 295 695 T3

### *Condiciones LCMS*

LCMS se corrió sobre un instrumento Perkin-Elmer Sciex API-100

5 Condiciones LC:

#### Análisis HPLC de Fase Inversa

10       Columna:           Monitor 5  $\mu$ m C18 50x4.6 mm  
      Solvente A:       0.1% de TFA en agua  
      Solvente B:       0.085% de TFA en 90% de MeCN acuoso  
15       Gradiente:       0-100% B en 11.0 min  
      Tasa de flujo:     1.5 ml/min  
      Longitud de onda: 214 nm  
20

#### Condiciones MS:

      Fuente de iones: Rocío de iones  
25       Detección: contador de ión  
      Tasa de flujo para el espectrómetro de masa: 300  $\mu$ l/min después de separar a partir de la columna (1.5 ml/min).

### *Condiciones ESMS*

30 ESMS se hizo sobre un Perkin Elmer/Sciex-API III LC/MS/MS utilizando una entrada de electropulverización.

      Solvente: 0.1% de AcOH en 60% de MeCN acuoso  
35       Tasa de flujo: 25  $\mu$ l/min  
      electropulverización: 5000 V  
      Placa de orificio: 55 V  
40       Tiempo de adquisición: 2.30 min  
      Rango de exploración: 100-1000 amu/z  
      Tamaño de la etapa de exploración: 0.2 amu/z  
45

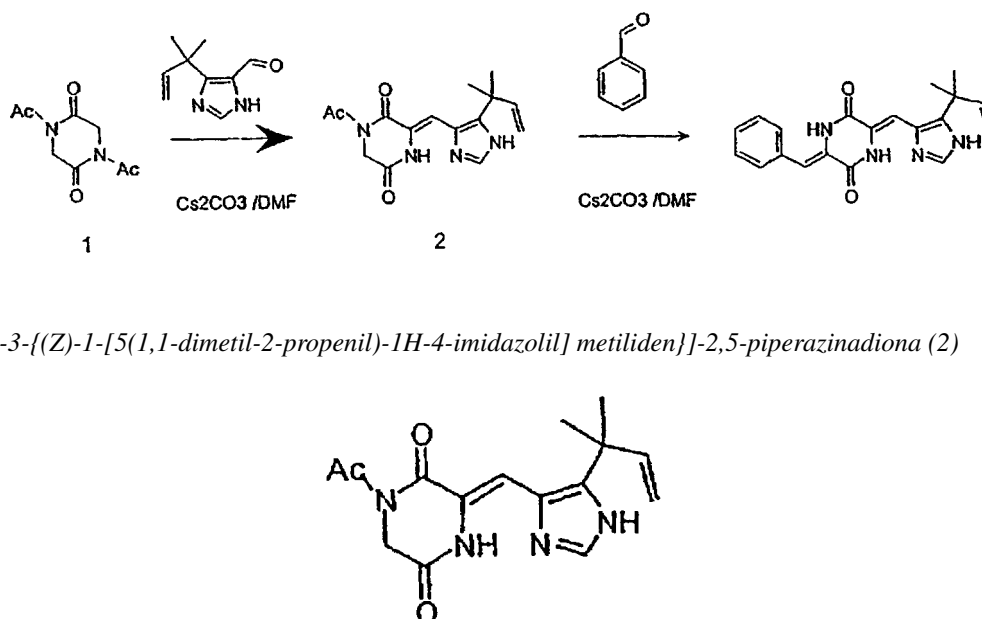
#### *Condiciones de Purificación RP-HPLC Preparatorias*

      La purificación de HPLC de fase inversa se llevó a cabo utilizando Nebula con la columna Waters XterraMS (19x50 mm, 5  $\mu$ m, C18) utilizando las siguientes condiciones:

50       Solvente A:       0.1% de TFA acuoso  
      Solvente B:       0.1% de TFA en 90% de MeCN acuoso  
55       Gradiente:       5-95%B en 4 min  
      Tasa de flujo:     20 ml/min  
      Longitud de onda: 214 nm  
60

      Las abreviaturas son como sigue: br s: singlete amplio; BuLi: litio de n-butilo; d: doblete; DBU: 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno; ESMS: espectrometría de masa de electropulverización; HCl: ácido clorhídrico; HPLC: cromatografía líquida de alta prestación; LCMS: espectrometría de masa de cromatografía líquida; LD: diisopropilamida de litio; M+: ión molecular; m: multiplete; MeCN: acetonitrilo; M: espectrometría de masa; MW: peso molecular; NMR: resonancia magnética nuclear; q: cuarteto; s: singlete; : triplete;  $t_R$ : tiempo de retención; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano  
65

## Procedimiento Detallado para Síntesis de Deshidrofenilahistina



A una solución de 5-(1,1-dimetil-2-propenil) imidazol-4-carboxaldehído (100 mg, 0.609 mmol) en DMF (2 ml) se agregó el compuesto 1 (241 mg, 1.22 mmol) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para remover el oxígeno y llenado con Ar, seguido mediante la adición de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (198 mg, 0.609 mmol) y se preparó de nuevo el proceso de evacuación-llenado. Se prefiere el retiro del oxígeno debido a que tal retiro se cree que disminuye la oxidación de alfa-carbón en la posición 6 del anillo de dicetopiperazina. La mezcla resultante se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Después se retiró el solvente mediante evaporación, el residuo se disolvió en la mezcla de EtOAc y 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y la fase orgánica se lavó de nuevo con 10% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y NaCl saturado tres veces, secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y concentrado *in vacuo*. El aceite residual se purificó mediante cromatografía de columna sobre sílice utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0 a 50:1) como un eluyente para dar 60 mg (33%) de un sólido amarillo pálido 2.

## Deshidrofenilahistina

A una solución de 2 (30 mg, 0.099 mmol) en DMF (0.8 ml) se agregó benzaldehído (51  $\mu\text{l}$ , 0.496 mmol, 5 eq) y la solución se evacuó repetidamente en un corto tiempo para remover el oxígeno y llenar con Ar, seguido por la adición de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 eq) y el proceso de evacuación-llenado se repitió de nuevo. La mezcla resultante se calentó durante 2.5 h a 80°C. (La temperatura debe incrementarse lentamente. El calentamiento rápido incrementa la producción del isómero E en el residuo de bencilideno). Después de que se retiró el solvente mediante evaporación, el residuo se disolvió en EtOAc, lavado con agua dos veces y NaCl saturado tres veces, secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y concentrado *in vacuo*. Sobre TLC utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (10:1), se puede observar una mancha con luminiscencia verde-amarillo brillante a 365 nm UV. La pureza de este producto crudo fue de más de 75% a partir del análisis HPLC. El residuo resultante se disolvió en 90% de MeOH acuoso y se aplicó a la columna HPLC de fase inversa (YMC-Pack, ODS-AM, 20 x 250 mm) y se eluyó utilizando un gradiente lineal desde 70 hasta 74% de MeOH en agua durante 16 min a una tasa de flujo de 12 ml/min y la fracción deseada se recolectó y concentró mediante evaporación para dar 19.7 mg (60%), aunque las producciones no se optimizaron para cada etapa, de deshidrofenilahistina coloreada de amarillo.

## Ejemplo 4

## Características Biológicas de la Deshidrofenilahistina y Análogos de Deshidrofenilahistina

## A. Evaluación Biológica

Las características biológicas de tBu-deshidrofenilahistina y deshidrofenilahistina sintetizadas se evaluaron tanto en células de colon humanas HT29 como en células de adenocarcinoma prostático PC-3.

HT-29 (ATCC HTB-38) un adenocarcinoma colorectal humano se mantuvo en un medio completo de McCoy (medio McCoy 5A con L-glutamina y 25 mM de HEPES complementado con 10% de FBS, 1 mM de piruvato de Na, 1X NEAA, 2 mM de L-glutamina y Pen/Strep a 100 IU/ml y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente). PC-3 (ATCC CRL-1435)

un adenocarcinoma de próstata humano, se mantuvo en un medio completo F12K (medio F12K complementado con 10% de FBS; 2 mM de Glutamina; 1% de HEPES; y Pen/Strep a 100 IU/ml y 100  $\mu$ g/ml respectivamente). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en un 95% de incubador humidificado.

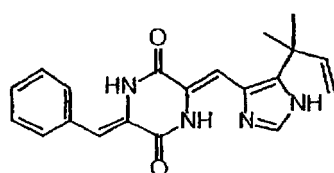
Para los ensayos de citotoxicidad del tumor se sembraron células de HT-29 o PC-3 a 5,000 células/pozo en 90  $\mu$ l del medio completo en una placa de cultivo de tejido inferior claro fortificado con negro Corning 3904 y la placa fue incubada durante la noche para permitir a las células establecerse y entrar a la fase log de crecimiento. Se prepararon las soluciones por lote de 20 nM de deshidrofenilalhistina y tBu-deshidrofenilalhistina en 100% DMSO y almacenadas a -20°C. Disoluciones serie concentradas 10x de los dos compuestos fueron preparadas en un medio de cultivo apropiado para las concentraciones finales que varían desde 20 x 10<sup>-5</sup> M hasta 20 x 10<sup>-10</sup> M. Se agregaron diez volúmenes  $\mu$ l de las diluciones en serie 10X a los pozos de prueba por triplicado y las placas regresaron al incubador durante 48 horas. La concentración final del DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

Después de las 48 horas de la exposición de la droga 10  $\mu$ l de 0.2 mg/ml de resazurin (obtenido de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en Mg<sup>2+</sup>, se agregó PBS libre de Ca<sup>2+</sup> a cada pozo y las placas se regresaron al incubador durante 3-4 horas. Las placas se retiraron y se midió la fluorescencia del resazurin utilizando 530 nm de excitación y 590 nm de emisión de los filtros en un fluorímetro de fusión (Packard Instruments). La tintura de resazurin sin las células se utilizó para determinar el trasfondo, el cual se sustrajo a partir de los datos para todos los pozos experimentales. Se analizaron los datos utilizando el software Prism (GraphPad Software). Los datos se normalizaron para el promedio de las células tratadas con únicamente el medio (100% de crecimiento celular) y los valores EC<sub>50</sub> se determinaron utilizando un algoritmo de adaptación de la curva de respuesta de la dosis sigmoidal estándar.

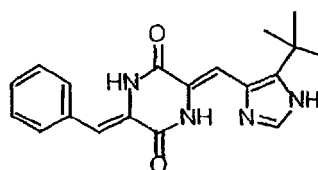
Como se indica en la Tabla 1 de abajo, tBu-deshidrofenilalhistina demuestra aproximadamente una actividad citotóxica 4 veces mayor en comparación con la deshidrofenilalhistina.

TABLA 1

*Efecto Citotóxico de deshidrofenilalhistina y derivado*



Deshidrofenilalhistina



tBu-deshidrofenilalhistina

célula	EC <sub>50</sub> (nM)	
	$\Delta$ PLH	tBu- $\Delta$ PLH
HT29	48	13
PC-3	5.4	1.0

#### B. Estudio de la Estructura y Actividad de los Derivados de Deshidrofenilalhistina

Los efectos citotóxicos de la fenilalhistina, deshidrofenilalhistina y varios derivados de deshidrofenilalhistina se examinaron en células de leucemia de murino P388, células de colon humanas HT-29 y células de adenocarcinoma prostático PC-3.

Como se explicó anteriormente, HT-29 un adenocarcinoma colorectal humano se mantuvo en el medio completo de McCoy (medio de McCoy 5A con L-glutamina y 25 mM de HEPES complementado con 10% de FBS, 1 mM de piruvato de Na, 1X de NEAA, 2 mM de L-glutamina y Pen/Strep a 100 IU/ml y 100  $\mu$ g/ml respectivamente). PC-3, un adenocarcinoma de próstata humano, se mantuvo en un medio completo F12K (medio F12K complementado con 10% de FBS; 2 mM de Glutamina; 1% de HEPES; y Pen/Strep a 100 IU/ml y 100  $\mu$ g/ml respectivamente). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en un de incubador humidificado al 95%.

Para los ensayos de citotoxicidad del tumor se sembraron células de HT-29 o PC-3 a 5,000 células/pozo en 90  $\mu$ l del medio completo en una placa de cultivo de tejido inferior claro fortificado con negro Corning 3904 y la placa fue incubada durante la noche para permitir a las células establecerse y entrar a la fase log de crecimiento. Se prepararon las soluciones por lote de 20 nM de deshidrofenilalhistina y tBu-deshidrofenilalhistina en 100%

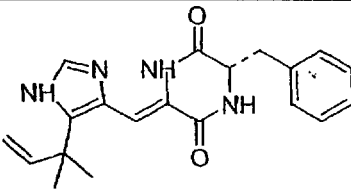
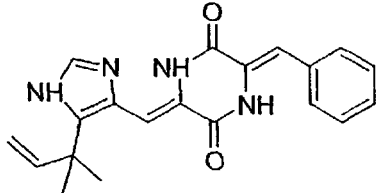
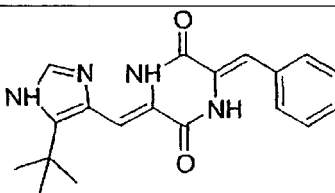
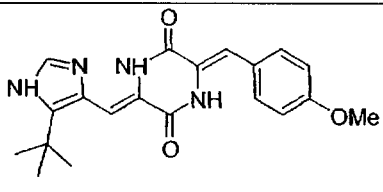
de DMSO y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones en serie se concentraron 10X de los dos compuestos que se prepararon en el medio de cultivo apropiado para las concentraciones finales que varían desde  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$  hasta  $20 \times 10^{-10} \text{ M}$ . Se agregaron diez volúmenes  $\mu\text{l}$  de las diluciones en serie 10X a los pozos de prueba por triplicado y las placas regresaron al incubador durante 48 horas. La concentración final del DMSO fue 0.25% en todas las muestras.

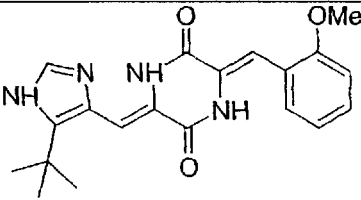
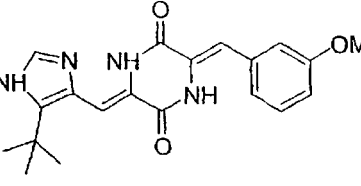
Después de las 48 horas de la exposición de la droga  $10 \mu\text{l}$  de 0.2 mg/ml de resazurin (obtenido de Sigma-Aldrich Chemical Co.) en  $\text{Mg}^{2+}$ , se agregó PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  a cada pozo y las placas se regresaron al incubador durante 3-4 horas. Las placas se retiraron y se midió la fluorescencia del resazurin utilizando 530 nm de excitación y 590 nm de emisión de los filtros en un fluorímetro de fusión (Packard Instruments). La tintura de resazurin sin las células se utilizó para determinar el trasfondo, el cual se sustrajo a partir de los datos para todos los pozos experimentales. Se analizaron los datos utilizando el software Prism (GraphPad Software). Los datos se normalizaron para el promedio de las células tratadas con únicamente el medio (100% de crecimiento celular) y los valores  $\text{EC}_{50}$  se determinaron utilizando un algoritmo de adaptación de la curva de respuesta de la dosis sigmoidal estándar.

Los valores  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{IC}_{50}$  de la fenilhistina, deshidrofenilhistina y derivados de deshidrofenilhistina se resumen en la Tabla 2 de abajo.

TABLA 2

*Estudio SAR de fenilhistina o deshidrofenilhistina y de los derivados de deshidrofenilhistina*

Compuestos	Estructura	$\text{EC}_{50}$ (nM)		$\text{IC}_{50}$ (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-)-Fenilhistina		1600	n.t.	$833 \pm 153$ (n=5)
KPU-1 $\square$ PLH		48	4.7	$36 \pm 12.8$ (n=5)
KPU-2 tBu- $\square$ PLH		13	1	$31.8 \pm 5.0$ (n=5)
KPU-6 tBu- $\square$ PLH-p-OMe		>2000	n.t.	$933 \pm 5457$ (n=3)

KPU-8 tBu-□PLH-o-OMe		89		315±137 (n=4)
KPU-9 tBu-□PLH-M-OMe		31		20.8±68 (n=4)
Colchicina	—			208±68 (n=4)

Las modificaciones al anillo de fenilo tienen un efecto significativo de las actividades citotóxicas. En comparación con la actividad de tBu-deshidrofenilhistina (#6), la actividad del grupo metoxi en la posición meta (KPU-9) exhibió actividad más alta que los otros derivados con un  $IC_{50}$  de  $20.8 \pm 3.3$  nM en células P388. El derivado KPU-9 también exhibió citotoxicidad en las células HT-29 ( $EC_{50}$  31 nM). La deshidrofenilhistina, tBu-deshidrofenilhistina (KPU-2) y el derivado de KPU-9 todos exhibieron citotoxicidad en las células P388.

#### C. Estudio de la Estructura y Actividad de los Derivados de Deshidrofenilhistina Adicionales

Los efectos citotóxicos de la fenilhistina, deshidrofenilhistina y varios derivados adicionales de la deshidrofenilhistina se examinaron en células de colon humanas HT-29 y células de adenocarcinoma prostático PC-3 utilizando la metodología anteriormente descrita.

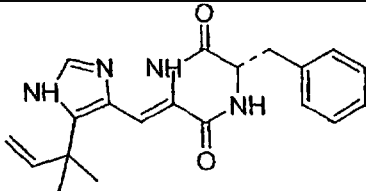
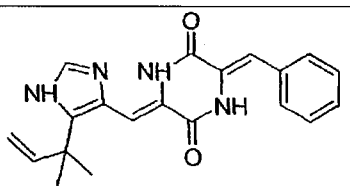
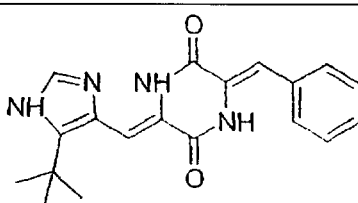
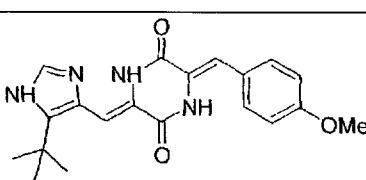
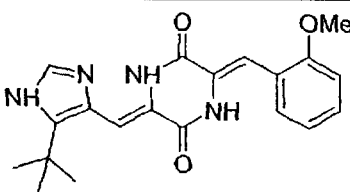
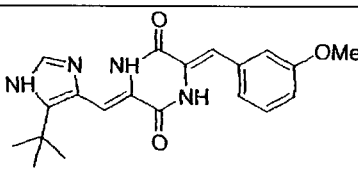
(Tabla pasa a página siguiente)



# ES 2 295 695 T3

TABLA 3

*Estudio SAR de fenilhistina, deshidrofenilhistina y de derivados de deshidrofenilhistina adicionales*

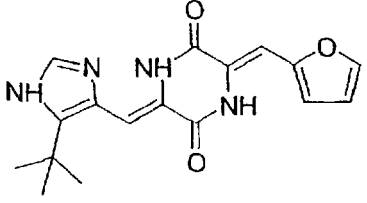
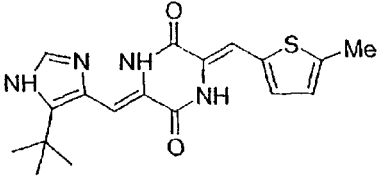
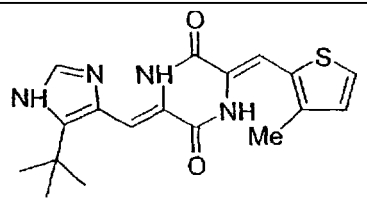
Compuesto	Estructura	Forma de sal	P.M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
(-)-Fenilhistina		-	350.41	1600	n.t
KPU-1 □PLH		-	348.40	48	4.7
KPU-2 tBu-□PLH		-	336.39	13	1
KPU-6 tBu-□PLH-o-OMe		-	366.41	>2000	n.t.
KPU-8 tBu-□PLH-o-OMe		-	366.41	89	
KPU-9 tBu-□PLH-m-OMe		-	366.41	31	

Compuesto	Estructura	Forma de sal	P.M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-14 tBu-□PLH-2,3- diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	610	96%
KPU-12 tBu-□PLH-2,4- diOMe		-	396.44	4980	
KPU-10 tBu-□PLH-2,5- diOMe		-	396.44	1350	
KPU-15 tBu-□PLH-2,6- diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu-□PLH-3,4- diOMe		-	396.44	2130	
KPU-16 tBu-□PLH-3,5- diOMe		-	396.44	42	82%

ES 2 295 695 T3

Compuesto	Estructura	Forma de sal	P.M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-11 tBu-□PLH-3,4,5-triOMe		-	426.47	>20μM	
KPU-17 tBu-□PLH-2,3,4-triOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu-□PLH-o-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	42	100%
KPU-19 tBu-□PLH-m-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	20	98%
KPU-20 tBu-□PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-□PLH-2Cl-5-NO <sub>2</sub>		TFA	415.83 529.85 (+TFA)	51	100%

Compuesto	Estructura	Forma de sal	P.M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-22 tBu-□PLH-3,4- metilen-dioxi		TFA	380.40 494.42 (+TFA)	82	95%
KPU-23 tBu-□PLH-2-OH- 3-Ome (o-vanilina)		TFA	382.41 496.44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-□PLH- ciclizado-3-MeO		TFA	364.40 487.42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-□PLH-4- piridilo		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	544	98%
KPU-28 tBu-□PLH-2- piridilo		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	>20μM	99%

Compuesto	Estructura	Forma de sal	P.M.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-26 tBu-□PLH-2-furilo		TFA	326.35 440.37 (+TFA)	600	88%
KPU-27 tBu-□PLH-5-Me- 2-tienilo		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	80	97%
KPU-29 tBu-□PLH-3-Me- 2-tienilo		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	44	81%

### Ejemplo 5

#### Otros Análogos de Deshidrofenilahistina

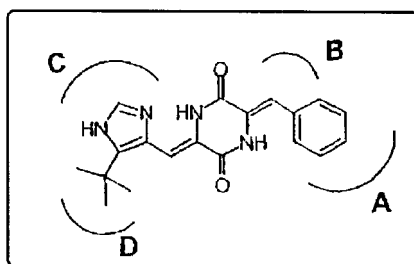
##### A. Modificaciones de la síntesis de los derivados de deshidrofenilahistina

Se sintetizaron otros derivados de deshidrofenilahistina utilizando las técnicas anteriores solas o junto con otras técnicas de síntesis orgánicas bien conocidas.

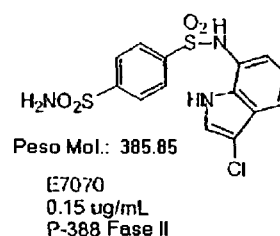
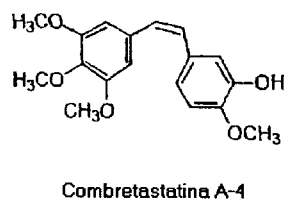
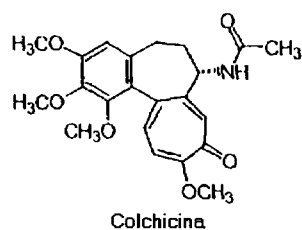
Las modificaciones de la diacildicetopiperazina y el primer y segundo aldehídos involucrados en el método de síntesis varían de acuerdo con el derivado deseado para producir. Los derivados sintetizaron que:

- A) modifican el anillo de fenilo y/o introducen otros sistemas de anillo aromático,
- B) alteran la posición del anillo aromático,
- C) alteran el sistema de anillo aromático de imidazol y/o
- D) modifican la posición 5 en el anillo de imidazol.

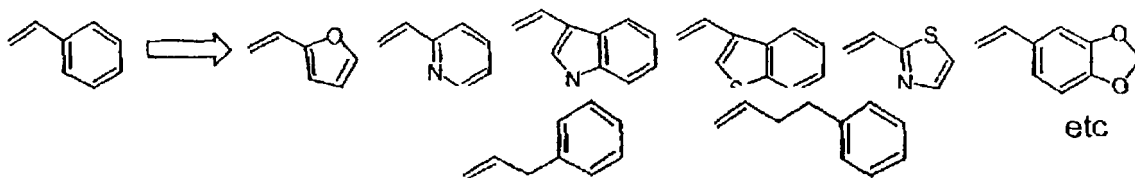
La figura de abajo representa las regiones del compuesto de la deshidrofenilahistina modificadas para producir los derivados de la deshidrofenilahistina. Se describen ejemplos no limitantes de las modificaciones y en base a esta descripción pueden entenderse por aquellos expertos en la técnica.



- A 1) Modificación del anillo de fenilo en base a la estructura de los compuestos de anti-tubulina conocidos Alquilo, Halógeno, Alcoxi, Acetilo, Sulfonamida, Amino, Hidroxilo, Nitro, etc.

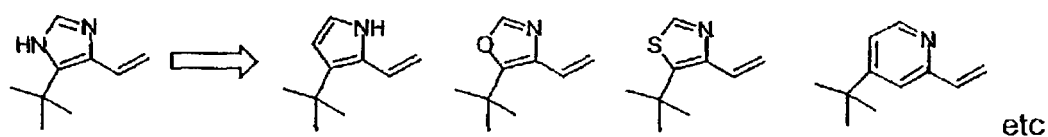


- 2) Introducción de otros sistemas de anillo aromático



- B Posición del anillo aromático

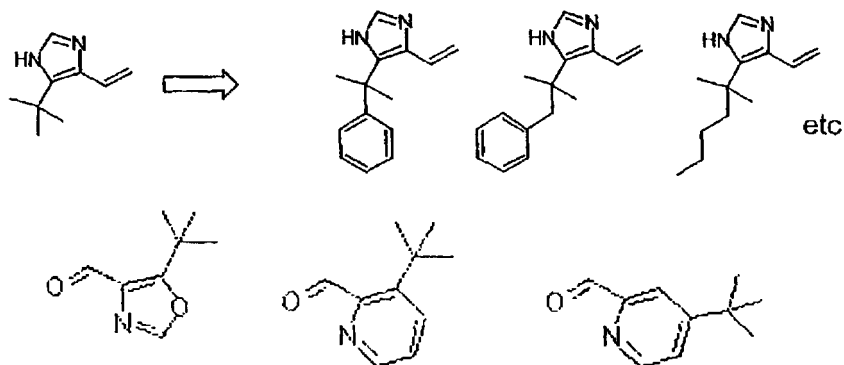
- C Cambio a los otros sistemas de anillo



- D Modificación adicional de la posición 5 en el anillo de imidazol

## ES 2 295 695 T3

Expandiendo las modificaciones anteriores para el compuesto de la deshidrofenilhistina, los derivados del compuesto pueden incluir las siguientes sustituciones en al anillo de fenilo (A):  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2(-\text{SO}_2\text{NR}_1\text{R}_2)$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{CONH}_2(-\text{CONR}_1\text{R}_2)$ ,  $-\text{COOH}$ , etc. Otros sistemas de anillo (C) también pueden incluir lo siguiente:



### B. Ejemplos de derivados de la deshidrofenilhistina sintetizados

Se describen en la Tabla 4 ejemplos adicionales de los derivados de la deshidrofenilhistina sintetizados.

TABLA 4  
Derivados sintetizados adicionales de deshidrofenilhistina

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-20 tBu-□PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)
KPU-30 tBu-□PLH-2,3-		TFA	380.40 494.42

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
metilendioxi			(+TFA)
KPU-31 tBu-□PLH-3-piridilo		2 TFA	337.38 565.42 (+2TFA)
KPU-32 tBu-□PLH-o-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-33 Tbu-□PLH-3-Me-2- piridilo		2 TFA	351.40 579.45 (+2TFA)
KPU-34 tBu-□PLH-4-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-35 tBu-□PLH-m-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-36 tBu-□PLH-5-Me-4-im		2 TFA	356.42 584.47



Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
			(+2TFA)
KPU-37 tBu-□PLH-o-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-38 tBu-□PLH-m-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-39 tBu-□PLH-p-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-40 tBu-□PLH-p-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-41 tBu-□PLH-m-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-42 tBu-□PLH-3-tienilo		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-43 tBu-□PLH-p-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-44 tBu-□PLH-m-EtO		TFA	380.44 494.46 (+TFA)
KPU-45 tBu-□PLH-2,4,6-TriOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)
KPU-46 tBu-□PLH-o-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-47 tBu-□PLH-m-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-48 tBu-□PLH-p-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-49 tBu-□PLH-m-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-50 tBu-□PLH-o-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-51 tBu-□PLH-m-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-52 tBu-□PLH-2-NO <sub>2</sub> -5-Cl		TFA	415.83 529.85 (+TFA)
KPU-53 tBu-□PLH-o-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-54 tBu-□PLH-2-OH-5-Ome		TFA	382.41 496.44 (+TFA)

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-55 tBu-□PLH-3-furanilo		TFA	326.35 440.37 (+TFA)
KPU-56 tBu-□PLH-2-OH-5-Br		TFA	431.28 545.31 (+TFA)
KPU-57 tBu-□PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-58 tBu-□PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-59 tBu-□PLH-2-OH-5-Cl		TFA	386.83 (+TFA) 500.86
KPU-60 tBu-□PLH-5-Me-2-furanilo		TFA	340.38 454.40 (+TFA)

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-61 tBu-□PLH-5-Cl-2-tionilo		TFA	376.86 490.88 (+TFA)
KPU-62 tBu-□PLH-2-tionilo		TFA	342.42 456.44 (+TFA)
KPU-63 tBu-□PLH-N-Me-2- pirrol		TFA	339.39 453.42 (+TFA)
KPU-64 tBu-□PLH-3,5-diCl		TFA	405.27
KPU-65 tBu-□PLH-m-CF <sub>3</sub>		TFA	404.39
KPU-66 tBu-□PLH-1-Naftaleno		TFA	386.44

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-67 tBu-□PLH-2-Naftaleno		TFA	386.44
KPU-68 tBu-□PLH-2,3-diCl		TFA	405.27
KPU-69 tBu-□PLH-m-Vinilo		TFA	362.42
KPU-77 tBu-□PLH-2-F-5-1		TFA	480.28
KPU-79 tBu-□PLH-2-(Metiltio)		TFA	368.45
KPU-80 tBu-□PLH-m-OCF <sub>3</sub>		TFA	420.38

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-81 tBu-□PLH-2-F-5-Ome		TFA	384.38
KPU-82 tBu-□PLH-4-F-3-Ome		TFA	384.38
KPU-83 tBu-□PLH-2-OH-5-tBu		TFA	408.39
KPU-84 tBu-□PLH-ciclohexano		TFA	341.39
KPU-86 tBu-□PLH-2-Me-3-F		TFA	368.39
KPU-87 tBu-□PLH-2-F-5-Me		TFA	368.39

Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-88 tBu-□PLH-2-Cl-6-F		TFA	388.83
KPU-89 tBu-□PLH-2,5-di-F		TFA	372.38
KPU-90 tBu-□PLH-2,3-diMe		TFA	364.38
KPU-91 tBu-□PLH-2,6-diMe		TFA	364.38
KPU-92 tBu-□PLH-2-NO <sub>2</sub> -3-Ome		TFA	411.39
KPU-93 tBu-□PLH-2,5-diMe		TFA	364.38



Compuestos	Estructura	Forma de sal	P.M.
KPU-94 tBu-□PLH-2-NH <sub>2</sub> -3-Ome		TFA	381.399
KPU-96 tBu-□PLH-2-NH <sub>2</sub>		TFA	351.41
KPU-97 tBu-□PLH-m-NH <sub>2</sub>		TFA	351.41

### C. Evaluación de los derivados de deshidrofenilhistina

La evaluación de los derivados anteriormente descritos se valoran de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3. La evaluación adicional de los derivados se extiende a las actividades específicas tales como determinar el efecto de inhibición sobre la proliferación celular, los efectos sobre un mecanismo celular específico (i.e., función de microtúbulo), los efectos de la progresión celular, la evaluación *in vitro* de la actividad antitumoral contra las líneas celulares de cáncer, etc. Se dan abajo algunos protocolos del método de evaluación.

#### 1) Efecto de inhibición de la Proliferación Celular de la Deshidrofenilhistina y Sus Análogos

Dentro de cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos, 100  $\mu$ l de células A-549 derivadas a partir de cáncer de pulmón humano preparados a  $10^5$  células/ml se colocó en un medio de cultivo obtenido mediante la adición de 10% de suero de feto bovino para el medio de cultivo EMEM (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) que tiene un efecto antitumor contra las células A-549 derivadas a partir del cáncer de pulmón humano. La solución de metanol del derivado obtenido mediante los ejemplos listados arriba se agregó a los pozos de la fila predominante, los especímenes se diluyeron mediante el método de dilución de medio log y se agregaron y la placa se incubó en un incubador de gas de dióxido de carbono a 37°C durante 48 horas. El resultado se agregó en porciones de 10  $\mu$ l con el reactivo MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetra-bromuro) (1 mg/ml • PBS), seguido por la incubación en un incubador de gas de dióxido de carbono a 37°C durante 6 horas. El medio de cultivo se desechó y el cristal de los producido en las células se disolvió en 100  $\mu$ l/pozo de dimetilsulfóxido. La absorción ligera de 595 nm se midió entonces con un lector de microplaca. Mediante la comparación de las absorciones ligeras de las células no tratadas para aquellas células tratadas con un espécimen de una concentración conocida, se calculó la concentración del espécimen que inhibió la proliferación celular el 50% (IC<sub>50</sub>).

#### 2. Actividad de inhibición el Ciclo Celular de la Deshidrofenilhistina y Sus Análogos

La cepa celular A431 se deriva del cáncer de pulmón humano. El medio de cultivo EMEM contiene 10% de suero fetal bovino y 1% de la solución aminoácida no esencial de MEM (SIGMA M2025) se utilizaron para incubar células A431 a 37°C en un incubador saturado con 5% de gas de dióxido de carbono y vapor de agua. El espécimen refinado de la deshidrofenilhistina obtenido mediante los métodos anteriores se agregó a las células en la fase de crecimiento log y la progresión del ciclo celular se analizó mediante el citómetro de flujo y observación microscópica.

### Ejemplo 6

#### Relación Estructura-Actividad de los Derivados de la Deshidrofenilhistina Sintetizada (DeshidroPHL)

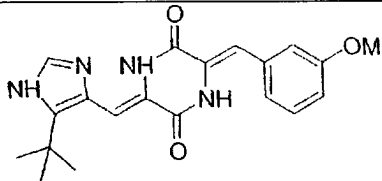
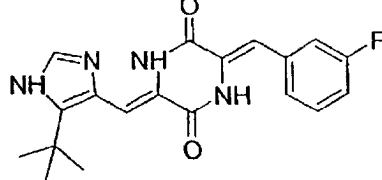
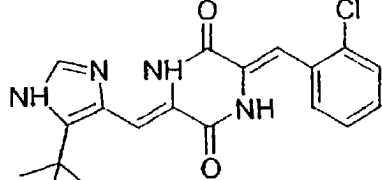
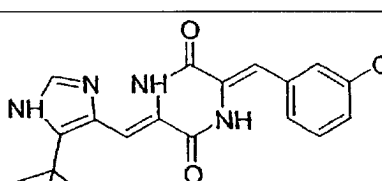
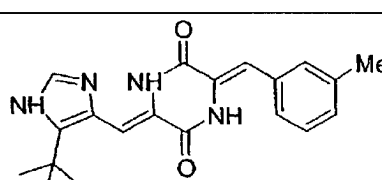
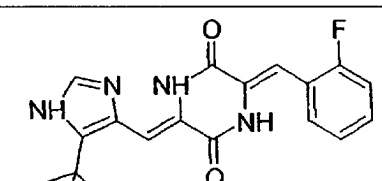
##### 1) Vista general de la síntesis derivativa

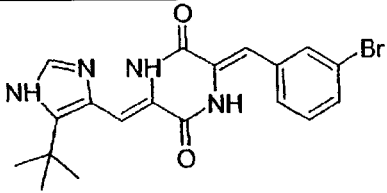
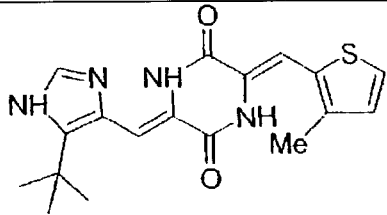
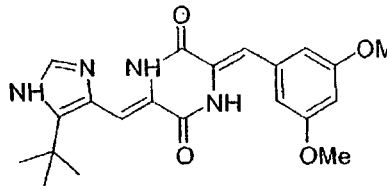
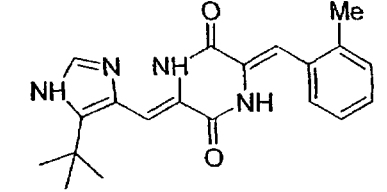
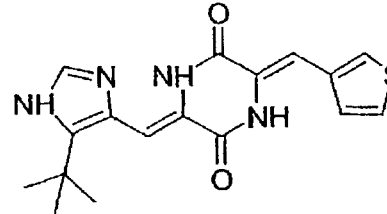
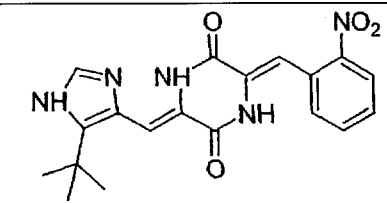
Muchos, pero no todos de los derivados de la deshidroPHL descritos en la presente incluyen una, dos o tres modificaciones en el anillo de fenilo (Figura 5 abajo). Los derivados se sintetizaron mediante los métodos anteriormente

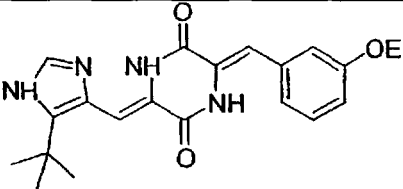
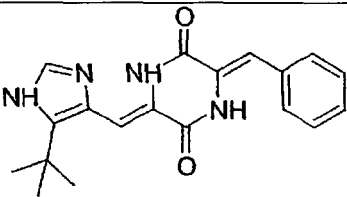
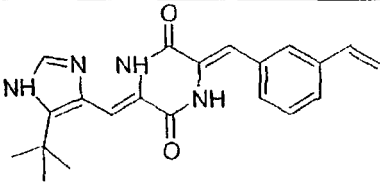
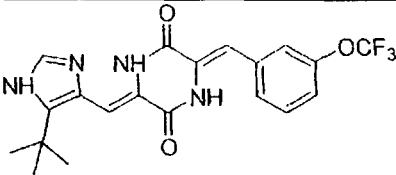
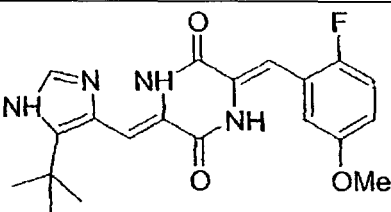
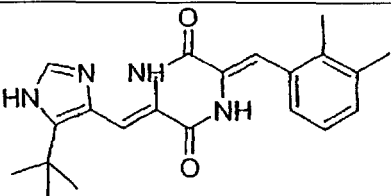
descritos. Como se muestra en la Tabla 5, ciertos compuestos mostraron más actividad citotóxica potente que la deshidroPHL y tBu-deshidroPHL. El compuesto más potente exhibió un valor EC<sub>50</sub> de 3 nM que fue KPU-90. Este valor fue 16 veces y 4 veces mayor que aquel de la deshidroPHL y la tBu-deshidroPHL respectivamente. Estos derivados tienen mono-sustitución en la posición o u m del anillo de fenilo con los átomos de halógeno tales como flúor y cloro o del grupo metilo, vinilo o metoxi. Los derivados con sustituciones para las estructuras de heteroarilo tales como los anillos de naftaleno, tiofeno y furano también producen una actividad potente. KPU-35, 42, 69, 80 y 81 también mostraron actividad mayor que la tBu-deshidroPLH.

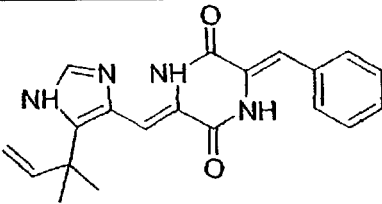
TABLA 5

*Derivados de deshidroPLH potente sintético*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-41		31
KPU-29		44
KPU-16		42
KPU-32		42
KPU-42		54
KPU-46		44

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-44		43
tBu-PLH KPU-2		13
KPU-69		16
KPU-80		13
KPU-81		19
KPU-90		3

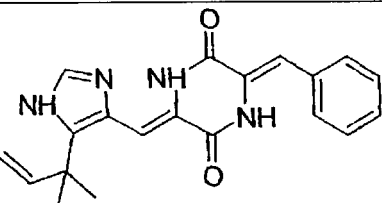
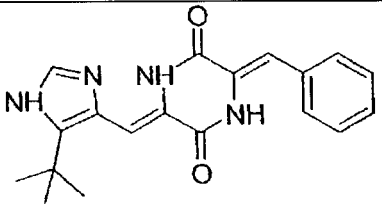
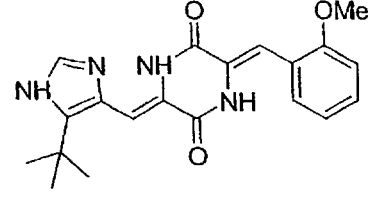
Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
DeshidroPLH (KPU-1)		48

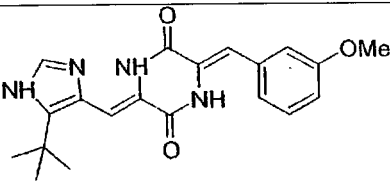
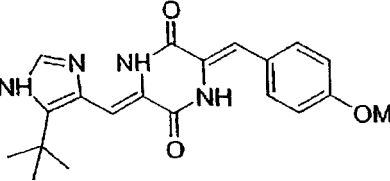
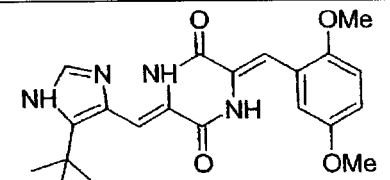
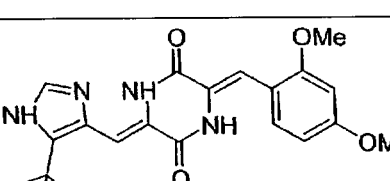
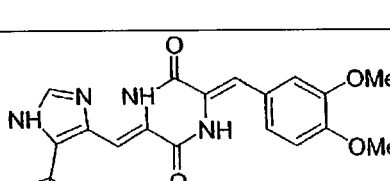
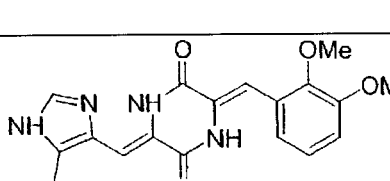
## 2) Introducción de los grupos metoxi al anillo de fenilo

La colchicina reconoce el mismo sitio de enlace en  $\beta$ -tubulina como PLH. La colchicina tiene cuatro grupos metoxi característicos en sus anillos A y B. Se llevaron a cabo una serie de sustituciones con los grupos metoxi sencillos o múltiples y los resultados de la actividad citotóxica se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

*Efecto de la sustitución del grupo metoxi en la proliferación de las células HT-29*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
DeshidroPLH (KPU-1)		48
tBu-PLH (KPU-2)		13
KPU-8		89

Compuesto	Estructura	EC50 (nM)
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980
KPU-13		2130
KPU-14		610

Compuesto	Estructura	EC50 (nM)
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

El resultado demostró que las sustituciones en la posición *m* u *o* incrementaron la actividad citotóxica contra las células HT-29. KPU-9 y 16 mostraron alta actividad. Los derivados de metoxi con triple sustitución (KPU-11, 17 y 45) también mostraron actividad. La estructura de KPU-24 se asignó mediante el análisis MASS.

### 3) Modificación con los grupos de retiro de electrón

Para estudiar más amplia la relación estructura-actividad en el anillo de fenilo, se introdujeron una serie de diferentes grupos funcionales, los cuales incluyen tanto grupos de donación como de retiro del electrón. El resultado de la citotoxicidad contra las células HT-29 se muestra en las Tablas 7 y 8 respectivamente.

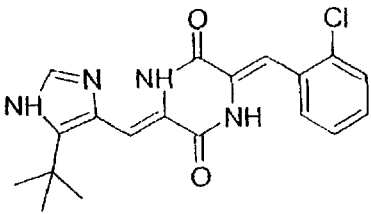
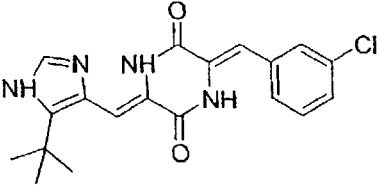
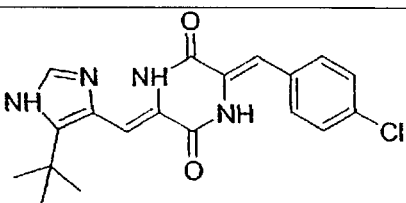
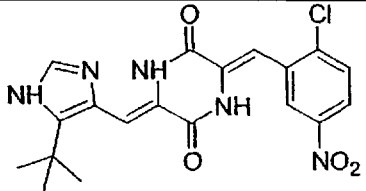
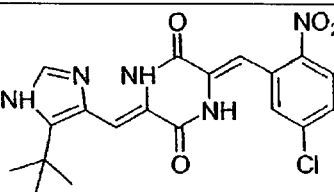
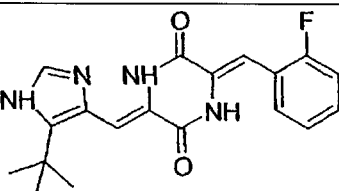
La sustitución en la posición *o* u *m* efectivamente incrementó la actividad. Estos resultados fueron bien consistentes con el caso del grupo metoxi.

(Tabla pasa a página siguiente)

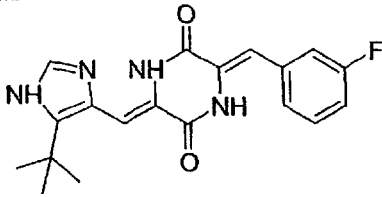
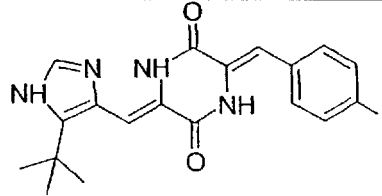
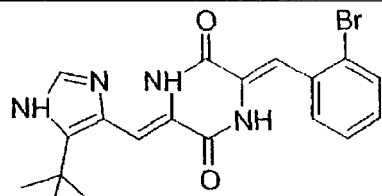
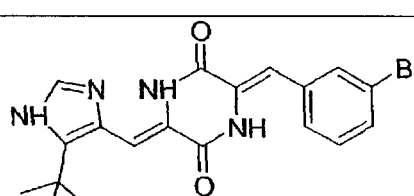
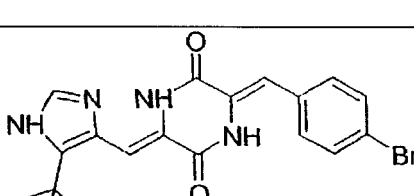
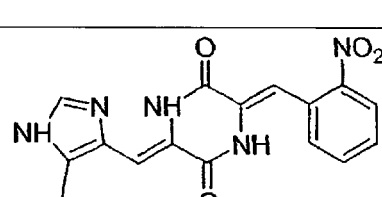
# ES 2 295 695 T3

TABLA 7

*Efecto del grupo de retiro de electrón en la proliferación de células HT-29*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545
KPU-21		51
KPU-52		110
KPU-37		21



Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-35		10
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31
KPU-40		623
KPU-46		44

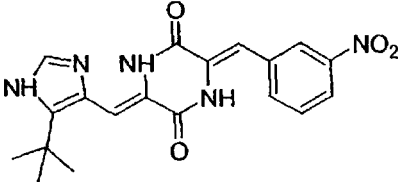
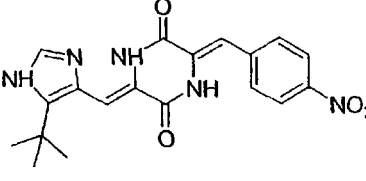
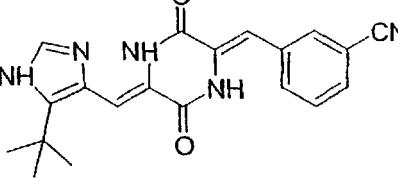
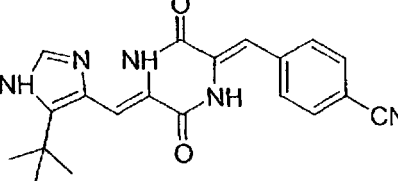
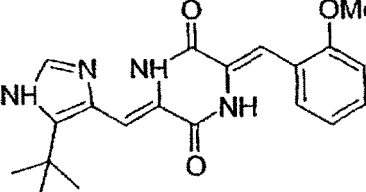
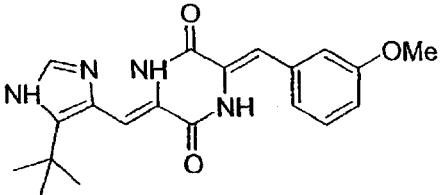
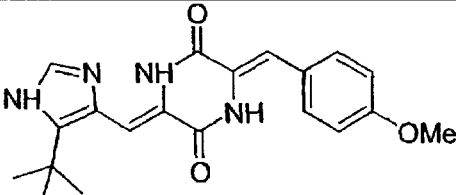
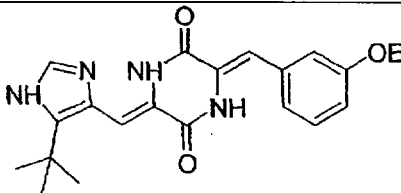
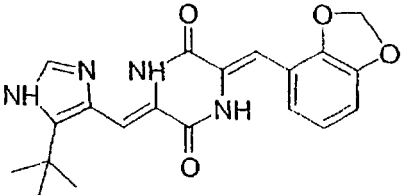
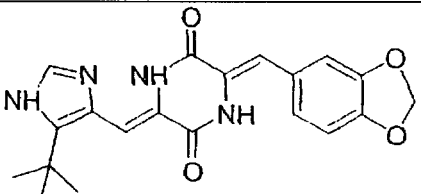
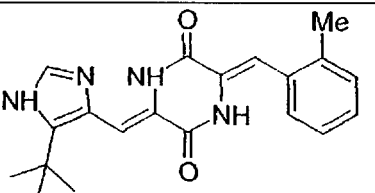
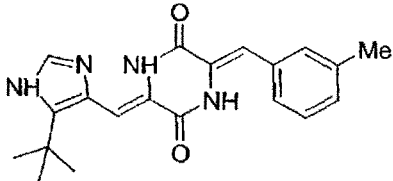
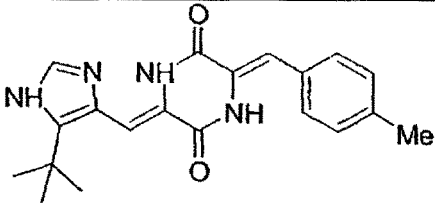
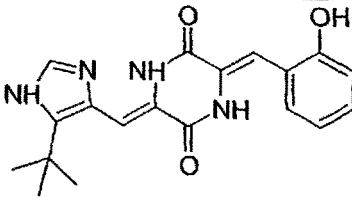
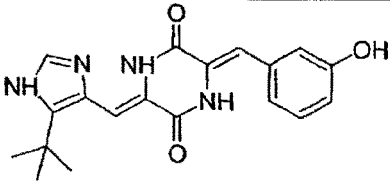
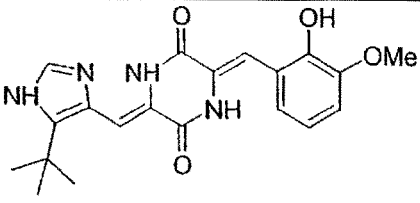
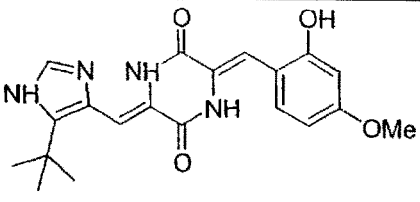
Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-47		40
KPU-48		> 20 μM
KPU-49		28
KPU-43		> 20 μM

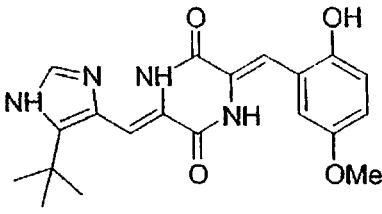
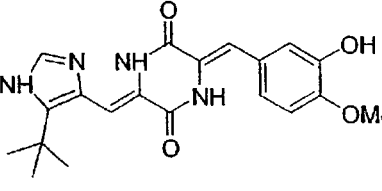
TABLA 8

*Efecto del grupo de donación de electrón en la proliferación de las células HT-29*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-8		89

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-44		43
KPU-30		477
KPU-22		82
KPU-32		42

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 μM
KPU-51		617
KPU-23		5870
KPU-58		> 20 μM

Compuesto	Estructura	EC <sub>60</sub> (nM)
KPU-54		> 20 $\mu$ M
KPU-57		> 20 $\mu$ M

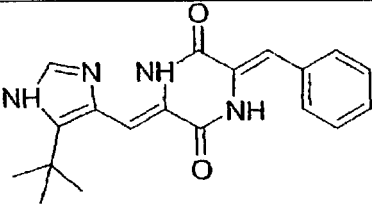
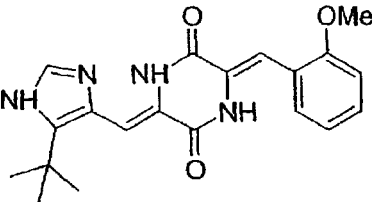
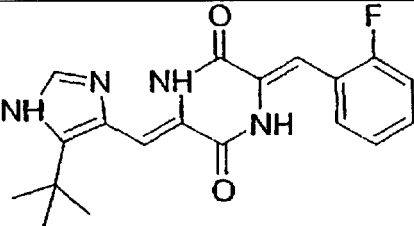
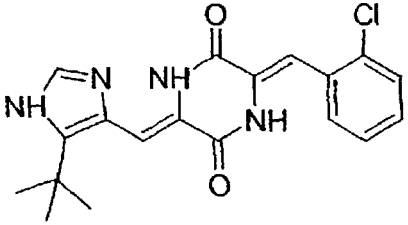
La presente invención no se une o limita por cualquier teoría científica particular. Sin embargo, se aprecia que aquellas personas expertas en la técnica puedan interpretar los resultados presentados en la presente para sugerir que un grupo funcional relativamente más pequeño afecta menos la obstrucción estérica, tal vez pueda producir actividad más potente y grupos ligeramente grandes tales como el grupo etoxi (cuando se compara con el grupo metoxi) o el átomo Br (cuando se compara con el átomo Cl) puede afectar la obstrucción estérica no favorable para la interacción con por ejemplo, el sitio de enlace a tubulina. Además, debido a la propiedad eléctrica de estos sustituyentes no afecta la actividad, se sugiere que estas sustituciones relativamente pequeñas no interactúan directamente con el sitio de enlace de  $\beta$ -tubulina pero restringen la conformación de deshidroPLH adecuada para la unión. O, como otra hipótesis posible, la propiedad hidrofóbica puede ser un factor más importante en el sitio de enlace para la posición o u m en el  $\beta$ -tubulina, ya que la introducción del grupo hidroxil hidrofílico, el cual puede formar la unión del hidrógeno como un donador de hidrógeno, disminuye drásticamente la actividad.

Como se muestra en la Tabla 9, el efecto de los sustituyentes en la actividad citotóxica en la posición o puede ordenarse, como en el caso de la posición m en la Tabla 10. Pueden también modificarse adicionalmente los compuestos que tienen los grupos funcionales efectivos, los cuales mostraron actividad mayor que la tBu-deshidroPLH. Y ya que se observó la migración de la estereoquímica a partir de Z hasta E bajo radiación ligera visible, los sustituyentes que disminuyen la densidad del electrón en las uniones conjugadas dobles puede contribuir a la reducción de la migración Z hasta E a la luz de los resultados en más estructuras fisicoquímicamente estables. La temperatura también puede efectuar su migración.

Puede preferirse la modificación en dos partes del anillo para el desarrollo de los compuestos potentes pero también biológicamente estables. El anillo de fenilo de la fenilhistina se oxida mediante citocromo P-450. La modificación doble que reduce la densidad del electrón del anillo de fenilo puede por lo tanto ser efectiva para prevenir la oxidación de P-450. Así, la combinación del grupo de retiro del electrón pequeño tal como el átomo de floro hacia el elemento que puede incrementar la actividad como -Ome, -Me, -Cl, -F y Br puede resultar en compuestos de droga más potentes y biológicamente estables.

TABLA 9

Resumen de la modificación en la posición-o

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89
KPU-37		21
KPU-18		42

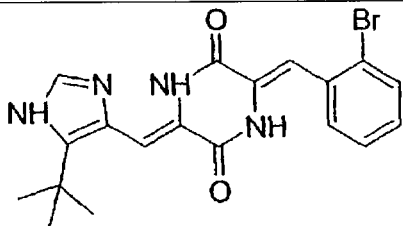
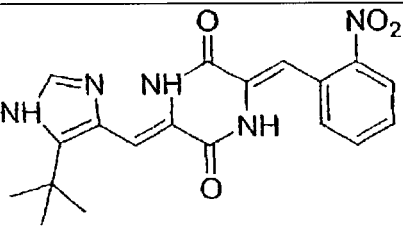
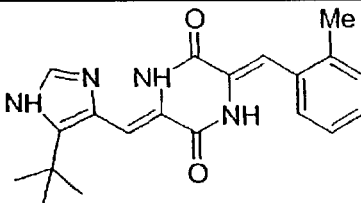
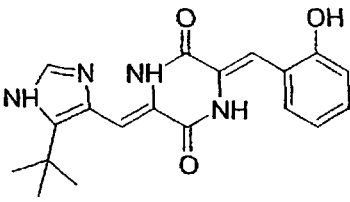
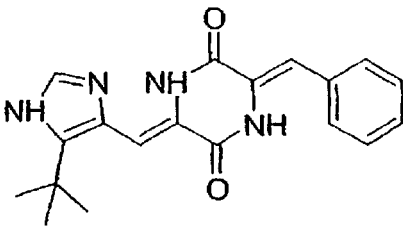
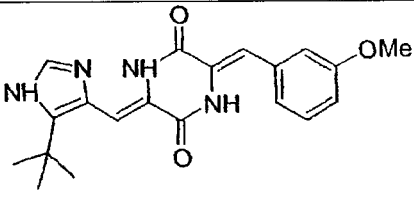
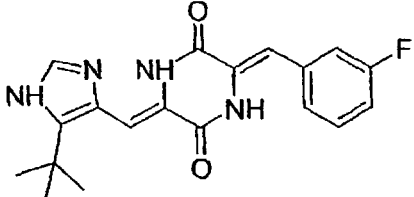
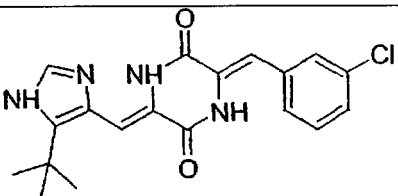
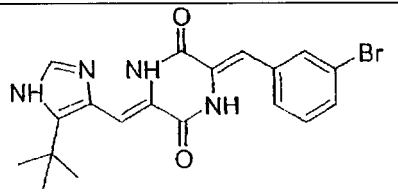
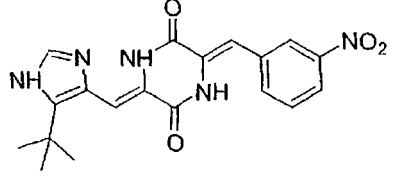
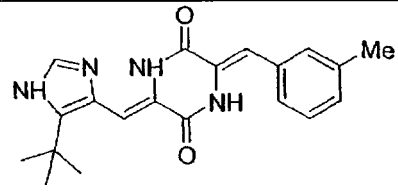
Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-50		38
KPU-46		44
KPU-32		42
KPU-53		> 20 μM

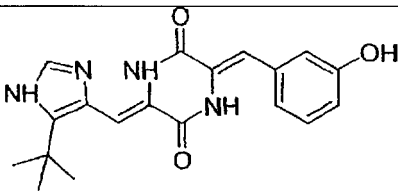
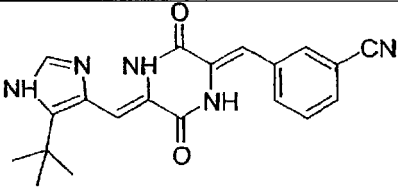
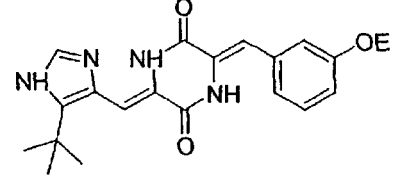
TABLA 10

*Resumen de la modificación en la posición-m*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-19		20
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45



Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-51		617
KPU-49		28
KPU-44		43

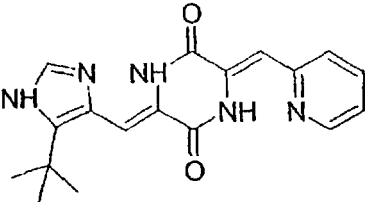
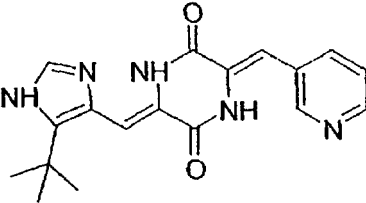
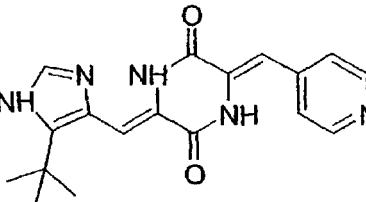
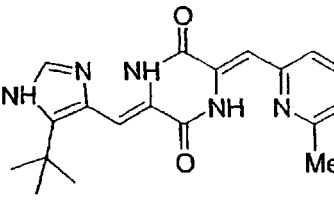
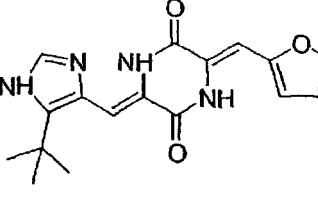
#### 4) Sustitución del anillo de fenilo en los arilo-heterociclos

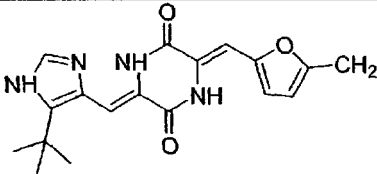
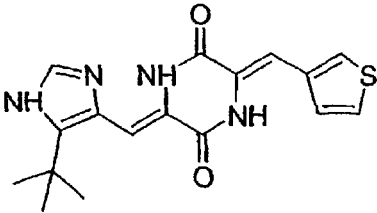
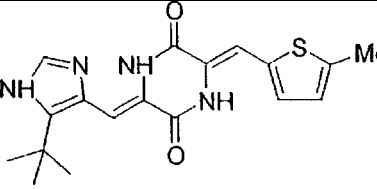
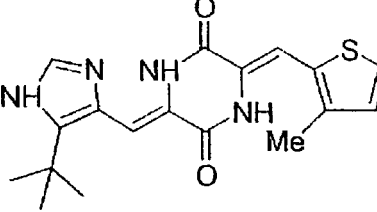
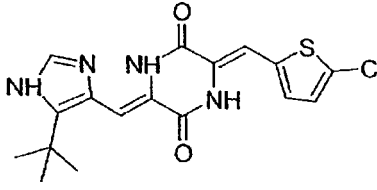
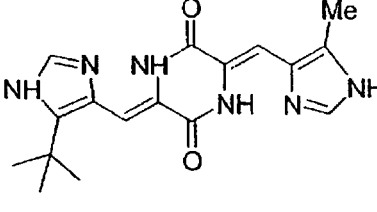
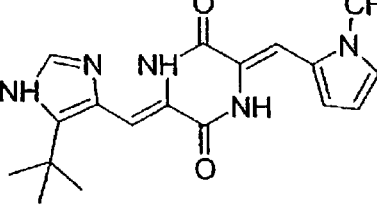
El anillo de fenilo también puede reemplazarse mediante los grupos de heteroarilo. El resultado de tales reemplazos en términos de actividad citotóxica se muestran en la Tabla 11. Ya que los átomos de nitrógeno arílico pueden formar una unión de hidrógeno con un grupo NH del anillo de dicetopiperazina y restringir la conformación de la molécula entre los anillo de piridina y dicetopiperazina hacia una estructura uniplanar, la conformación activa de deshidroPLH puede requerir un cierto nivel del ángulo dihedral formado por la repulsión estérica entre un átomo de hidrógeno de amida del anillo de dicetopiperazina y un átomo de hidrógeno del anillo de fenilo (Figura 6).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 11

*Efecto del reemplazo con el anillo de heteroarilo en la proliferación de las células HT-29*

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-28		> 2000 nM
KPU-31		96
KPU-25		544
KPU-33		> 2000 nM
KPU-26		600

Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-60		71
KPU-43		54
KPU-27		80
KPU-29		44
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

El reemplazo del anillo de fenilo con un anillo de furano o tiofeno más pequeño, por ejemplo KPU-29 o -42 exhibió actividad. El anillo de fenilo puede cambiarse hacia otra estructura aromática mientras que mantiene la actividad potente.

### 5) *Metabolismo de la fenilhistina*

En un reciente estudio, la fenilhistina ( $\pm$ ) se trató con un microsoma hepático de rata o hepático humano P450s. En el caso humano se detectaron al menos siete metabolitos y dos de ellos, i.e., P1 y P3 tuvieron metabolitos mayores, representando más del 60% de los metabolitos recuperados.

Ya que no existe la estructura de exo-olefina en tBu-deshidroPLH, los derivados sintetizados presentes no tiene oxidación como P1 y P4. Sin embargo, las oxidaciones tales como P3 y P5 se formaron durante el metabolismo hepático. Varios derivados, los cuales evitan tal metabolismo, son efectivos para prevenir la oxidación de P450 en el anillo de fenilo. El anillo de imidazol también se modificó para prevenir la oxidación no favorable.

### 6) *Estabilidad fisicoquímica de deshidroPLH*

La estabilidad fisicoquímica es uno de los problemas no favorables de deshidroPLH. En la fenilhistina, ya que no existe estructura de olefina adicional en la parte de bencilo, no hay mucho problema. Sin embargo, en la deshidroPLH, el residuo de bencilideno puede activarse fácilmente, probablemente con la luz visible y ocurre frecuentemente la migración de Z hasta E debido a la existencia de la conjugación más grande del doble enlace. Esta migración ocurre aún bajo luz ambiental natural. En el ensayo citotóxico, algunos de los compuestos migran hacia la forma E durante la incubación, aunque esta migración probablemente equilibra en la proporción 1:1 en el caso de deshidroPLH. Esta migración puede controlarse. La migración Z hasta E también se conoce en la combretastatina A4, un mismo tipo de inhibidor de tubulina y se reportaron algunos estudios para mejorar este problema.

### 7) *Síntesis de Prodroga*

La forma E también puede utilizarse como una prodroga de deshidroPLH o de uno o más de sus análogos, incluyendo aquellos análogos descritos en la presente. Una de las propiedades no deseadas de las drogas anti-tubulina involucra su baja selectividad entre los tejidos del tumor e intactos, aunque estas drogas pertenecen a una de las terapias moleculares objetivo. Esto provoca efectos colaterales no deseados. Sin embargo, si los compuestos funcionan selectivamente solo en tejidos de tumor, pueden reducirse los efectos laterales negativos de las drogas de anti-microtúbulo. Ya que puede producirse la deshidroPLH (forma Z) a partir de su isómero E mediante irradiación de luz visible, la forma E se administra y la foto irradiación se lleva a cabo solamente en el sitio del tumor, después solamente se daña el tumor mediante la forma Z foto-producida y se reduce el efecto adverso en los tejidos intactos.

La forma E puede protegerse químicamente mediante la adición de un grupo acilo voluminoso pero biodegradable, el cual se introduce en el anillo de dicetopiperazina como una prodroga. Este grupo acilo puede unirse mediante la proteasa en el cuerpo. Por lo tanto, el compuesto E acilado se mantiene antes de la administración, entonces después de la administración se cambia al grupo E real, el cual puede migrar a la forma Z bioactiva mediante foto irradiación local.

El esquema sintético de esta forma E de acilo de tBu-deshidroPLH se resume en la Figura 9.

### Ejemplo 7

#### *Formulaciones Farmacéuticas de las Deshidrofenilhistinas Sintetizadas*

##### 1) *Formulaciones Intravenosamente Administradas mediante Goteo, Inyección, Infusión o Similar*

Los viales que contienen 5 g de glucosa en polvo, cada uno se agregan asépticamente con 10 mg de un compuesto sintetizado por el método y sellado. Después de cargarse con nitrógeno, helio u otro gas inerte, los viales se almacenaron en un lugar oscuro frío. Antes de su uso, los contenidos se disolvieron en etanol y se agregaron a 100 ml de un 0.85% de solución de agua fisiológicamente salada. Se administró la solución resultante como un método para inhibir el crecimiento de un tumor canceroso en un humano diagnosticado como que tiene tal tumor a aproximadamente 10 ml/día hasta aproximadamente 1000 ml/día, intravenosamente mediante goteo o vía una inyección subcutánea o intraperitoneal como se considere apropiado por aquel de experiencia ordinaria en la técnica.

##### 2) *Formulación para Administrarse Oralmente o Similar*

Una mezcla obtenida mediante el mezclado completo de 1 g de un compuesto sintetizado por el método, 98 g de lactosa y 1 g de hidroxipropil celulosa se formó en gránulos mediante cualquier método convencional. Los gránulos se secaron completamente y separaron para obtener una preparación de gránulo adecuada para envasar en botellas o mediante sellado con calor. Las preparaciones de gránulo resultantes se administraron oralmente a entre

aproximadamente 100 ml/día hasta aproximadamente 1000 ml/día, dependiendo de los síntomas, como se considere apropiado por aquel de experiencia ordinaria en la técnica para tratar tumores cancerosos en humanos.

### 3) *Formulación para Administrarse Tópicamente*

La administración a un individuo de una cantidad efectiva del compuesto puede también llevarse a cabo tópicamente al administrar el(los) compuesto(s) directamente al área afectada de la piel del individuo. Para este propósito, el compuesto administrado o aplicado es en la forma de una composición que incluye un vehículo tópico farmacológicamente aceptable tal como un gel, un ungüento, una loción o una crema, el cual incluye sin limitación tales vehículos tales como agua, glicerol, alcohol, propilen glicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácido graso o aceites minerales. Otros vehículos tópicos incluyen petróleo líquido, isopropil palmitato, polietilen glicol, etanol (95%), monolaurato de polioxietileno (5%) en agua o lauril sulfato de sodio (5%) en agua. Pueden agregarse según sea necesario otros materiales tales como anti-oxidantes, humectantes, estabilizadores de la viscosidad y agentes similares. Pueden también incluirse los mejoradores de la penetración percutánea tales como Azona. Además, en ciertas instancias, se espera que el compuesto pueda disponerse dentro de los dispositivos colocados en o bajo la piel. Tales dispositivos incluyen parches, implantes e inyecciones que liberan el compuesto dentro de la piel mediante ya sea mecanismos de liberación pasiva o activa.

#### Ejemplo 8

##### *Farmacología in vitro de KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilhistina*

Los estudios de eficacia *in vitro* llevados a cabo con KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilhistina incluyen: A) un panel de seis líneas celulares de tumor, B) estudios en células de tumor resistentes a la multidroga y C) estudios para determinar el mecanismo de acción.

#### A). *Estudio de KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilhistina en un panel de seis líneas celulares de tumor*

Se utilizaron las siguientes líneas celulares (fuente en paréntesis): HT29 (tumor de colon humano; ATCC; HTB-38), PC3 (tumor de próstata humano; ATCC; CRL-1435), MDA-MB-231 (tumor de mama humano; ATCC; HTB-26), NCI-H292 (tumor de pulmón de célula no pequeña humano; ATCC; CRL-1848), OVCAR-3 (tumor de ovario humano; ATCC; HTB-161), B16-F10 (melanoma murino; ATCC; CRL-6475) y CCD-27sk (fibroblasto humano normal; ATCC; CRL-1475). Las células se mantuvieron a densidades subconfluentes en sus medios de cultivo respectivos.

Se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad como se describió anteriormente en el Ejemplo 4, utilizando fluorescencia Resazurin como un indicador de la viabilidad celular.

Los compuestos descritos son agentes efectivos contra una variedad de líneas celulares de tumores diferentes y distintos. Específicamente, por ejemplo, KPU-2 y KPU-35 fueron más efectivos en la línea celular del tumor HT-29, tanto en los términos de potencia (activo en el rango nanomolar bajo) como eficacia (responde más en los términos del efecto citotóxico máximo); t-butil-fenilhistina exhibe su mayor potencia contra la línea celular del tumor PC-3, aunque la mayor eficacia se desplegó contra la línea celular HT-29; KPU-2 y KPU-35 fueron generalmente 10-40 veces más potentes que t-butil-fenilhistina mientras que la eficacia fue similar para todos los tres compuestos en las diferentes líneas celulares de tumor; las líneas celulares de tumor HT-29, PC-3, MDA-MB-231 y NCI-H292 todas responden de manera similar a los compuestos NPI, mientras que B16-F10 parece que es algo menos sensitivo. La t-butil-fenilhistina desplegó una marcada diferencia entre los fibroblastos normales y las líneas celulares de tumor, con una proporción que varía a partir de >20->100 excepto por la línea celular OVCAR-3.

TABLA 12

*Actividad de KPU-2, KPU-35 y t-butil fenilhistina en el Examen del panel del Tumor*

Línea Celular	KPU-2			KPU-35			t-buti-fenilhistina		
	Sig.	SD	n	Sig.	SD	n	Sig.	SD	n
HT-29 Colon									
IC50 nM	9.8	2.4	4	8.2	2.0	4	420	473	3
% de Citotoxicidad	82.5	5.3	4	81.3	4.0	4	88	0.2	3
PC-3 Próstata									
IC50 nM	13.4	0.7	4	13.2	2.5	4	174	-	2
% de Citotoxicidad	60.3	2.1	4	56.8	1.0	4	59.5	-	2
MDA-MB-231 Seno									
IC50 nM	13.8	1.9	3	9.7	4.2	4	387	-	2
% de Citotoxicidad	56.7	7.2	3	59.3	5.6	4	65.5	-	2
NCI-H292 Pulmón									
IC50 nM	17.5	1.1	4	15.9	1.1	4	384	194	3
% de Citotoxicidad	70.5	2.9	4	68.5	2.9	4	65	5	3
OVCAR-3 Ovario									
IC50 nM	>20,000	-	4	>20,000	-	4	>20,000	-	2
% de Citotoxicidad	45.8	3.0	4	39	2.2	4	37	-	2
B16-F10 Melanoma									
IC50 nM	37.1	26.3	4	32.3	19.9	4	736	650	3
% de Citotoxicidad	71.8	2.5		72.0	2.2	4	74	2	3
CCD-27sk Fibroblasto									
IC50 nM	9.2	2.9	4	7.4	2.6	4	>20,000	-	2
% de Citotoxicidad	64.3	2.4	4	60.8	1.9	4	45	-	2

#### B). Estudios en Líneas Celulares Resistentes a la Droga

Uno de los mayores retos en el uso de agentes quimioterapéuticos en la oncología clínica es el desarrollo de la resistencia al efecto de la droga mediante las células de tumor. Existen varios mecanismos para el desarrollo de la resistencia, cada uno de los cuales tendrá efectos diferenciales en las drogas quimioterapéuticas. Estos mecanismos incluyen la expresión incrementada de las bombas de flujo dependientes de ATP tales como la P-glicoproteína codificada mediante MDR1 o la proteína 1 asociada con resistencia a la multidroga codificada mediante MRP1. La captación de la droga reducida, la alteración del objetivo de la droga, incrementando la reparación del daño de ADN inducido por la droga, la alteración de la trayectoria apoptótica y la activación de las enzimas de citocroma P450 son otros ejemplos de los mecanismos mediante los cuales las células del cáncer se vuelven resistentes a las drogas anticáncer. Los compuestos seleccionados se estudiaron en tres diferentes líneas celulares para exhibir dos diferentes mecanismos de resistencia; la sobreexpresión de la P-glicoproteína y la actividad de la topoisomerasa alterada.

#### 1) Par de la Línea Celular de Tumor de Sarcoma Uterino Humano: MES-SA (Sensible al Taxol) y MES-SA DX (Resistente al Taxol)

Esta línea celular expresa ARN de *mdr-1* y P-glicoproteína elevados (un mecanismo por bombeo de extrusión). El pretratamiento con P-glicoproteína de los bloques de ciclosporina-A (CsA) y la actividad de reinstalar en la línea celular resistente para esos compuestos para los cuales la resistencia es debido a la P-glicoproteína elevada.

Como puede observarse a partir de la Tabla 13, KPU-2 y KPU-35 tienen la misma potencia en la línea celular resistente como en la línea celular sensible y la potencia de t-butil-fenilhistina se redujo solo ligeramente. El pretratamiento de ciclosporina A (CsA) no altera la potencia de los compuestos seleccionados. En contraste, el taxol fue virtualmente inactivo en la línea celular resistente MES-SA DX, en vista de que este compuesto fue muy potente en la línea celular sensible. El tratamiento CsA renueva la sensibilidad a taxol de la línea celular MES-SA DX. La línea celular MES-SA también mostró susceptibilidad reducida para etoposida (60 veces), doxorubicina (34 veces) y mitoxantrona (20 veces).

Estos datos indican que los efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina no son susceptibles al mecanismo relacionado con taxol (p-glicoproteína) en esta línea celular y la resistencia cruzada a partir de taxol no ocurre para estos compuestos seleccionados en este modelo.

TABLA 13

*Actividad de KPU-2, KPU-35, t-butil-fenilhistina y Taxol en Líneas Celulares de Tumor de Sarcoma Uterino Humano Sensible al Taxol MES-SA y Resistente al Taxol MES-SA DX*

Estudio del Compuesto	Sensible a MES-SA			Resistente a MES-SA DX			
	Sin CsA	Pretratamiento CsA		Sin CsA		Pretratamiento CsA	
	IC50 nM	IC50 nM	Prop. sin CsA	IC50 nM	Prop. MES-SA	IC50 nM	Prop. sin CsA
KPU-2							
Estudio I	8.5	-	-	10.5	1.2	-	-
Estudio II	19.4	27.4	1.4	21.7	1.1	37.8	1.74
KPU-35							
Estudio I	6.6	-	-	5.2	0.8	-	-
Estudio III	3.9	2.0	0.5	2.5	0.6	6.7	2.7
t-butil-fenilhistina							
Estudio I	144	-	-	825	5.7	-	-
Estudio III	122	162	1.3	694	4.3	622	0.9
Taxol							
Estudio I	4.4	-	-	>20,000	>455	-	-
Estudio II	13.3	7.6	0.6	>>100	>>8	40	<<0.25
Estudio III	7.3	2.8	0.4	>24,000	>3000	2.0	<<0.001

2) Par de Línea Celular de Leucemia Promielocítica Aguda Humana: HL-60 (Sensible a Mitoxantrona) y HL-60/MX-2 (Resistente a Mitoxantrona)

Esta línea celular se considera que tiene propiedades de resistencia a la droga atípicas con actividad catalítica para la topoisomerasa II alterada sin la sobre-expresión de la P-glicoproteína.

Como puede observarse en la Tabla 14, estos resultados indican que las potencias de los compuestos nuevos seleccionados son muy similares en las líneas celulares HL-60 sensitivas y de resistencia. En contraste, la Mitoxantrona pierde eficacia mediante un factor de 24 veces la resistencia de la línea celular HL-60/MX-2.

Así, KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina no son susceptibles a los mismos mecanismos de resistencia como Mitoxantrona en esta línea celular y no existe resistencia cruzada a partir de Mitoxantrona para estos compuestos nuevos seleccionados en este modelo.

TABLA 14

*Actividad de KPU-2, KPU-35, t-butil-fenilhistina y Mitoxantrona en el Par de Línea Celular Sensible y Resistente al Tumor de Leucemia Promielocítico Agudo Humano HL-60*

Compuesto	Sensible a HL-60	Resistente a HL-60	
	IC50 nM	IC50 nM	Proporción a lo Sensitivo
KPU-2	6.4	8.17	1.28
KPU-35	9.2	7.3	0.79
t-butil-fenilhistina	255	175	0.69
Mitoxantrona	202	4870	24.1

3) *Par de Línea Celular de Carcinoma de Seno Humano: MCF-7 (Sensible al Taxol) y MCF-7/ADR (Resistente al Taxol)*

Este estudio involucra KPU-2 en comparación con taxol. KPU-2 demostró potencias similares tanto en los miembros sensitivos como resistentes de este par de línea celular. En contraste, el taxol fue virtualmente inactivo en la línea celular resistente en vista de que existe potencia nanomolar baja en la línea celular sensitiva (Tabla 15).

Estos estudios confirman en una línea celular de tumor humano diferente que la resistencia a taxol no se transfiere a KPU-2.

TABLA 15

*Actividad de KPU-2 y Taxol en el Par de Línea Celular Sensible y Resistente al Carcinoma de Seno Humano MCF-7*

Compuesto	Sensible a MCF-7	Resistente a MCF-7/ADR	
	IC50 nM	IC50 nM	Proporción a lo Sensitivo
KPU-2	39.6	27.4	0.69
Taxol	2.6	>>100	>>38

C) *Estudios del Mecanismo de Acción*

1) *Acción en la Función de Microtúbulo*

Se utilizaron las células endoteliales de cordón umbilical humano (HuVEc de Cambrex) en este estudio, para evaluar los efectos de KPU-2 y t-butilfenilhistina en comparación con colchicina y taxol sobre la tubulina mediante el teñido por  $\alpha$ -tubulina.

Treinta minutos de exposición a KPU-2, t-butilfenilhistina o colchicina (todos a  $2 \mu\text{m}$ ) indujeron la despolimerización del microtúbulo como se indicó por la falta de la estructura de microtúbulo intacta en contraste con lo observado en el Control de DMSO y la formación de ampollas en la membrana celular (una clara indicación de apoptosis) en las células HuVEC, en vista de que el taxol no induce la despolimerización del microtúbulo bajo estas condiciones. La colchicina es un agente de despolimerización de microtúbulo conocido en vista de que el taxol es un agente estabilizante de tubulina. Se obtuvieron resultados similares cuando se expusieron las células CCD-27sk a KPU-2 o colchicina.

2). *Inducción de la Apoptosis*

La apoptosis y su desregulación juegan un papel importante en la oncología; la inducción selectiva del ciclo de muerte celular programado en células de tumor es el objetivo de muchos programas del descubrimiento de drogas quimioterapéuticas. Esta inducción de la apoptosis puede demostrarse mediante diferentes métodos incluyendo la formación de ampollas de la membrana celular característica, la fragmentación de ADN, la hiperfosforilación del factor antiapoptótico Bcl-2, la activación de la cascada de caspasa y el desdoblamiento de la poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP).

Los signos característicos de la muerte celular apoptótica incluyen la formación de ampollas de la membrana celular, la disrupción de los núcleos, la contracción y la condensación celular y finalmente la muerte celular, muy distintiva de la muerte celular necrótica. KPU-2 induce los cambios morfológicos típicos asociados con etapas tempranas de la apoptosis en células de tumor de próstata humanas. Un descubrimiento similar también es claro en el tratamiento de células HuVEC con KPU-2.

3). *Fragmentación de ADN*

Una etapa tardía característica de la apoptosis es el desdoblamiento del ADN internucleosomal que da como resultado un patrón en escalera distintivo que puede visualizarse mediante la electroforesis de gel. Este procedimiento se utilizó para estudiar el efecto de KPU-2 sobre el escalonamiento de ADN en células Jurkat (línea de leucemia de la célula T humana) en comparación con halimida y deshidrofenilhistina (KPU-1). KPU-2 indujo el escalonamiento de ADN en la concentración de 1 nM mientras de que la halimida y KPU-1 fueron mucho menos potentes.



#### 4). Activación de la Cascada de Caspasa

Se activaron durante la apoptosis varias enzimas en la cascada de caspasa, incluyendo Caspasa-3, -8 y -9. Se monitorizó la actividad de las Caspasa-3 en células Jurkat siguiendo el tratamiento con KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina.

Los resultados indican que la caspasa-3 se activó en una forma dependiente de la dosis mediante el tratamiento con todos los tres compuestos en una forma similar a la halimida. La activación de la caspasa-3 ocurrió sobre un rango de concentración similar como para el IC50 para la citotoxicidad en la línea celular Jurkat (Tabla 16).

TABLA 16

*Citotoxicidad de KPU-2, KPU-35 y t-buti-fenilhistina en Células Jurkat*

Compuesto NPI	Citotoxicidad	
	Potencia IC50 nM	Eficacia % de Muerte Celular
KPU-2	11	94
KPU-35	5	93
t-butil-fenilhistina	165	93
Mitoxantrona	41	99

#### 5). Desdoblamiento de Poli(ADP-ribosa) Polimerasa (PARP) en Células Jurkat

A fin de valorar la capacidad de estos compuestos para inducir la apoptosis en células Jurkat, se monitorizó el desdoblamiento de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). PARP es una proteína nuclear de 116 kDa que es uno de los objetivos celulares principales de Caspasa-3. El desdoblamiento de PARP genera un producto estable de 89 kDa y su proceso puede ser monitorizado fácilmente mediante inmunotransferencia western. El desdoblamiento de PARP mediante caspasas es una de las marcas de pureza de la apoptosis y como tal sirve como un marcador excelente para este proceso. KPU-2 a 100 nM indujo la desdoblamiento de PARP en células Jurkat 10 horas después de la exposición de las células al compuesto. KPU-2 apareció más activo que halimida o KPU-1.

#### 6). Permeabilidad Vascular Mejorada en Células HuVEC

Los compuestos que despolimerizan los microtúbulos (e.g., combrestatina A-4-fosfato, ZD6126) han mostrado que inducen el colapso vascular en tumores *in vivo*. Este colapso vascular se precede mediante una inducción rápida de la permeabilidad de la célula vascular inicialmente para electrolitos e inmediatamente después para moléculas grandes. La permeabilidad mejorada de las células HuVEC para un dextrano de etiquetado fluorescente se utiliza como un ensayo proxy para un colapso vascular.

KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina todos inducen significativamente rápido (dentro de 1 hora) la permeabilidad de la monocapa de HuVEC, hacia un extendido similar para colchicina. El microtúbulo que estabiliza el agente taxol fue inactivo en este ensayo (Figura 12).

#### 7). Perfil en un Amplio Examen de Cinasa A

KPU-2 se examinó inicialmente a una concentración de 10  $\mu$ M en un panel de 60 cinasas diferentes; la concentración ATP fue 10  $\mu$ M. Se inhibieron cuatro cinasas mediante más del 50% en el examen primario y los IC50 se determinaron en un examen secundario como se presenta en la Tabla 17. Todos los valores IC50 se encuentran en un rango micromolar bajo, lo cual indica que la inhibición de estas cinasas no se relaciona con las actividades nanomolares bajas observadas para la citotoxicidad de la célula tumoral.

TABLA 17

*Actividad de KPU-2 contra Cinasas Seleccionadas*

Cinasa	IC50 ( $\mu$ M)
CDK1/Ciclina B (humano)	10.1
c-RAF (humano)	8.9
JNK3 (rata)	6.8
Lyn (ratón)	11.1

## Ejemplo 9

Farmacología *In vivo*

Se llevaron a cabo estudios preliminares con KPU-2 utilizando los Modelos de Xenoinjerto MX-1 (pulmón) y HT-29 (colon) y el modelo de tumor de leucemia murino P-388 en el ratón. Otros modelos de tumor seleccionados en base a la actividad en el panel de tumor *in vitro* fueron DU-145 (próstata), MCF-7 (seno) y las líneas celulares A549 (pulmón). También se incluye el tumor pancreático humano (MiaPaCa-2). Se estudiaron los nuevos compuestos como monoterapia y en combinación con un agente quimioterapéutico clínicamente utilizado. Se determinaron las dosis de los nuevos compuestos seleccionados a partir de la prueba de tolerancia aguda (Dosis Máximamente Tolerada, MTD) y se ajustaron de necesario durante cada estudio. Las dosis de los agentes quimioterapéuticos clínicamente utilizados se seleccionaron sobre la base de estudios históricos.

KPU-2 fue el primer compuesto a estudio en estos cinco modelos de tumor. Siguiendo los resultados iniciales a partir de este estudio, todos los tres compuestos se compararon en los modelos de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29, el DU-145 de próstata humano, y de tumor de seno humano MCF-7.

Todos los modelos anteriores utilizaron la técnica de implante xenoinjerto subcutánea y se someten potencialmente a los efectos selectivos de un compuesto sobre la vasculatura subcutánea produciendo una actividad antitumor magnificada (o aparente). A fin de rodear esta posibilidad, se han incorporado otros dos modelos de tumor en la investigación. Uno de estos es la observación de la metástasis de pulmón siguiendo la inyección intravenosa de las células de tumor de melanoma de ratón B16-F10. El otro modelo es la implantación de células de tumor de seno humano MDA-231 en la almohadilla gruesa mamaria del ratón. Mientras que este modelo posterior es un modelo de xenoinjerto, no juega un papel en la vasculatura subcutánea.

*Métodos*

## 1). Modelos de Xenoinjerto

Los animales utilizados fueron (las excepciones se indican para estudios individuales): ratones desnudos hembras (nu/nu) entre 5 y 6 semanas de edad (~20 g, Harlan); el tamaño del grupo fue de 9-10 ratones por grupo a menos que se indique de otro modo.

Las líneas celulares utilizadas para la implantación del tumor fueron: tumor de colon humano HT-29; tumor de seno humano MCF-7; tumor de pulmón de célula pequeña no humano A549; tumor de páncreas humano MiaPaCa-2; tumor de próstata humano DU-145.

Se administraron los nuevos compuestos seleccionados como monoterapia a través de la vía intraperitoneal (i.p.) en la dosis indicada por el estudio individual; para los estudios de combinación los agentes de quimioterapia de referencia seleccionados se inyectaron 15-30 minutos antes del compuesto.

Los vehículos utilizados en estos estudios fueron: 12.5% de DMSO, 5% de Cremaphor y 82.5% de aceite de cacahuete para los nuevos compuestos seleccionados; (1:3) Polisorbato 80:13% de etanol para taxotere; (1:1) Cremaphor:etanol para paclitaxel; para CPT-11 cada ml de la solución contuvo 20 mg de hidrocloreuro de irinotecan, 45 mg de sorbitol NF en polvo y 0.9 mg de ácido láctico, el pH se ajustó para 7.4 con NaOH o HCl. Se utilizaron las diluciones salinas para lograr las concentraciones de la inyección utilizadas para los compuestos de referencia.

*Modelo de Tumor de Colon Humano HT-29*

A los animales se les implantaron subcutáneamente (s.c.) al cambiar fragmentos de tumores HT-29 recolectados a partir de tumores que crecieron s.c. en los huéspedes ratones desnudos. Cuando el tamaño del tumor al-

## ES 2 295 695 T3

canzó 5 mm X 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se igualaron en el tratamiento y grupos control. Los ratones se pesaron dos veces por semana y las mediciones del tumor se obtuvieron utilizando calibradores dos veces por semana iniciando en el Día 1. Las mediciones del tumor fueron convertidas a mg estimando el peso del tumor utilizando la fórmula  $(W^2 \times L)/2$ . Cuando el peso del tumor estimado del grupo control alcanzó un promedio de 1000 mg el ratón se pesó, sacrificó y se retiró el tumor. Los tumores se pesaron y se calculó el peso medio de tumor por grupo y se determinó la inhibición del crecimiento del tumor (TGI) para cada grupo (100% menos del cambio en el peso medio del tumor tratado/el cambio en el peso medio del tumor de control x 100).

En este modelo a menos que se anote de otro modo para estudio individual, los nuevos compuestos seleccionados se inyectaron intraperitonealmente cada tercer día durante 15 días [1, 4, 8, 11 y 15 (q3dx5)]; CPT-11 se administró intraperitonealmente en los días 1, 8 y 15 (qwx3).

### *Modelo de Tumor de Seno Humano MCF-7*

A ratones desnudos hembra (~20 g) se les implantó s.c. con píldoras de estrógenos de liberación en 21 días de (0.25 mg) 24 horas antes de la implantación s.c. con fragmentos de tumor MCF-7 (recolectados de tumores s.c. en los huéspedes del ratón desnudo). El estudio procedió entonces como se describió para el modelo HT-29, utilizando taxotere como el agente de quimioterapia estándar.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para el estudio individual, los nuevos compuestos se inyectaron a través de la ruta intraperitoneal diariamente en los Días 1-5, inclusive (qdx5); se administró taxotere intravenosamente en los Días 1, 3 y 5 (qdx3).

### *Modelo del Tumor e Pulmón Humano A549*

A los animales se implantaron s.c. al cambiar con fragmentos de tumores A549 recolectados de tumores en desarrollo s.c. en huéspedes ratones desnudos. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 5 mm x 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se igualaron en los grupos de tratamiento y control. El resto del estudio procedió como se describe para el modelo HT-29, utilizando taxotere y CPT-11 como los agentes de quimioterapia estándar.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para estudio individual, los compuestos probados se administraron a través de la ruta intraperitoneal sobre un programa de dosis q3dx5 para la combinación de CPT-11 o un régimen de dosis qdx5 para la combinación con taxotere; se administró CPT-11 a través de la ruta intraperitoneal sobre un programa qwx3; se administró taxotere intravenosamente sobre un régimen de dosis qdx3.

### *Modelo de Tumor de Páncreas Humano MiaPaCa-2*

A los animales se implantaron s.c. al cambiar con fragmentos de tumores MiaPaCa-2 recolectados de tumores en desarrollo s.c. en huéspedes ratones desnudos. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 5 mm x 5 mm (aproximadamente 10-17 días) los animales se igualaron en los grupos de tratamiento y control. El resto del estudio procedió como se describe para el modelo HT-29, utilizando gemcitabina como el agente de quimioterapia estándar.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para el estudio individual, se administraron los compuestos de prueba cada tres días a través de la ruta intraperitoneal en los Días 1, 4, 7, 10 y 15 (q3dx5); se administró gemcitabina a través de la ruta intraperitoneal en los Días 1, 4, 7 y 10 (q3dx4).

### *Modelo de Tumor de Próstata Humano DU-145*

Se implantó s.c. a los ratones macho al cambiar con fragmentos de tumores DU-145 recolectados de tumores del crecimiento s.c. en huéspedes ratones macho desnudos. Cuando los tumores alcanzaron ~5 mm x 5 mm (aproximadamente 13-17 días) los animales se igualaron en los grupos de tratamiento y control. El resto del estudio procedió como para el modelo HT-29, utilizando taxotere como el agente de quimioterapia estándar.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para el estudio individual, se administraron los compuestos de prueba a través de la ruta intraperitoneal en los días 1, 3, 5, 8 y 11 (q3dx5); se administró taxotere intravenosamente en los días 1, 3 y 5 (qdx3).

### *Modelos de Tumores Sin Implantación Subcutánea*

Los animales utilizados fueron: ratones desnudos hembra (nu/nu) (estudio MDA-231) o ratones B6D2F1 (estudios B16-F10) entre 5 y 6 semanas de edad (~20 g, Harlan); el tamaño del grupo fue de 10 ratones por grupo a menos que se indique de otro modo.

Las líneas celulares utilizadas fueron: células de tumor de seno humano MDA-MB-231 y de melanoma murino B16-F10.

## ES 2 295 695 T3

Los compuestos NPI se administraron como monoterapia a través de la ruta intraperitoneal en las dosis indicadas para el estudio individual; para los estudios de combinación los agentes de quimioterapia de referencia seleccionados se inyectaron 15-30 min antes del compuesto NPI.

### *Tumor de Seno Humano MDA-231*

Se inyectaron ratones desnudos hembra en la almohadilla de grasa mamaria con células MDA-231 de  $2 \times 10^6$  recolectadas del cultivo celular *in vitro*. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 5 mm x 5 mm (aproximadamente 14-28 días) los animales se igualaron en los grupos de tratamiento y control. El estudio procedió entonces como se describe para el modelo HT-29, utilizando paclitaxel como el agente de quimioterapia estándar.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para el estudio individual, se administraron los compuestos de prueba a través de la ruta intraperitoneal en los Días 1, 4, 8, 11 y 15 (q3dx5); se administró paclitaxel a través de la ruta intraperitoneal en los Días 1-5 (qdx5).

### *Modelo de Melanoma Murino Metastásico B16-F10*

Los ratones recibieron células B16-F10 (preparadas a partir de un cultivo celular *in vitro* de células B16-F10) por la ruta iv en el Día 0. En el Día 1 los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y control y se inició el tratamiento. Los ratones se pesaron dos veces a la semana iniciando en el Día 1. Todos los ratones se sacrificaron en el Día 16, se retiraron los pulmones, se pesaron y se contaron las colonias de superficie. Los resultados se expresan como colonias promedio de las colonias de ratón/media tratadas de los ratones de control (T/C x 100%). La inhibición del crecimiento de la metástasis (MGI) en este número se restó de 100%. Paclitaxel fue el agente de quimioterapia estándar utilizado en este estudio.

En este modelo a menos que se anote de otro modo para el estudio individual, los compuestos de prueba se administraron a través de la ruta intraperitoneal en los Días 1-5 (qdx5); se administró paclitaxel intravenosamente en los Días 1-5 (qdx5).

Cuando sea apropiado ( $n \geq 3$ ), los resultados se presentan como promedio  $\pm$ SEM. El análisis estadístico de los estudios con varios grupos se llevó a cabo utilizando ANOVA con la prueba posterior Neuman-Keuls, a menos que se indique de otro modo. La prueba t a una cola también se utilizó en base a la hipótesis de que el compuesto o droga o la combinación reduciría el crecimiento del tumor.

### *Resultados*

#### *Estudios en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29*

##### *1. Evaluación In Vivo de KPU-2+/-CPT-11 en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29*

Este estudio valora los cambios en la rigidez de la dosis y régimen de dosificación para KPU-2 solo y en combinación con un quimioterapéutico relevante CPT-11 en el modelo HT-29.

Se administró KPU-2 en las dosis de 7.5 mg/kg ip diario durante cinco días (qdx5), 3.75 mg/kg ip bid durante cinco días, 7.5 mg/kg ip cada dos días durante 10 días (qodx5) y 7.5 mg/kg ip cada tres días durante 15 días (q3dx5). La combinación de CPT-11 con NPI-2358 a una dosis de 7.5 mg/kg ip q3dx5 resultó en un efecto significativamente mayor que para ya sea el compuesto solo, el cual duró la duración del estudio (Figura 13). Estas observaciones durante la porción de vida del estudio se confirmó mediante los pesos del tumor final del grupo promedio en la autopsia para la cual solamente el grupo de combinación exhibió un peso de tumor significativamente menor estadísticamente que los controles. Además la diferencia entre los pesos de tumor promedio de la terapia de combinación y los grupos de monoterapia CPT-11 fue estadísticamente significativa (Figura 14). Cuando se examinaron los pesos del tumor finales individuales en la autopsia es claro el efecto mayor de la coterapia (Figura 14). El TGI de la coterapia fue 78% como se comparó con 38.9% para CPT-11 solo. El TGI para el grupo de terapia combinada excede el criterio de NCI del 58% para un resultado positivo.

##### *2. Estudio de KPU-2+/-Quimioterapia Estándar contra Cinco Modelos de Xenoinjerto de Tumor Humano*

Este estudio consiste de cinco diferentes ramas, cada una con su propio protocolo, cronometraje, régimen de dosificación y compuesto de referencia. Cada rama se considerará dentro de la presentación del modelo de tumor particular.

La finalidad de la rama HT-29 del estudio fue investigar una dosis ligeramente mayor de KPU-2 (10 mg/kg ip q3dx5) en el modelo de xenoinjerto de tumor de colon humano HT-29 como se comparó con aquellos utilizados en estudio anteriormente descrito, en el cual se observó una marcada sinergia entre KPU-2 (7.5 mg/kg ip q3dx5) y CPT-11 (100 mg/kg ip qwx3).

Como puede observarse en la Figura 15, la combinación de KPU-2 y CPT-11 en este modelo resulta en una sinergia marcada en la inhibición del crecimiento del tumor, con el crecimiento del tumor siendo casi inhibido completamente

para el Tratamiento del Día 29 en el grupo de terapia de combinación. La eficacia mantenida en la terapia combinada y el crecimiento de tumor estimado para este grupo fue significativamente inferior que para cualquier grupo de monoterapia. De acuerdo con lo anterior, la administración de KPU-2 y CPT-11 inhibió el crecimiento del tumor y es un tratamiento de anti-tumor efectivo.

Las observaciones de la porción en vida del estudio (crecimiento del tumor estimado, Figura 15) se soportó mediante la medición de los pesos de los tumores extirpados en la autopsia (Figura 16). Los pesos de los tumores para el grupo de combinación fueron significativamente menores que la de los Controles ( $p < 0.01$ ) como fueron los pesos de los tumores para CPT-11 solo ( $p < 0.05$ ).

Cuando se consideraron los pesos finales de los tumores individuales (Fig. 16), el tamaño del tumor para el grupo de combinación fue generalmente menor que para los otros grupos tratados o de control. El TGI del grupo de combinación fue 65.8%, indicando un efecto positivo mediante el criterio de NCI, mientras que la monoterapia no alcanzó el criterio de NCI de  $TGI > 58\%$ .

## 3. Estudio de la Actividad de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina en el Estudio de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29

Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 17 y la Tabla 18. Los grupos de terapia de combinación todos indicaron una sinergia marcada entre los nuevos compuestos y CPT-11. Los pesos de tumor individuales demostraron la eficacia del tratamiento de coterapia (Figura 18). En cada caso TGI para el grupo de combinación superó el criterio NCI para un efecto positivo, en vista de que el TGI para la monoterapia de CPT-11 no alcanzó este nivel.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 18. Resumen de los Estudios Realizados en el Modelo de Tumor de Colon Humano HT-29

Descripción del Estudio		Compuesto NPI		Agente Quimioterapéutico		Combinación		Comentarios
Status Número	Punto Final	Número, mg/kg ip	Resultado TGI %	Nombre, Dosis	Resultado TGI %	Resultado TGI %	Criterio Excedido NCI (TGI≥58%)	
2164	TGI	KPU-2 7.5 qdx5 7.5 q3dx5	Sin efecto Sin efecto	CPT-11 100 ip qwx3	39*	78 **,#	Combinación	Sinergia
2288	TGI	KPU-2 10→7.5 q3dx5	Sin efecto	CPT-11 100 ip qwx3	36.5*	65.8 **	Combinación	Sinergia Ver, Texto
2139	TGI	KPU-2 7.5 q3dx5	Sin efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	80.7 **,#	Combinación	Sinergia
2139	TGI	KPU-35 10→7.5 q3dx5	Sin efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	83.3 **,##	Combinación	Sinergia 1+ Día 13 1+ Día 27
2139	TGI	t-butil- fenilalhistina 30 q3dx5	Sin efecto	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	77.7 *,#	Combinación	Sinergia

\*p&lt;0.05 vs Control; \*\*p&lt;0.01 vs Control; # p&lt;0.05 vs CPT-11 Solo; ## p&lt;0.01 vs CPT-11 Solo;

+ = Número de Muertos

#### 4. Resumen de los Efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina en Combinación con CPT-11 en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Colon Humano HT-29

Cuando se combinaron con CPT-11, KPU-2 mejoró el efecto de CPT-11, el agente quimioterapéutico estándar hasta un nivel muy en exceso del criterio NCL de un  $TGI \geq 58\%$  para un efecto positivo. Los resultados generados en los tres estudios son muy comparables para tanto las observaciones en vida (Figura 19) como para los pesos de los tumores extirpados en la autopsia (Figura 20).

#### Estudios en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano DU-145

Se han completado dos estudios con este modelo: el primer estudio involucró KPU-2 solo y en combinación con taxotere; el segundo estudio comparó KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina solos y en combinación con taxotere.

##### 1. Efecto de KPU-2 en Combinación con Taxotere en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Próstata Humano DU-145

Como puede observarse a partir de los datos obtenidos durante la porción en vida de este estudio (Figura 21), el tratamiento más efectivo del tumor de próstata humano DU-145 fue la terapia combinada de KPU-2 más taxotere. El efecto del tratamiento fue el más pronunciado al inicio del estudio y pareció reducirse a medida que el estudio progresó. A partir de los Días de tratamiento 20-27, la terapia de combinación proporcionó un TGI aparente que excede el criterio NCI ( $TGI \geq 58\%$ ) y el peso del tumor estimado de la terapia combinada fue significativamente menor que para cualquier monoterapia.

##### 2. Actividad de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina Solo o en Combinación con Taxotere en el Modelo de Xenoinjerto de Próstata Humano DU-145

En base a los datos obtenidos con KPU-2 en combinación con taxotere en el Estudio anteriormente descrito se inició un segundo estudio comparando KPU-2 a KPU-35 y t-butilfenilhistina solos y en combinación con taxotere.

Las observaciones hechas durante la porción en vida de este estudio indican que la combinación de ya sea KPU-2 o KPU-35 con taxotere tiene una mayor reducción sobre el crecimiento del tumor que para taxotere solo (Figura 22). El crecimiento del tumor fue casi completamente bloqueado por KPU-35 en combinación con taxotere.

Los pesos de los tumores extirpados en la autopsia confirmaron las observaciones hechas durante el segmento en vida del estudio. La combinación de ya sea KPU-2 (Figura 23) o KPU-35 (Figura 24) con taxotere fue significativamente más efectiva que taxotere solo en el bloqueo del crecimiento del tumor. En el caso de KPU-35, tres de diez ratones mostraron evidencia para la reducción del tumor. Los índices de inhibición del crecimiento del tumor indicaron una marcada inhibición del crecimiento del tumor para KPU-2 (grupo promedio = 74.1%) y un bloqueo casi total para KPU-35 (grupo promedio = 92.5%). Taxotere solo no alcanzó el criterio establecido de NCI para un efecto positivo ( $TGA \geq 58\%$ ).

#### 5. Estudios en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Seno Humano MCF-7

Este estudio comparó los efectos de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina en el modelo de xenoinjerto de tumor de seno humano MCF-7. Se administraron las dosis de los compuestos en los Días 1, 2, 3, 4 y 7; Se administró taxotere en los Días 1, 3 y 7.

Los nuevos compuestos seleccionados tienen efectos estadísticamente significativos de inicio temprano cuando se utilizan en combinación con taxotere en este modelo, aparentemente casi completamente bloquean el crecimiento de tumor estimado (Figura 25). De los tres compuestos, KPU-2 pareció ser el más efectivo, con t-butil-fenilhistina que también exhibe una potenciación significativa de taxotere.

#### 6. Estudios en el Modelo de Xenoinjerto de Tumor de Pulmón Sin Célula Pequeña Humano A549

Las observaciones en vida durante este estudio (Figura 26) indicaron que la combinación de KPU-2 (7.5 mg/kg ip, qdx5) con taxotere resultaron en una marcada inhibición del crecimiento del tumor como se comparó con el grupo de control o cualquiera de monoterapia. Esto se confirmó mediante los pesos de los tumores en la autopsia, como el promedio del grupo de coterapia fue significativamente menor que el de taxotere solo o el del grupo de Control (Figura 27). Los pesos de los tumores del grupo de coterapia forman un agrupamiento de pesos de tumor bajos, indicando la consistencia del efecto.

Cuando se calcula el índice del crecimiento del tumor, el grupo de coterapia tiene un TGI de 74.4% en comparación con el grupo de control muy en exceso del criterio de NCI para un efecto positivo ( $TGI \geq 58\%$ ). Taxotere solo tuvo un TGI de 26.1%.

### 7. Estudios en el Modelo de Xenoinjerto ortotópico de Tumor de Seno Humano MDA-231

Este modelo involucra la colocación del tejido de tumor humano en la almohadilla de grasa mamaria del ratón, un sustituto del ambiente natural. En esta forma se evita la posibilidad de un efecto positivo debido a una acción específica en el lecho vascular subcutáneo. Este estudio comparó el efecto de KPU-2 (7.5 mg/kg ip, q3dx5) solo y en combinación con paclitaxel (16 mg/kg ip, qdx5).

Tres semanas con el estudio tuvieron una inhibición significativa del crecimiento del tumor en el grupo de terapia de combinación, un efecto altamente significativo. Este efecto pareció ser más marcado que para taxotere solo (Figura 28).

### 8. Estudios en el Modelo de Tumor Metastásico B16 F10 de Melanoma Murino

Este estudio examinó el efecto de KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina solos y en combinación con paclitaxel en el número de metastasis que aparecieron en la superficie del pulmón 16 días después de la inyección intravenosa de las células de melanoma B16 F10 en el ratón. Este modelo no es un modelo de xenoinjerto; sin embargo, no involucra un alto grado de vascularización en la masa del tumor.

En este modelo el tratamiento más efectivo fue KPU-2 solo (Figura 29) que tiene un conteo de metastasis medio aproximado de 10% menos que para paclitaxel (MGIs de 41.6% y 35.0% respectivamente). Aunque este estudio no establece por sí mismo esa terapia de combinación, es más efectivo que la monoterapia, esto indica que KPU-2, KPU-35 y t-butil-fenilhistina son más efectivos en tumores altamente vascularizados.

### Ejemplo 10

#### Ensayos para la Actividad Contra Hongos Patógenos

La actividad comparativa de una deshidrofenilhistina o su análogo contra un hongo patógeno, relacionado con los compuestos antifúngicos conocidos anteriormente citados, para utilizarse en determinar el valor AF/IS de la deshidrofenilhistina o sus análogos se mide directamente contra el organismo fúngico, e.g., mediante la adaptación de la placa de microtitulación del método de macrodilución de caldo de NCCLS descrito en *Diagn Micro and Infect Diseases* 21:129-133 (1995). También puede determinarse la actividad antifúngica en modelos animales completos de la infección fúngica. Por ejemplo, se puede emplear el modelo de ratón tratado con esteroide de la mucormicosis pulmonar (Goldaill, L.Z. & Sugar, A.M. 1994 *J Antimicrob Chemother* 33:369-372). A manera de ilustración, en tales estudios, un número de animales no se le dió deshidrofenilhistina o su análogo, varias dosis de deshidrofenilhistina o su análogo (y/o combinaciones con uno o más de otros agentes antifúngicos) o un control positivo (e.g., Amfotericina B) respectivamente, iniciando antes al momento o subsecuente a la infección con los hongos. Los animales pueden tratarse una vez cada 24 horas con la dosis seleccionada de la deshidrofenilhistina o su análogo, el control positivo o vehículo solamente. El tratamiento se continuó para un número predeterminado de días, e.g., hasta diez días. Se observaron los animales por algún tiempo después del periodo de tratamiento, e.g., por un total de tres semanas, valorándose la mortalidad diaria. Los modelos pueden involucrar modelos sistémicos, pulmonares, vaginales y otros de la infección con o sin otros tratamientos (e.g., tratamiento con esteroides) diseñados para imitar un sujeto humano susceptible a la infección.

Para ilustración adicional, un método para determinar la eficacia terapéutica *in vivo* (ED<sub>50</sub>, e.g., deshidrofenilhistina expresada en mg o su sujeto análogo/kg) es un sistema de modelo de roedor. Por ejemplo, un ratón se infecta con el patógeno fúngico mediante infección intravenosa con aproximadamente 10 veces el 50% de la dosis letal del patógeno (10<sup>6</sup> C, células albicans/ratón). Inmediatamente después de la infección fúngica, los compuestos de deshidrofenilhistina se dan al ratón a un volumen de dosis predeterminado. El ED<sub>50</sub> se calcula mediante el método de Van der Waerden (*Arch Exp Pathol Pharmacol* 195:389-412, 1940) a partir de la tasa de supervivencia registrada en el 20.º día post-infección. Generalmente, los animales de control no tratados mueren de 7 a 13 días post-infección.

En otra modalidad ilustrativa, *C. Albicans* Wisconsin (C43) y *C. Tropicalis* (C112), crecieron sobre tubos inclinados de cultivo de agar de dextrosa Sabouraud (SDA) durante 48 h a 28°C, se suspendieron en salina y se ajustaron a 46% de la transmisión a 550 nm sobre un espectrofotómetro. El inóculo se ajustó adicionalmente mediante el hemacitómetro y se confirmó mediante los conteos de placa para ser aproximadamente de 1 ó 5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml. Los ratones CF-1 se infectaron mediante inyección 1 ó 5 x 10<sup>6</sup> CFU en la vena de la cola. Los agentes antifúngicos se administraron intravenosa o subcutáneamente en etanol:agua (10:90), 4 h post-infección y una vez al día de ahí en adelante durante 3 ó 4 días más. La supervivencia se monitorizó diariamente. El ED<sub>50</sub> puede definirse como la dosis que permite el 50% de supervivencia de los ratones.

### Ejemplo 11

#### Evaluación de La Actividad Antimicótica

Los bencimidazoles y griseofulvina son agentes anti-tubulina capaces de enlazarse a los microtúbulos fúngicos. Una vez enlazados estos compuestos interfieren con la división celular y el transporte intracelular en organismos sensi-



bles, dando como resultado la muerte celular. Se utilizan comercialmente los bencimidazoles como agentes fungicidas en la medicina veterinaria y control de enfermedades de plantas. Una amplia variedad de especies fúngicas, incluyendo *Botrytis cinerea*, *Beauveria bassiana*, *Helminthosporium solani*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus* son susceptibles a estas moléculas. La toxicidad concierne e incrementa la resistencia a la droga, sin embargo, tiene su uso negativamente impactado. La griseofulvina se utiliza clínicamente para tratar las infecciones de tiña de la piel, cabello y uñas causadas por la *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.* y *Epidermophyton floccosum*. Sin embargo, su espectro antifúngico se restringe a esta clase de organismos fúngicos. La genotoxicidad también es un efecto colateral significativo. La terbinafina aunque es un tratamiento de primera línea alternativo, es más costosa. Además, se ha observado recientemente la resistencia química en *Trichophyton rubrum* (el principal agente causante de todas las infecciones de dermatofito).

En *Candida albicans*, la formación del microtúbulo/microfilamento se afecta cuando las células se exponen a los inhibidores de microtúbulo mocodazol y cloropropam. Estos resultados validan además la exploración de los inhibidores del citoesqueleto como agentes antimicóticos efectivos. De acuerdo con lo anterior, varios de los compuestos descritos en la presente se evaluaron para la actividad antimicótica.

Específicamente, los compuestos descritos se evaluaron junto con los inhibidores de microtubulina comercialmente disponibles así como agentes antifúngicos reconocidos. Los compuestos y controles de prueba utilizados en este estudio: (-)-Fenilalhistina, KPU-1, KPU-2, KPU-11 y KPU-17, KPU-35, t-butil-fenilalhistina, Colchicina (inhibidor de microtubulina comercial probado *versus Candida* 3 aislados), Benomil (inhibidor de microtubulina comercial probado *versus Candida* 3 aislados), Griseofulvina (inhibidor de microtubulina comercial y control antibiótico para prueba *versus* 6 dermatofito aislados), Anfotericina B (control antibiótico para prueba *versus Candida* 3 aislados), Itraconazol (control antibiótico para prueba *versus Aspergillus* 2 aislados).

Los microorganismos contra los cuales se probaron estos compuestos incluyen: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*. Con la excepción de *Candida glabrata* (un aislado), se probaron dos aislados de cada especie.

La prueba de susceptibilidad antifungal se llevó a cabo de acuerdo con los métodos resumidos en el National Committee for Clinical Laboratory Standards, M38-A "Reference Method for Broth Dillution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard". Esto incluye las pruebas en RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato, un tamaño de inóculo de  $0.4-5 \times 10^4$  e incubación a 30 ó 35°C durante 48 horas. La concentración inhibidora mínima (MC) se definió como la concentración más baja que dio como resultado una reducción de 80% de turbiedad en comparación a un tubo de control libre de droga. Las concentraciones de la droga fueron 0.03-16 µg/ml para los compuestos investigados, 0.015-8 µg/ml para itraconazol y griseofulvina.

La concentración inhibidora mínima (MIC) a la cual un compuesto evitó el crecimiento del microorganismo objetivo se valoró de acuerdo con la versión modificada del protocolo NCCLS. Las concentraciones inhibidoras mínimas (MIC) se determinaron en las primeras 24 horas de intervalo en donde pudo determinarse el crecimiento en el tubo de control libre de droga. El MIC definido fue la concentración más baja que exhibió un 80% de reducción en turbiedad en comparación con el control del crecimiento. Se determinó la concentración mínima letal (MLC) al colocar en placas 0.1 µl de la concentración de MIC y cada cocentración arriba del MIC. El MCL se nombró en la primera concentración que exhibió cinco o algunas colonias del crecimiento fungal representando un 99.95% de eliminación. Cuando se obtuvo un MIC, se determinó una mínima concentración fungicida (MFC) para valorar la naturaleza fungistática/fungicida del compuesto. Este procedimiento provoca la dilución de las muestras de célula tratadas con droga (retiradas a partir de los pozos de prueba que contienen el compuesto en y por arriba de MIC) para las concentraciones del compuesto significativamente por debajo de la concentración de inhibición y depositándolas en placas de agar. El compuesto se registró como fungistático si las células son capaces de recuperar el crecimiento y fungicida si no es posible el re-crecimiento debido a que el compuesto eliminó los organismos.

Los compuestos descritos en la presente demostraron ser efectivos contra dos especies de *Trichophyton*. *T. rubrum* es el principal agente causante para las infecciones dermatofíticas humanas y puede ser el organismo clave para el objetivo en el desarrollo de un agente clínico.

Los compuestos KPU-2, KPU-11 y KPU-17, KPU-35 y t-butilfenilalhistina fueron equivalentes en potencia o en algunos casos más potentes que la griseofulvina, un agente farmacéutico estándar actual utilizado para tratar infecciones dermatofíticas.

Los compuestos (-)-Fenilalhistina y KPU-1 fueron significativamente menos potentes que los otros compuestos cuando se probaron *versus T. rubrum* y más débiles pero más comparables con los otros *versus T. mentagrophytes* sensible aislado.

En estos casos cuando puede determinarse un MFC, los resultados indican que estos compuestos son de naturaleza fungistática (ver las Tablas 19 y 20).

Tabla 19. Actividad Antifúngica de Deshidrofialahistinas y sus Análogos

Compuestos	MICs y MFCs, $\mu$ g/ml									
	<i>C. albicans</i> 90028		<i>C. albicans</i> 10231		<i>C. glabrata</i>		<i>A. fumigatus</i> aislado #1		<i>A. fumigatus</i> aislado #2	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
(-)-Fenilahistina	>70	ND**	>70*	ND	>70	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-1	>68*	ND	>68	ND	>68	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-2	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-11 y KPU-17	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	0.06	>16
KPU-35	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	<0.03	0.125
t-butil fenilahistina	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	<0.03	0.125
anfotericina B	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	ND	ND	ND	ND
griseofulvina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	ND
itraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
colchicina	>128	ND	>128	ND	>128	ND	ND	ND	ND	ND
benomilo	64	>512	64	>512	64	>512	ND	ND	ND	ND

Tabla 20. Actividad Antifúngica de Deshidrofeliahistinas y sus Análogos

Compuestos	MICs y MFCs, $\mu$ g/ml											
	<i>T. rubrum</i> aislado #1			<i>T. rubrum</i> aislado #2			<i>T. mentagrofites</i> aislado #1			<i>T. mentagrofites</i> aislado #2		
	MIC	MFC		MIC	MFC		MIC	MFC		MIC	MFC	
NPI2350	>16	ND		0.16	>16		16	>16		>16	ND	
NPI2352	>16	ND		0.25	>16		4	>16		>16*	ND	
NPI2358	>16	ND		<0.03	0.125		2	>16		>16	ND	
NPI2362	0.06	>16		<0.03	<0.03		1	>16		>16	ND	
NPI2386	<0.03	0.125		<0.03	0.06		1	>16		>16	ND	
NPI2460	<0.03	0.125		<0.03	<0.03		4	>16		>16	ND	
anfotericina B	ND	ND		ND	ND		ND	ND		ND	ND	
griseofulvina	0.5	ND		<0.015	ND		1	ND		2	ND	
itraconazol	ND	ND		ND	ND		ND	ND		ND	ND	
colchicina	ND	ND		ND	ND		ND	ND		ND	ND	
benomilo	ND	ND		ND	ND		ND	ND		ND	ND	

## ES 2 295 695 T3

Los ejemplos anteriormente descritos se establecen solo para ayudar al entendimiento de la invención. Así, aquellos expertos en la técnica apreciarán que los métodos y compuestos descritos abarcan y pueden de otro modo proporcionar derivados adicionales de las deshidrofenilhistinas.

5 El experto en la técnica podrá apreciar fácilmente que la presente invención se adapta bien para obtener por ejemplo, los fines y ventajas mencionados así como otros inherentes. Los métodos y procedimientos descritos en la presente son actualmente representativos de las modalidades preferidas y son ejemplificativos. Los cambios en la presente y otros usos se les ocurrirán a los expertos en la técnica los cuales están dentro del espíritu de la invención.

10 Será fácilmente aparente para el experto en la técnica que pueden hacerse varias sustituciones y modificaciones a los ejemplos descritos en la presente sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Como se anotó arriba, todas las patentes y publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas de los niveles de aquellos expertos en la técnica a los cuales pertenece la invención.

15 La invención descrita ilustrativamente en la presente puede practicarse adecuadamente en la ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, las cuales no se describen específicamente en la presente. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación y no existe la intención de que el uso de tales términos y expresiones indique la exclusión de equivalentes de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas. Debe reconocerse que son posibles varias modificaciones dentro del  
20 alcance de la invención. Así, debe entenderse que aunque la presente invención se ha descrito específicamente mediante las modalidades preferidas y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente puede recurrirse por aquellos expertos en la técnica y que tales modificaciones y variaciones se considera que caen dentro del alcance de la invención. El alcance de la invención solo se define mediante las siguientes reivindicaciones.  
25

30

35

40

45

50

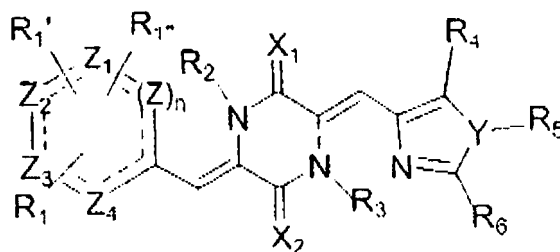
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación sintética de un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (1):



en la que

$R_1$ ,  $R_4$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno por separado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en la que  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxi,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en la que  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{24}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalquenilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1''$  se enlazan covalentemente entre sí para formar un anillo o no se enlazan covalentemente entre sí;

$R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno por separado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado, alquenilo  $C_1$ - $C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

$X_1$  y  $X_2$  se seleccionan separadamente del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, cada uno de ellos sustituido o no sustituido con un grupo  $R_5$ , como se definió anteriormente;

$Y$  se selecciona del grupo que consiste en un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con  $R_5$ , un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

$n$  es un entero igual a cero, uno o dos;

$Z$ , para cada  $n$  separada, si no es cero y  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  se seleccionan cada uno por separado de entre un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

las uniones a trazos pueden ser ya sea de enlaces sencillos o dobles;

dicho método comprende:

hacer reaccionar una diacildicetopiperazina con un primer aldehído para producir un compuesto intermediario;

y

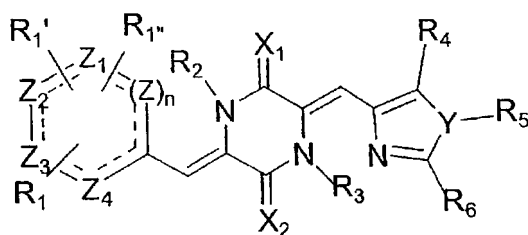
hacer reaccionar dicho compuesto intermediario con un segundo aldehído para producir dicho compuesto, en el que dicho primer aldehído y dicho segundo aldehído se seleccionan del grupo que consiste en un oxazolacarboxialdehído,

imidazolcarboxaldehído, un benzaldehído, derivados de imidazolcarboxaldehído y derivados de benzaldehído, para formar el compuesto.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer aldehído es un imidazolcarboxaldehído o benzaldehído.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho segundo aldehído es un benzaldehído o imidazolcarboxaldehído.

4. Compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (1):



(I)

en la que

$R_1$  y  $R_6$  se seleccionan cada uno por separado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueniilo  $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en la que  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueniilo  $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_4$  es un grupo butilo terciario;

$R_1'$  y  $R_1''$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueniilo  $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido, hidroxilo, carboxilo,  $-CO-O-R_7$ , ciano, alquiltio, alquilo halogenado incluyendo alquilo polihalogenado, carbonilo halogenado y carbonilo  $-CCO-R_7$  en la que  $R_7$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1-C_{24}$  saturado, alqueniilo  $C_1-C_{24}$  insaturado, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, nitro, azido, fenilo y fenilo sustituido;

$R_1'$  y  $R_1$  se enlazan covalentemente entre sí para formar un anillo o no se enlazan covalentemente entre sí;

$R_2$ ,  $R_3$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno por separado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno y grupos alquilo  $C_1-C_{12}$  saturado, alqueniilo  $C_1-C_{12}$  insaturado, acilo, cicloalquilo, alcoxi, cicloalcoxi, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, amino, amino sustituido, y nitro, grupos sulfonilo y sulfonilo sustituido;

$X_1$  y  $X_2$  se seleccionan separadamente del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre cada uno de ellos sustituido o no sustituido con un grupo  $R_5$  como se definió anteriormente;

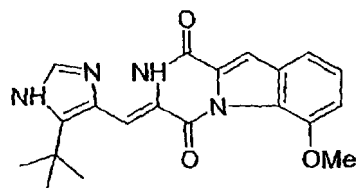
$Y$  se selecciona del grupo que consiste en un átomo de nitrógeno, un átomo de nitrógeno sustituido con  $R_5$ , un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un átomo de azufre oxidado, un grupo metileno y un grupo metileno sustituido;

$n$  es un entero igual a cero, uno o dos;

$Z$ , para cada  $n$  separada, si no es cero y  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  se seleccionan cada uno por separado de entre un átomo de carbono, un átomo de azufre, un átomo de nitrógeno o un átomo de oxígeno; y

las uniones a trazos pueden ser de enlaces sencillos o dobles;

5. Compuesto que tiene la estructura



6. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que cada uno de  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  y  $R_6$  es un átomo de hidrógeno.

7. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  es un átomo de oxígeno.

8. Método o compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R_4$  es un alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado.

9. Método o compuesto según la reivindicación 8, en el que dicho alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  saturado es un grupo butilo terciario.

10. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que  $R_1$  comprende un fenilo sustituido.

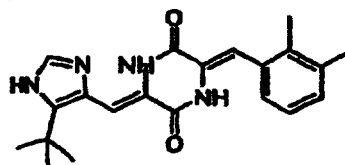
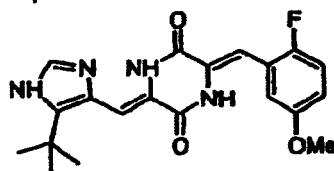
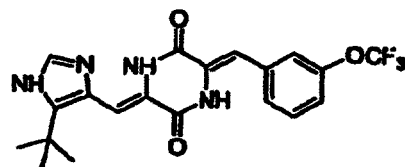
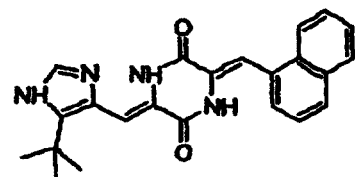
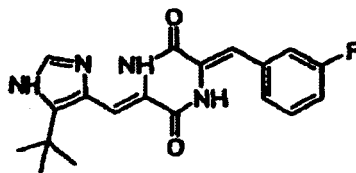
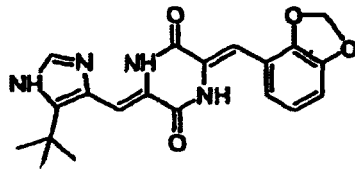
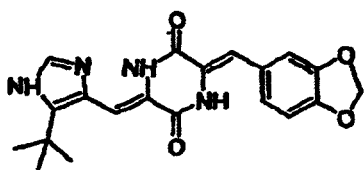
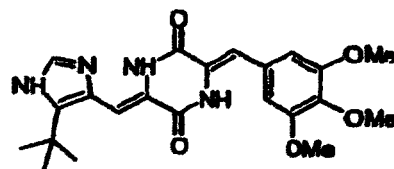
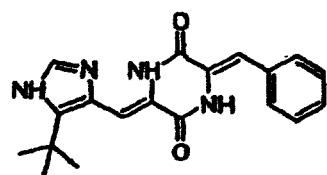
11. Método o compuesto según la reivindicación 10, en el que dicho grupo fenilo sustituido es metoxibenceno.

12. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que  $n$  es igual a cero o uno.

13. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que  $n$  es igual a uno.

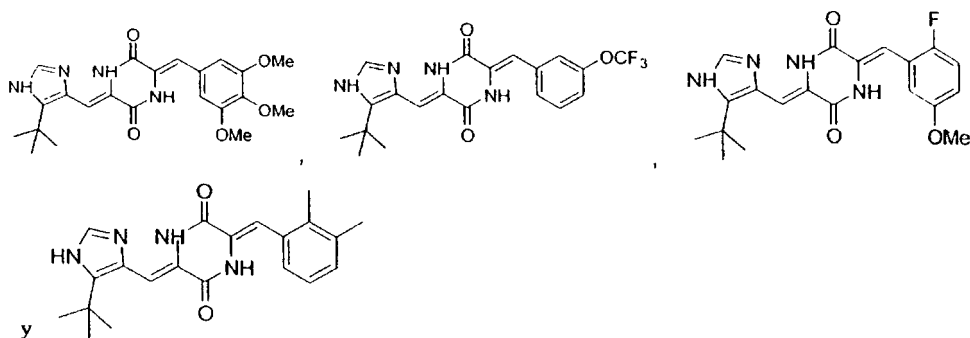
14. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que  $n$  es igual a uno y  $Z$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  son cada uno un átomo de carbono.

15. Método o compuesto según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



16. Composición farmacéutica, que comprende el compuesto de las reivindicaciones 4 ó 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



18. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que dicho compuesto tiene una actividad citotóxica.

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que dicho compuesto es un inhibidor de célula-ciclo.

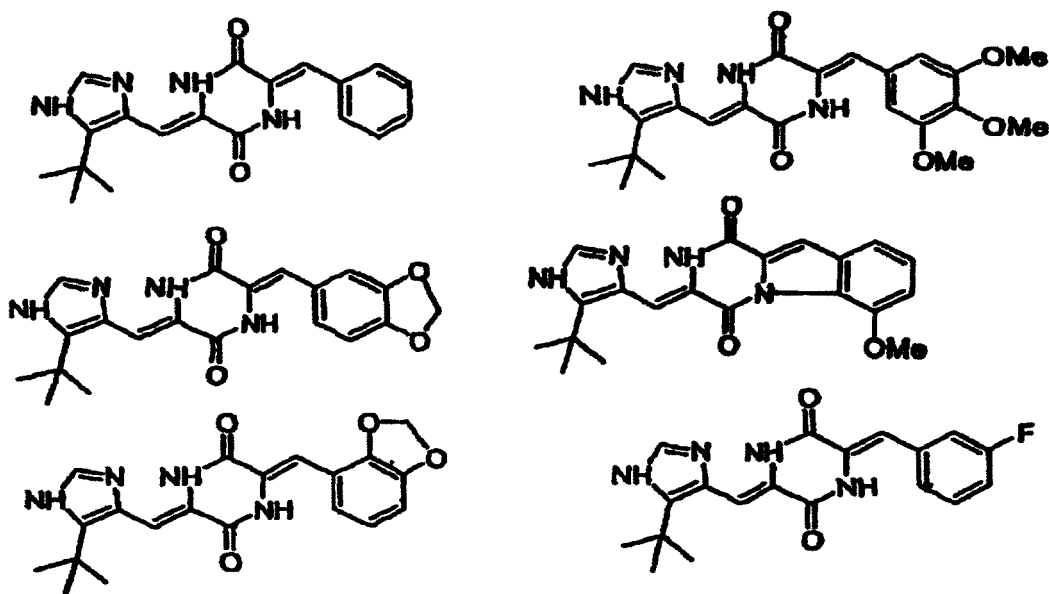
20. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, para el tratamiento o prevención de una infección fúngica.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, para el tratamiento o prevención de tumores.

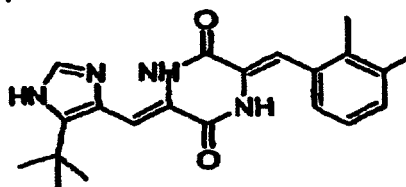
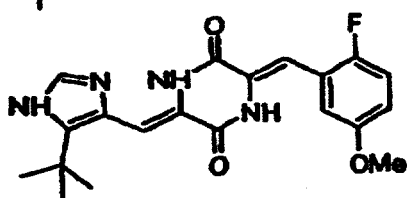
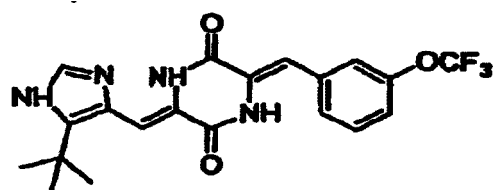
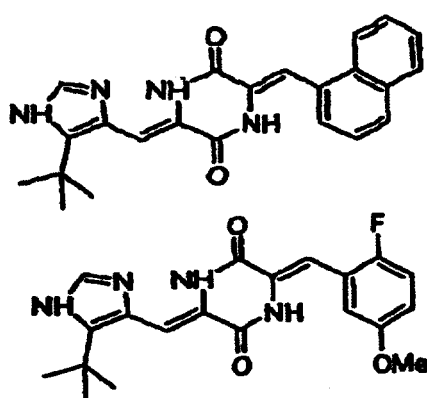
22. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 4 ó 5 en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir como mínimo una infección fúngica en un mamífero afectado de por lo menos una infección fúngica.

23. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 4 ó 5 para la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir cáncer en un mamífero afectado de cáncer.

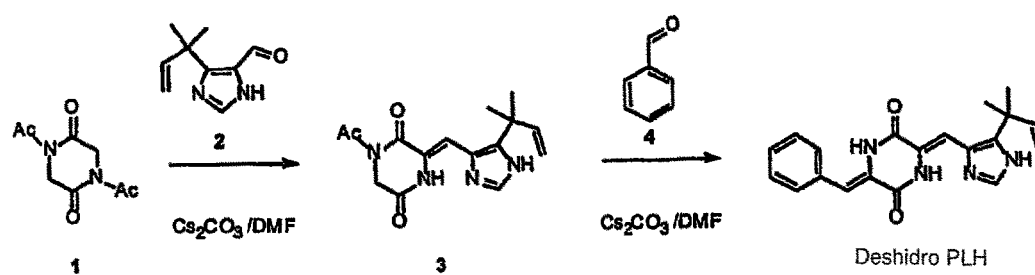
24. Uso según las reivindicaciones 22 ó 23 en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



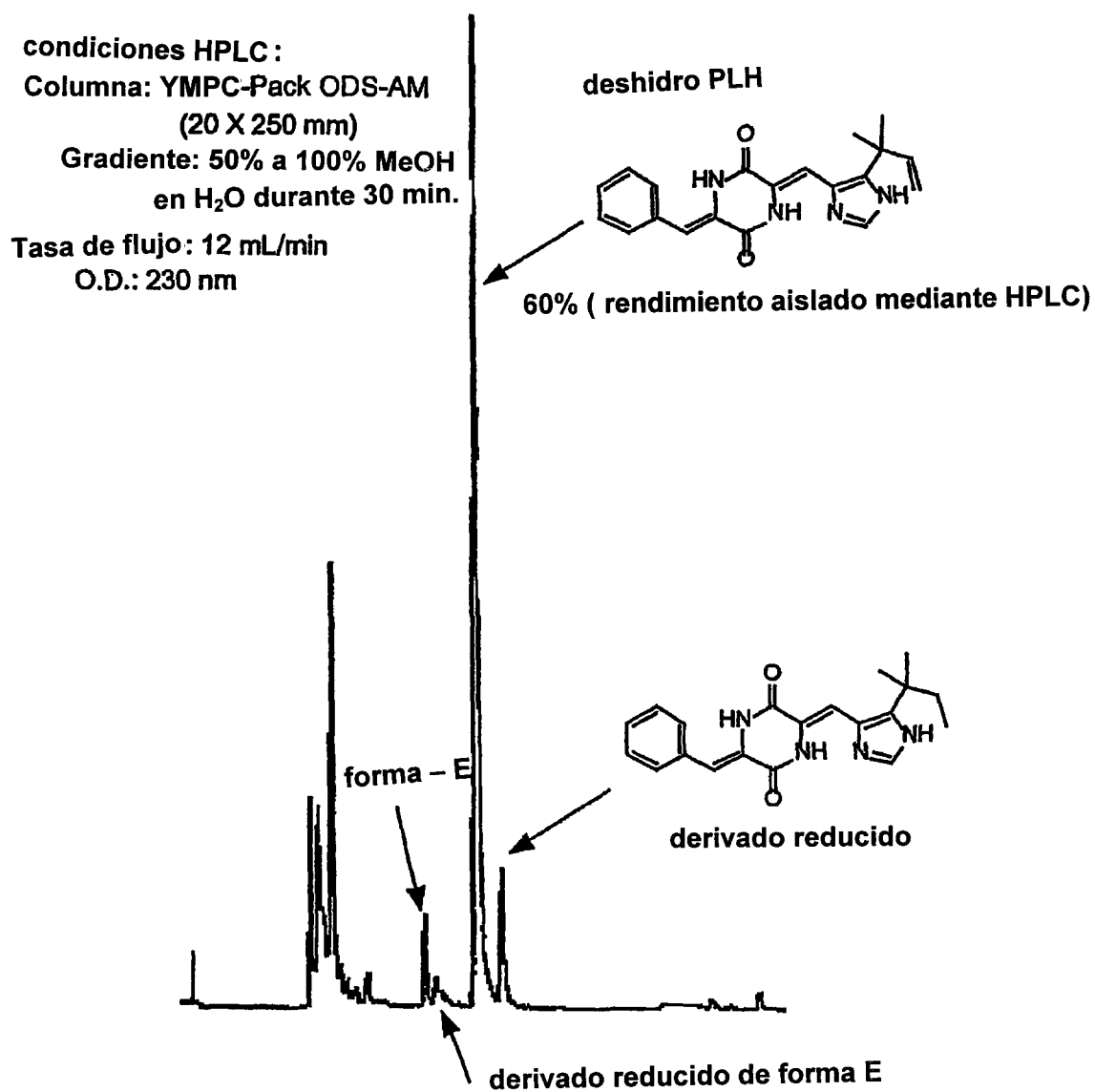




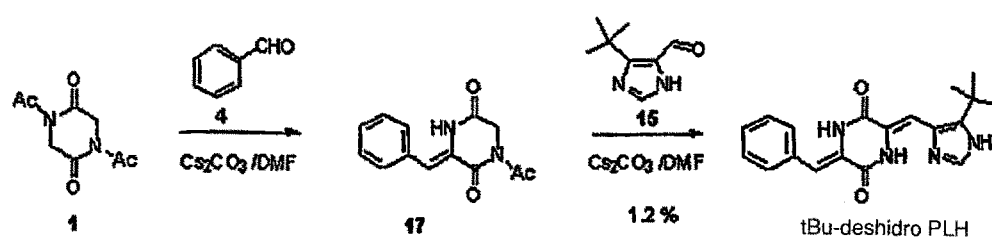
25. Compuesto según las reivindicaciones 4 ó 5 para uso como un medicamento.



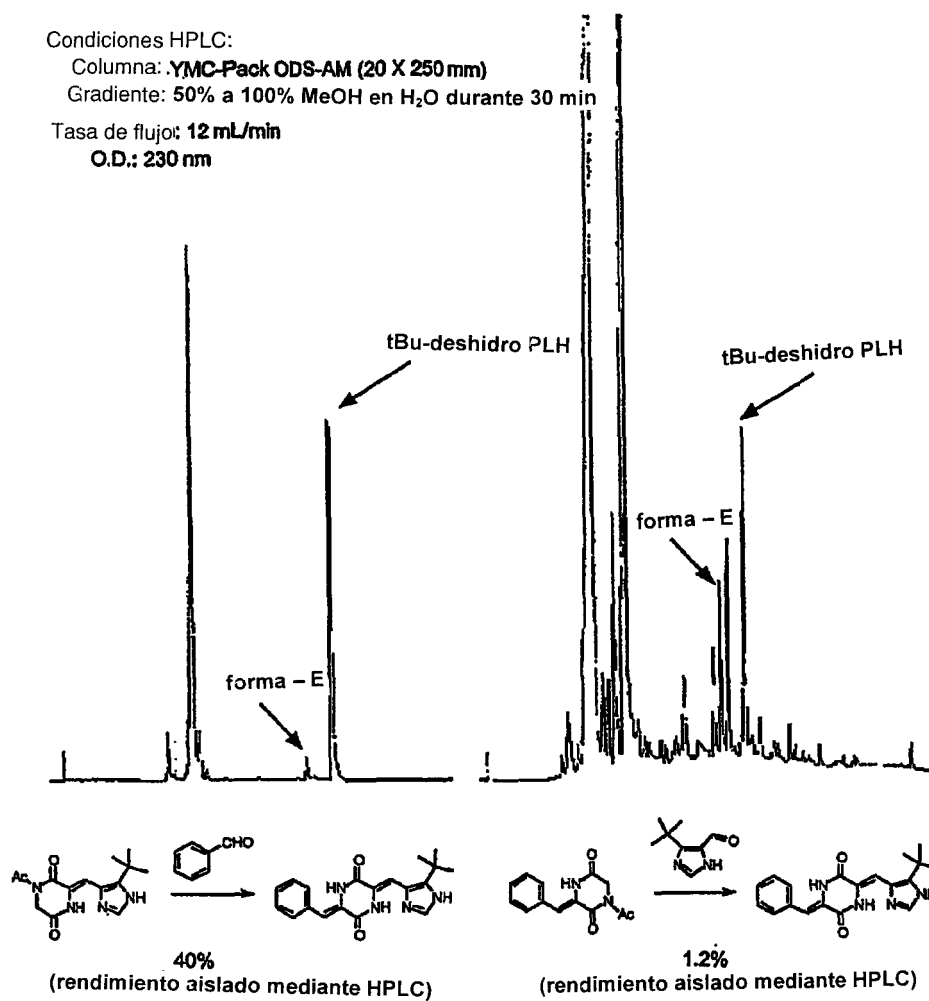
**Fig 1**



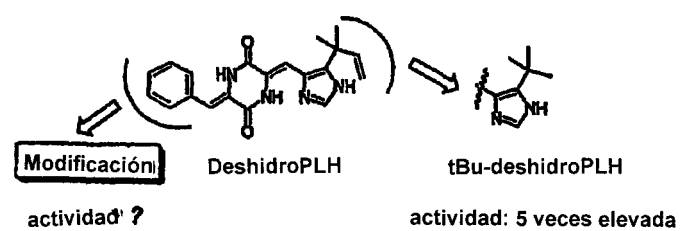
**FIG. 2**



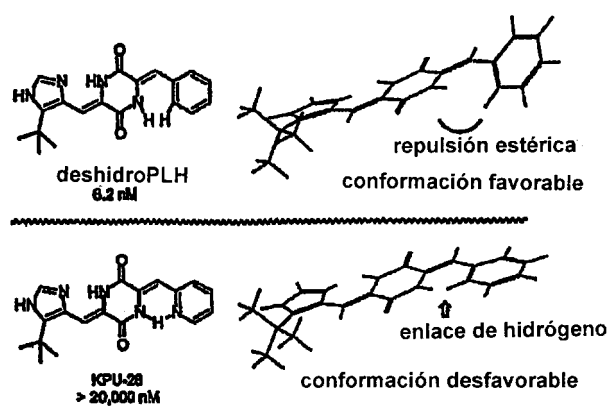
**Fig 3**



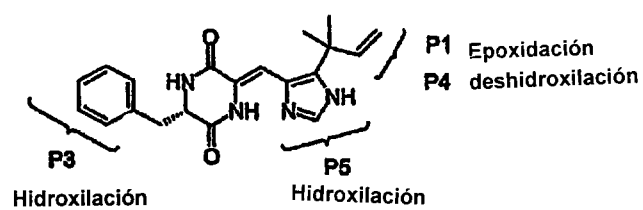
**Fig 4**



**Fig 5**

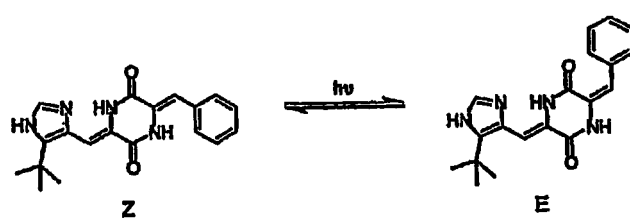


**Fig 6**



**Fig 7**





**FIG 8**

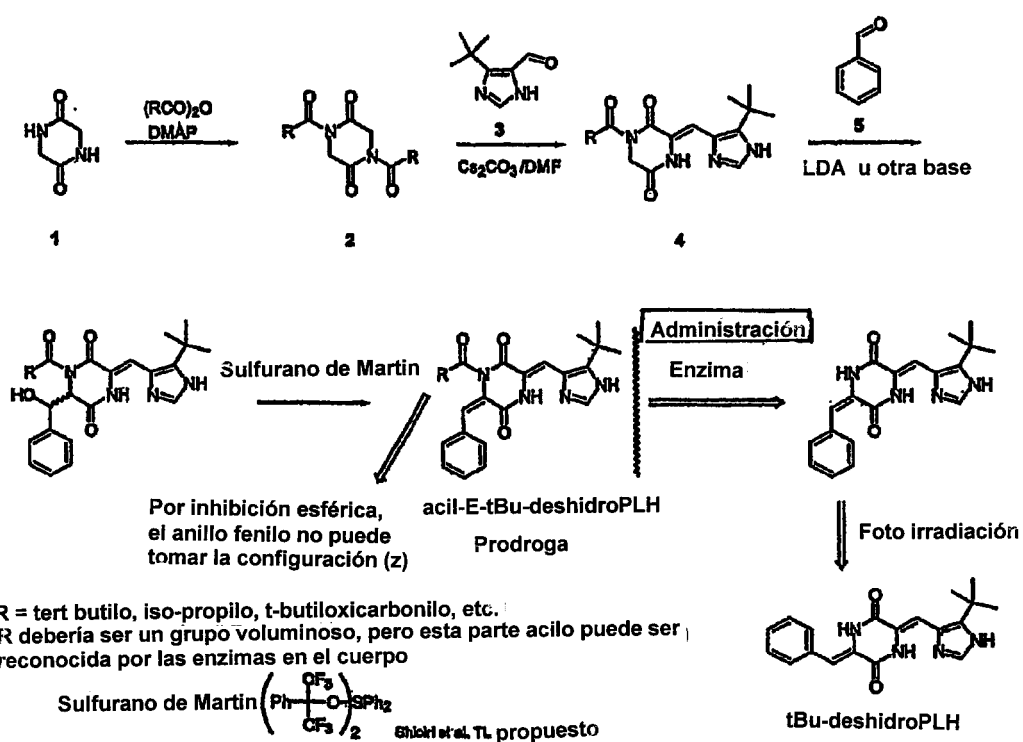
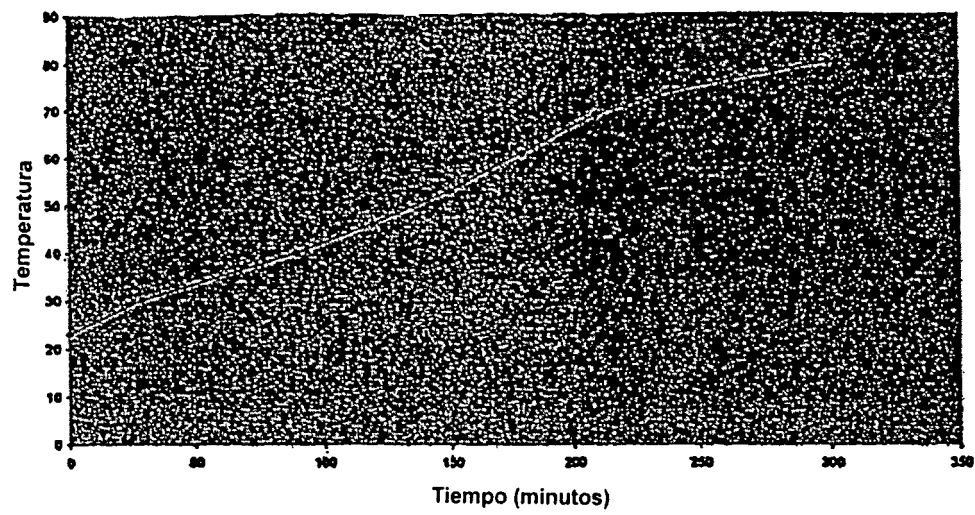


FIG 9



**Fig 10**

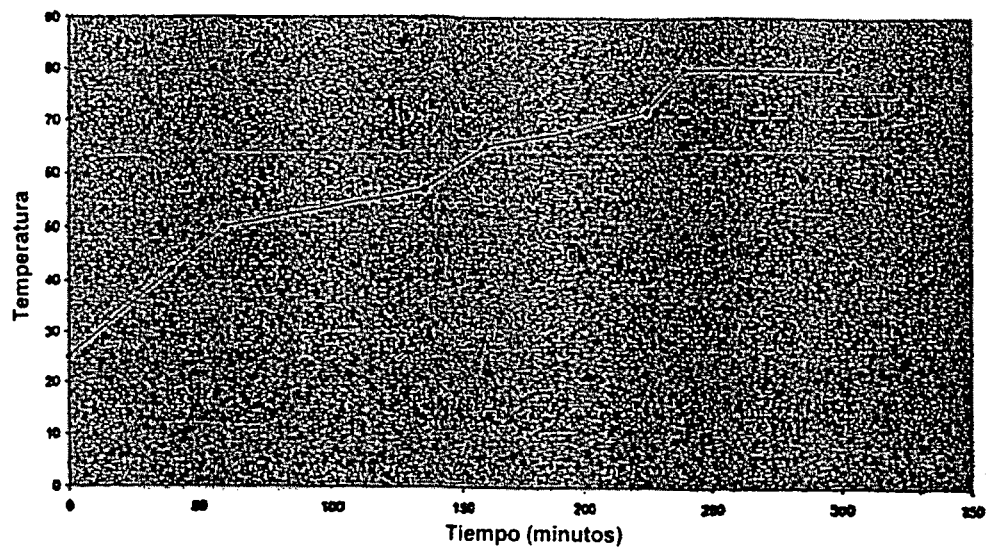


Fig. 11

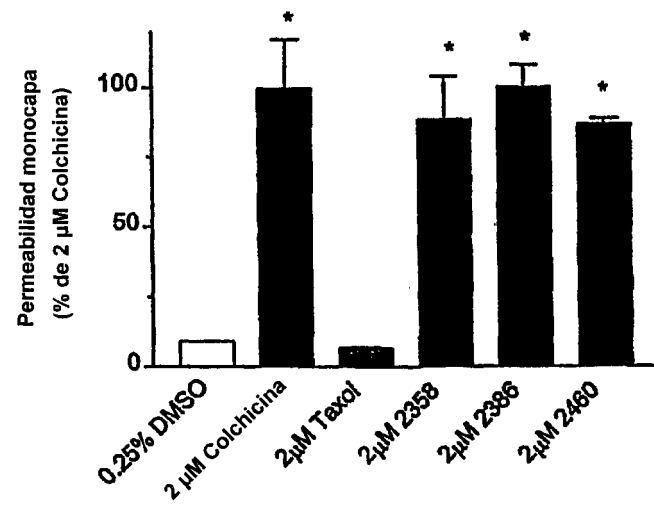


Fig 12

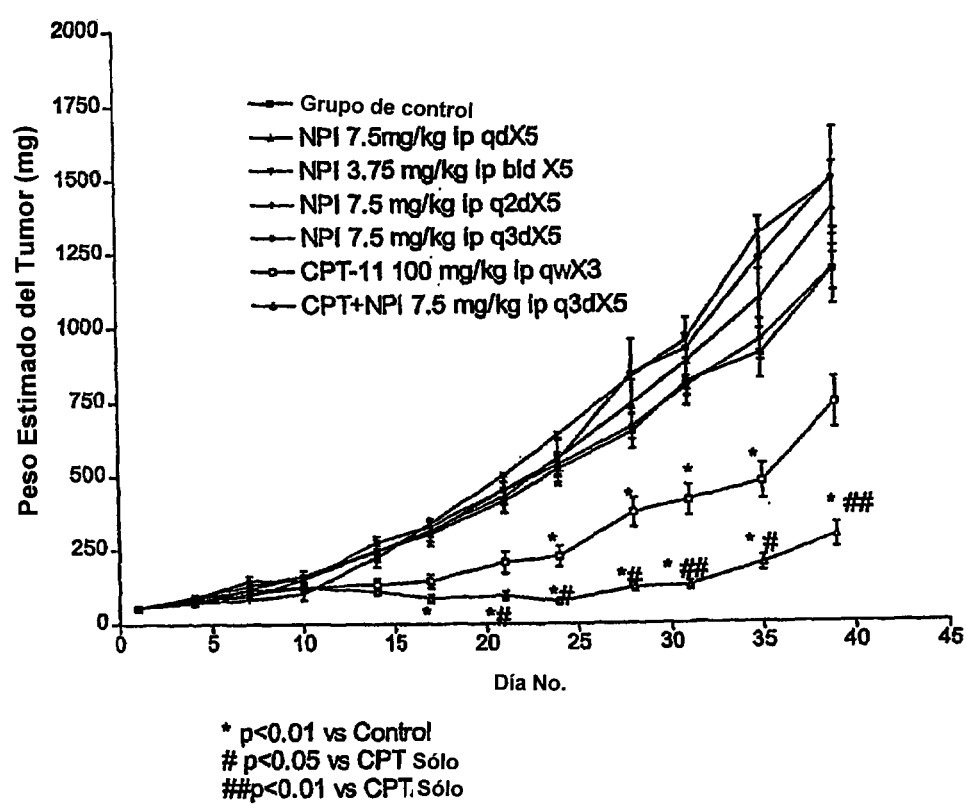
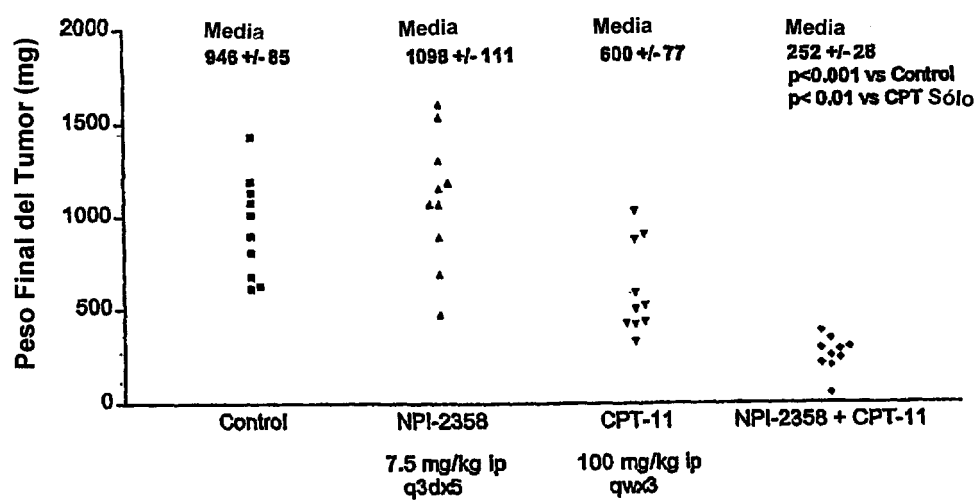
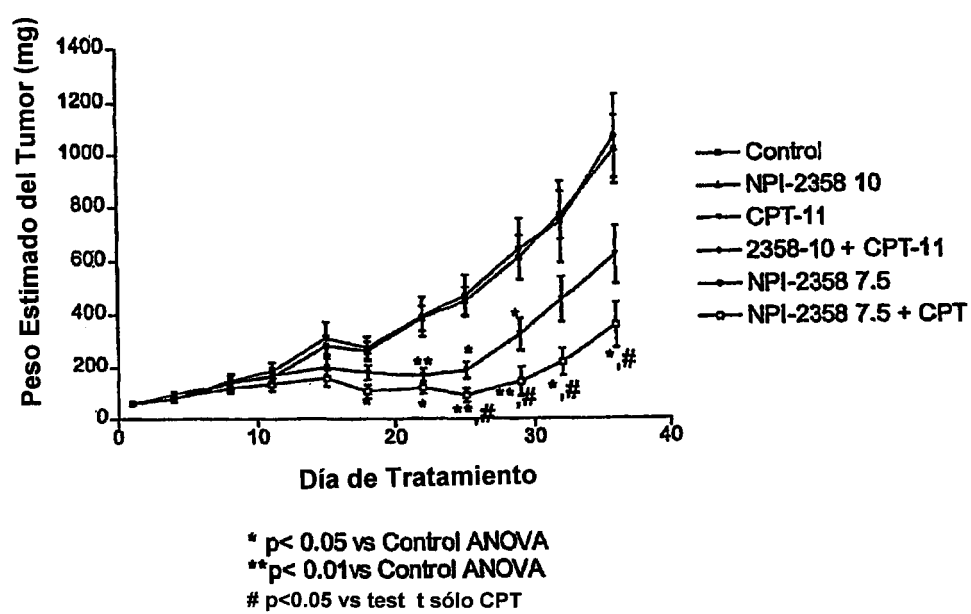


Fig : 13



**Fig 14**



**Fig. 15**



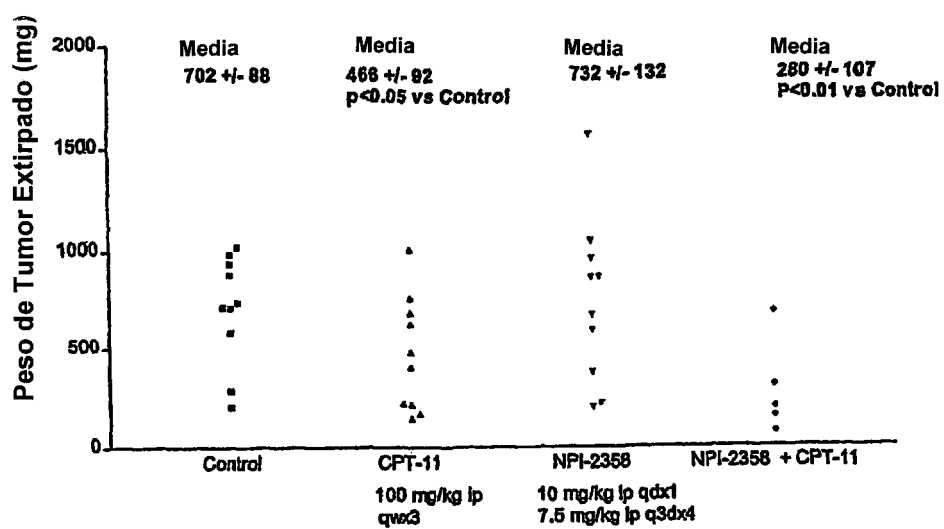


Fig 16

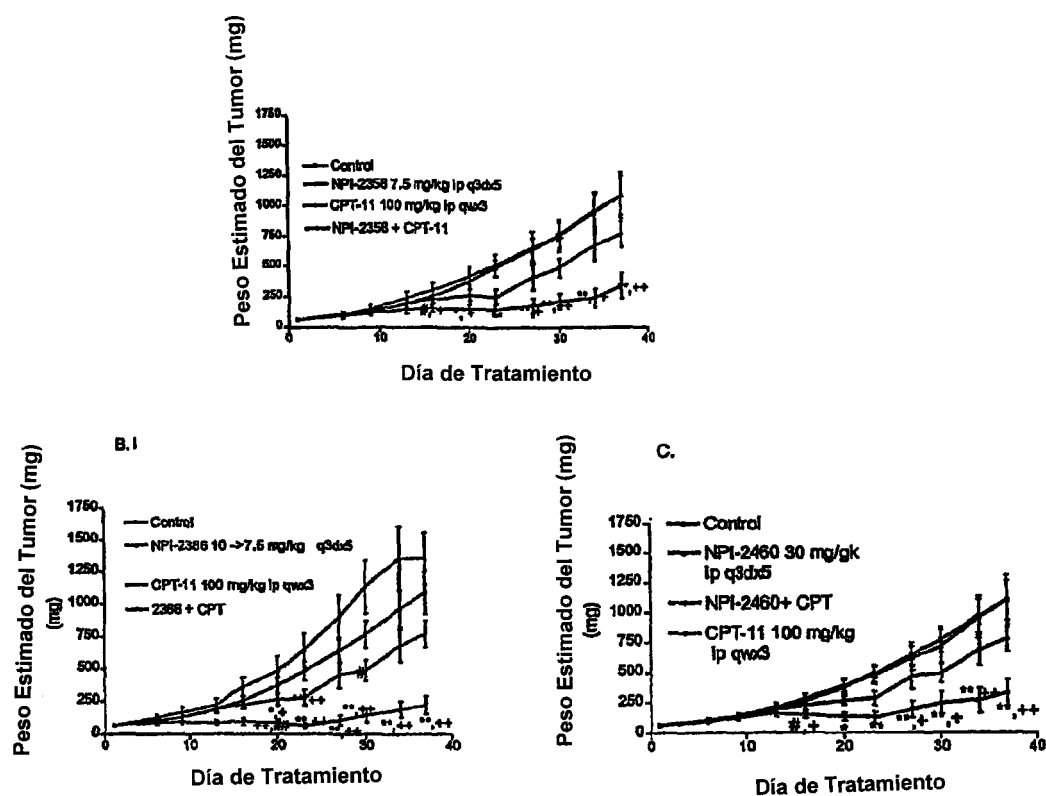
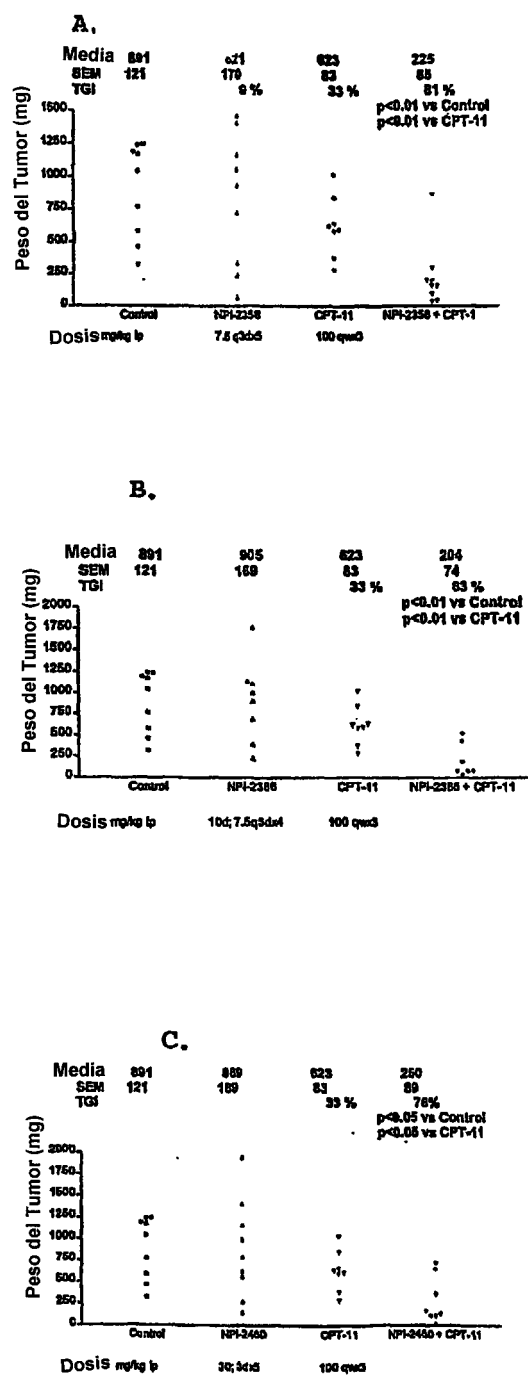
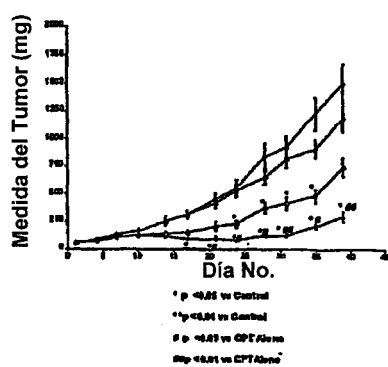


Fig 17

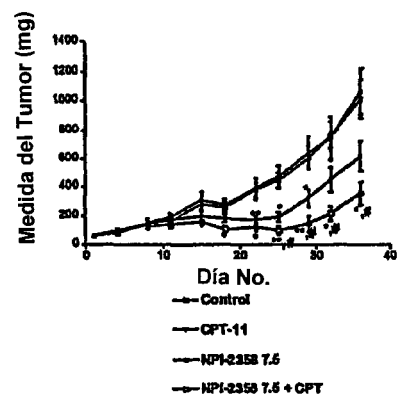


**Fig 18**

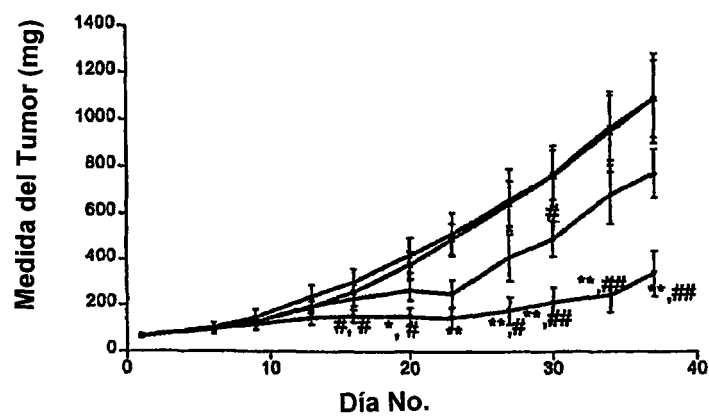
**Estudio 2164**



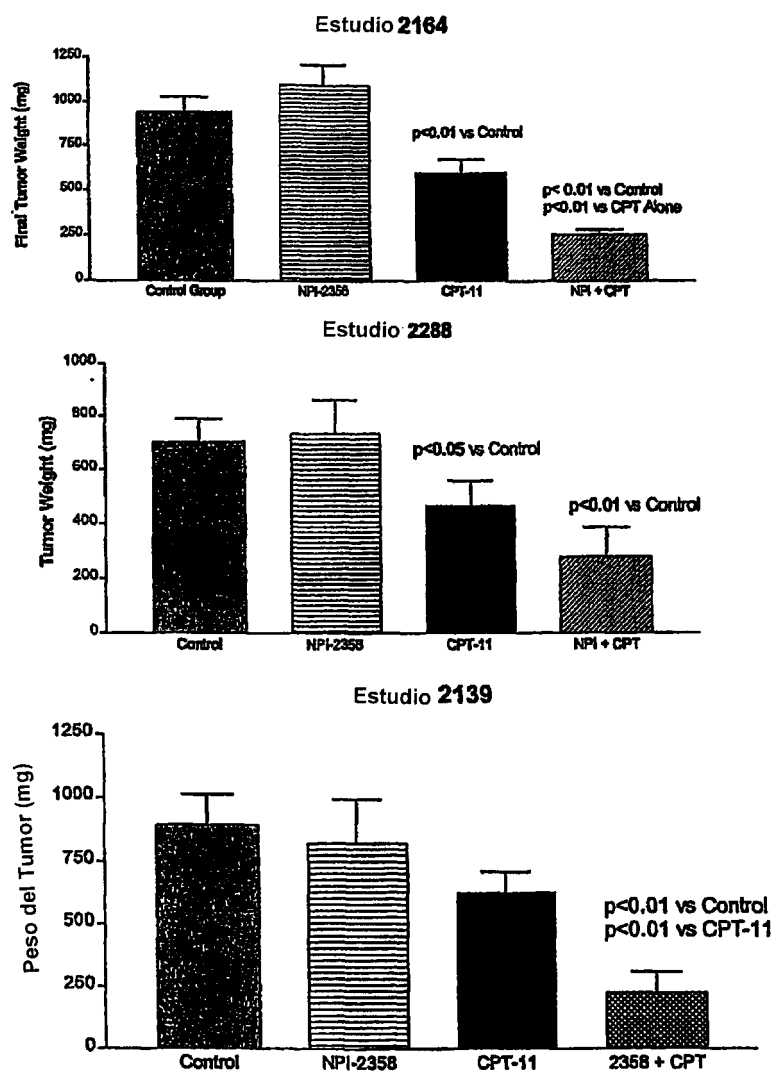
**Estudio 2288**



**Estudio 2139**



**Fig 19**



**Fig 20**

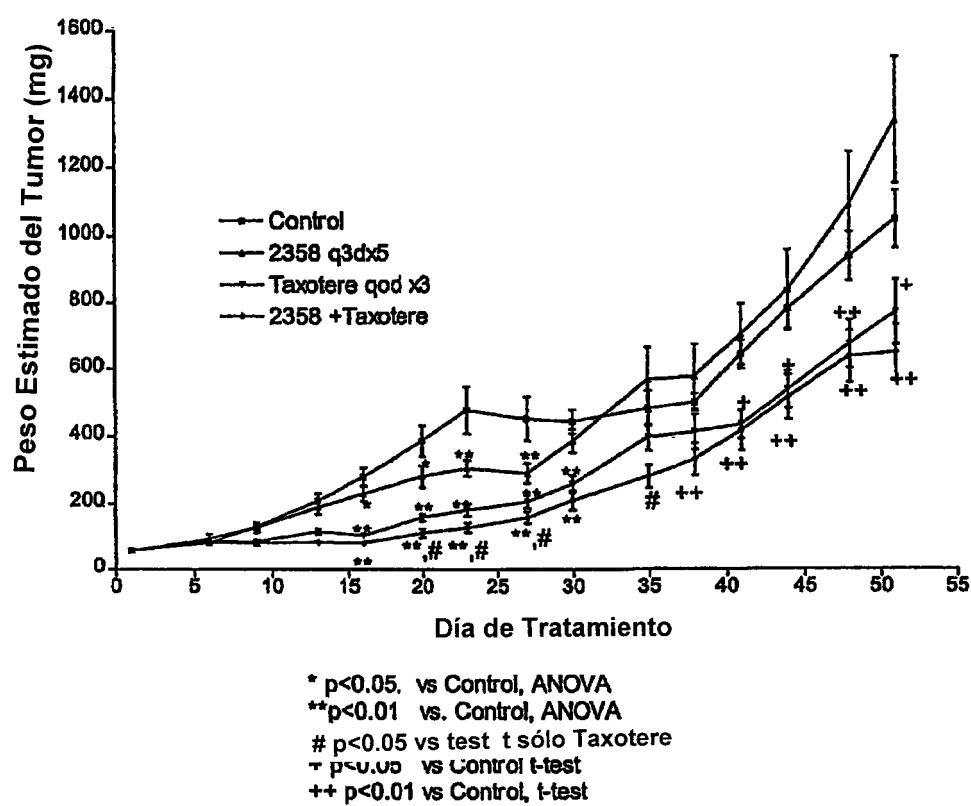


Fig 21

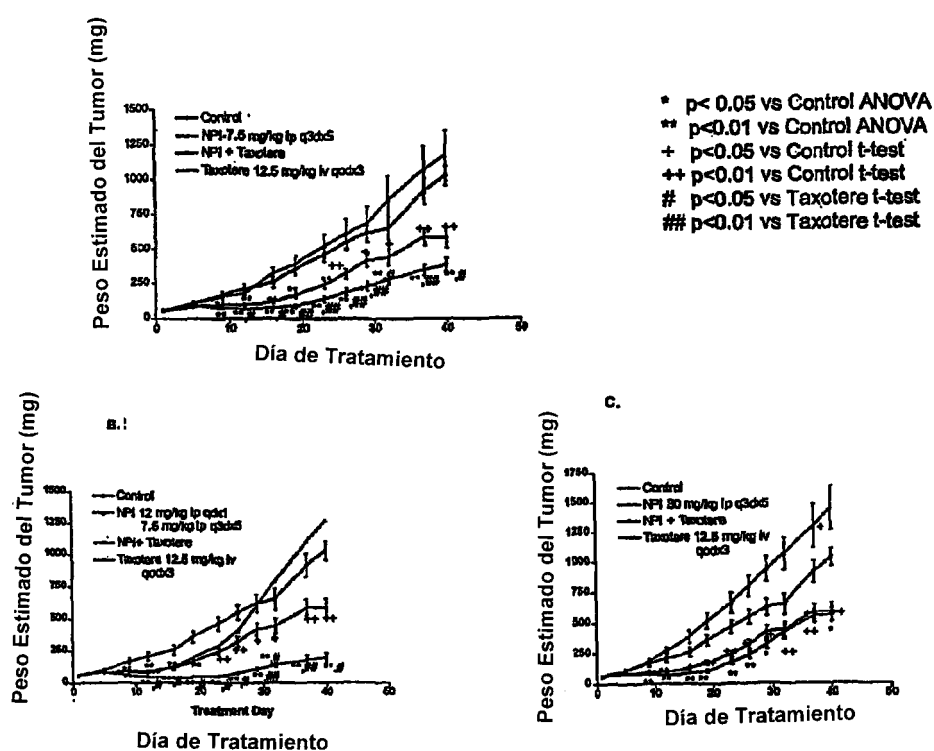
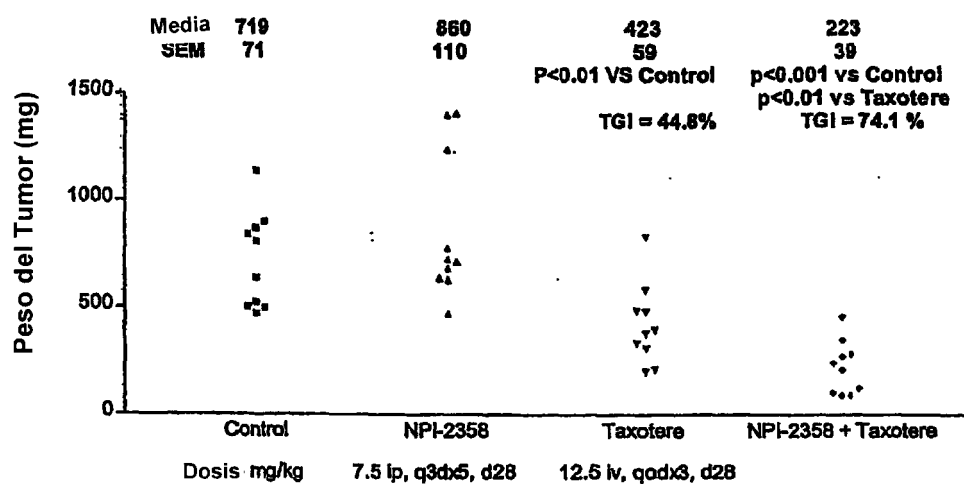
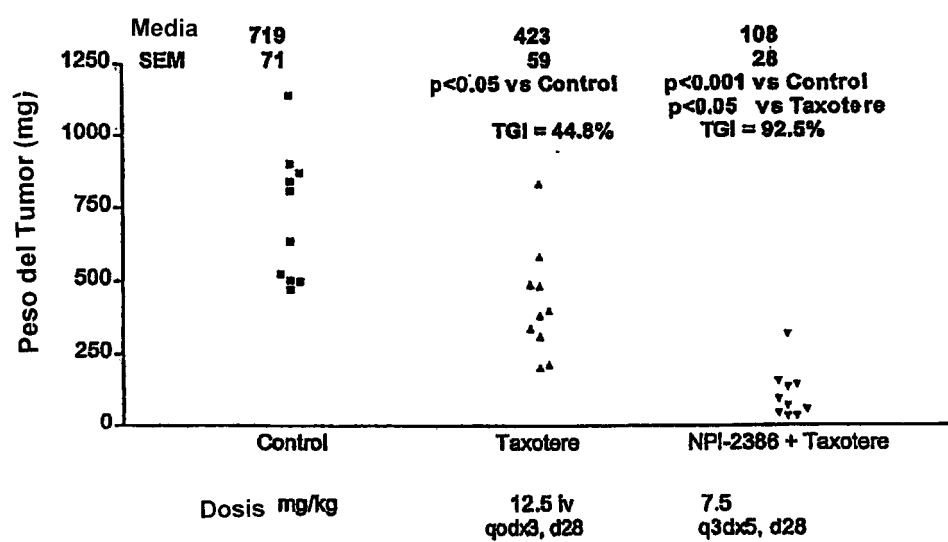


Fig 22

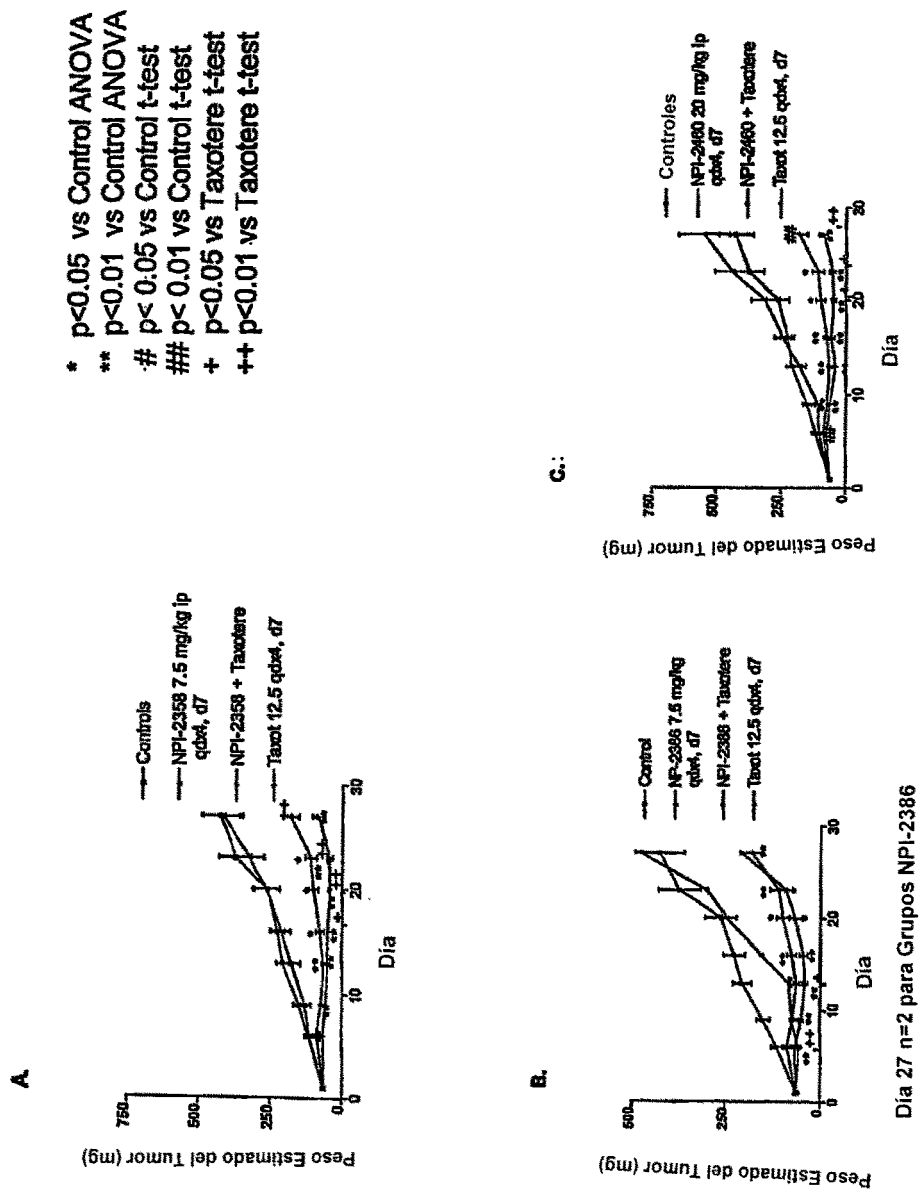


**Fig 23**



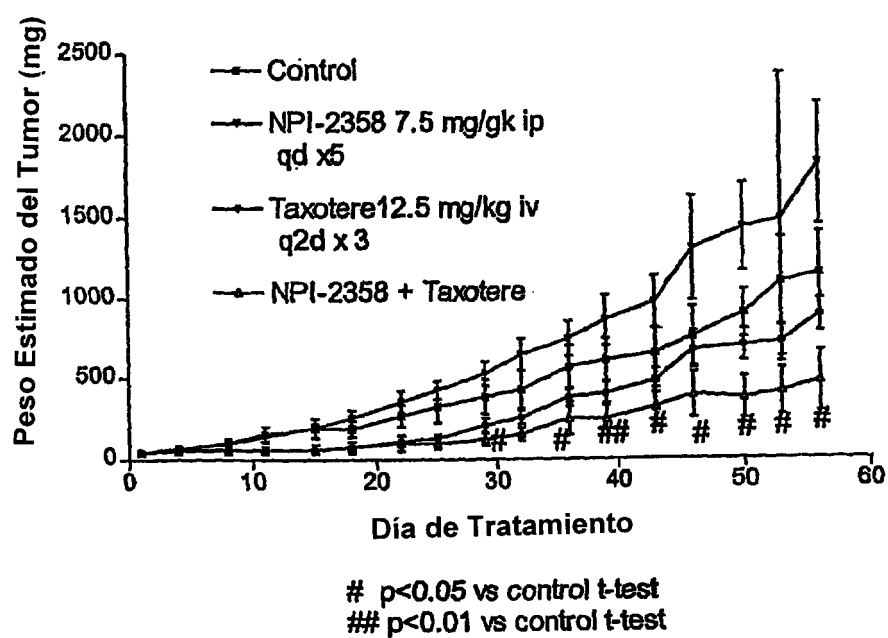


**Fig 24**

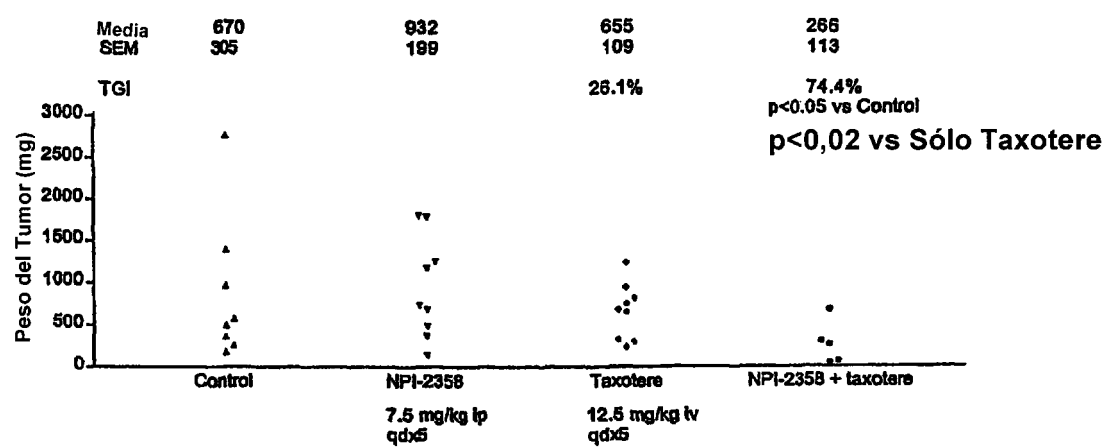


Día 27 n=2 para Grupos NPI-2386

**Fig 25**



**Fig 26**



**Fig 27**

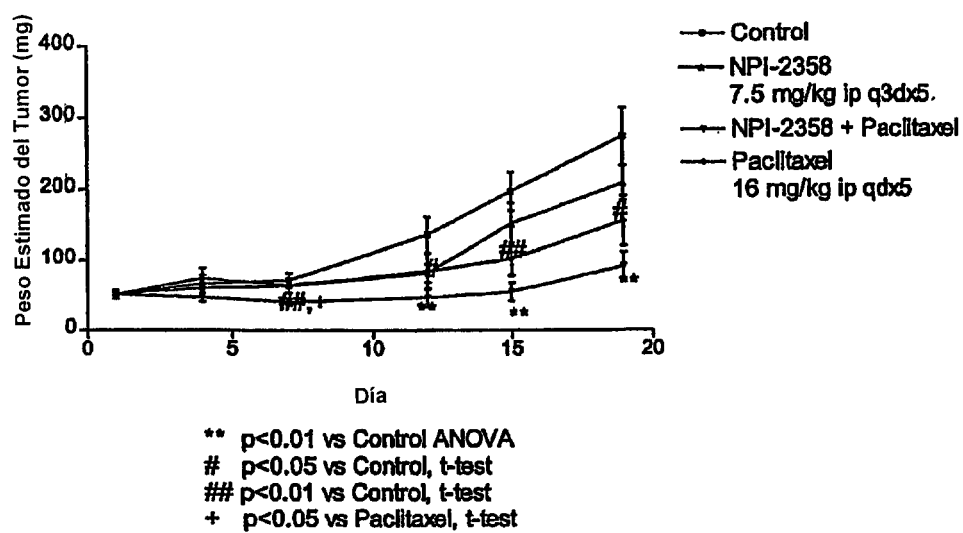


Fig 28

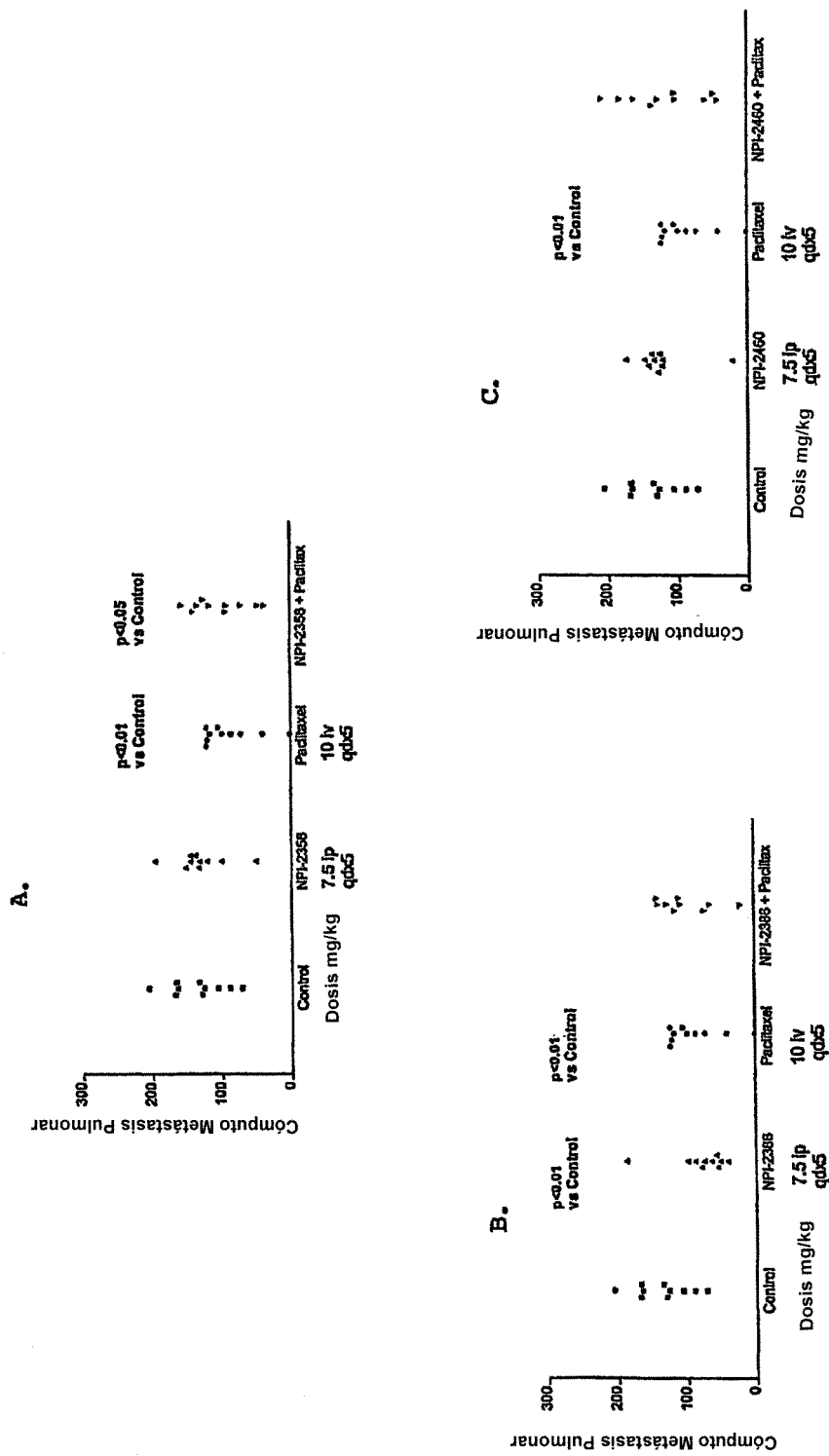


Fig 29