

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 954**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 401/14** (2006.01)

**C07D 403/04** (2006.01)

**C07D 405/14** (2006.01)

**C07D 417/12** (2006.01)

**C07D 207/452** (2006.01)

**A61K 31/4439** (2006.01)

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 19167943 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022 EP 3567035**

54 Título: **Compuestos 2,5-dioxo-azolina N-sustituidos para la utilización en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**11.04.2007 US 911258 P**

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

**14.11.2022**

73 Titular/es:

**CANBAS CO., LTD. (100.0%)  
2-2-1, Otemachi  
Numazu, Shizuoka 410-0801, JP**

72 Inventor/es:

**KAWABE, TAKUMI;  
ISHIGAKI, MACHIYO;  
SATO, TAKUJI;  
YAMAMOTO, SAYAKA y  
HASEGAWA, YOKO**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 927 954 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos 2,5-dioxo-azolina N-sustituídos para la utilización en el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a compuestos nuevos de azol dionas sustituidas que presentan una actividad anticancerosa y/o una actividad contra células que proliferan en los que los compuestos de azol dionas sustituidas anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención del ciclo celular. La invención incluye la utilización de compuestos de azol dionas sustituidas para suprimir o eliminar selectivamente células cancerosas, con o sin tratamiento anticanceroso adicional. La invención incluye compuestos de azol dionas sustituidas que anulan el punto de control G2 del ciclo celular proporcionados en la presente memoria para la utilización en métodos para sensibilizar selectivamente las células cancerosas a agentes que dañan el ADN, a tratamientos que dañan el ADN y/o a otros tipos de agentes anticancerosos.

15 **Antecedentes**

El ciclo celular comprende la fase S (replicación de ADN), fase M (mitosis), y dos fases de intervalo (fases G1 y G2) entre las fases S y M. Los puntos de control en el ciclo celular garantizan la progresión precisa a través de las etapas del ciclo celular, e incluyen la monitorización de la integridad del ADN, replicación del ADN, tamaño celular, y el ambiente circundante (Maller (1991) Curr. Opin. Cell Biol., 3:26). Los puntos de control del ciclo celular que monitorizan el estado del genoma incluyen el punto de control G1 antes del comienzo de la replicación del ADN y el punto de control G2 antes del comienzo de la mitosis. El punto de control G1 permite la detección y reparación del daño del ADN antes de entrar en la fase S, proporcionando en consecuencia una función protectora crucial dado que, cuando el ADN dañado se replica, a menudo da lugar a mutaciones (Hartwell (1992) Cell 71: 543). El punto de control G2 permite la detección y reparación del daño del ADN antes de entrar en la mitosis (fase M), proporcionando en consecuencia una función crucial dado que la mitosis sin reparación del ADN puede propagar el daño a través de las células hijas dañadas en su ADN, o la mitosis puede fallar por completo. La progresión a través de los puntos de control G1 y G2, sin reparar el daño extenso del ADN, usualmente da como resultado muerte celular.

La inhibición del punto de control G2 del ciclo celular por péptidos, peptidomiméticos, y "moléculas pequeñas" se ha usado para seleccionar selectivamente células cancerosas dado que la mayoría de las células cancerosas tienen defectos en uno o los dos puntos principales de control del ciclo celular que protegen a las células de los efectos del daño del ADN, de tal modo que la inhibición del punto de control G2 permite que las células dañadas en su ADN reingresen en el ciclo celular sin reparar el daño del ADN. (Kawabe T. (2004) "G2 checkpoint abrogators as anti-cancer drugs" Mol Cancer Ther 3: 513-519). Aunque el mecanismo molecular del punto de control G2 del ciclo celular se estudió extensamente, en estudios anteriores no se estableció ninguna diana molecular única para la anulación terapéutica del punto de control G2. Un protocolo de selección basado en fenotipos se ha desarrollado para identificar eficientemente inhibidores potenciales del punto de control G2 (Suganuma M. & Kawabe T., Solicitud EP nº 00964563; Sha et al. (2007) Mol Cancer Ther 6: 147-153), en el que la selección, a base de fenotipos del ciclo celular, de péptidos que anulan el punto de control G2 identificó a CBP501 que tiene un mecanismo único de acción en el punto de control G2 del ciclo celular. (Sha et al. (2007) Mol Cancer Ther 6: 147-153). La patente US nº 6.291.447 divulga compuestos de granulatimida y composiciones farmacéuticas de los mismos.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones. Los compuestos de la invención son útiles para tratar trastornos de proliferación celular. En particular, la invención proporciona compuestos que incluyen: 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanoato de terc-butilo (referido de manera intercambiable como S001860, S01860, or S1860, es decir, S001860 = S01860 = S1860); 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S00109 = S0109 = S109); 3-(butoximetil)-1-1[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03518); 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[(3-metilbutoxi)metil]azolin-2,5-diona (S03405); 3-[(3,3-dimetilbutoxi)metil]-1-1[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03747); y compuestos relacionados. Estos compuestos tienen efectos que pueden incluir eliminar o suprimir células que proliferan indeseablemente asociadas con un trastorno de proliferación celular.

La presente invención proporciona compuestos que eliminan o suprimen células que proliferan indeseablemente, asociadas con un trastorno de proliferación celular. La presente invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención del ciclo celular en G2. La presente invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención del ciclo celular, conduciendo a muerte o supresión de células que proliferan indeseablemente. La presente invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención del ciclo celular, conduciendo a muerte o supresión de células dañadas en su ADN. La presente invención proporciona compuestos que tienen actividad citotóxica contra células cancerosas. La presente invención proporciona compuestos que tienen actividad citotóxica contra células cancerosas, incluyendo, pero sin limitarse a, células cancerosas dañadas

en su ADN. La presente invención proporciona compuestos que tienen actividad citotóxica contra células cancerosas, incluyendo, pero sin limitarse a, células cancerosas en detención del ciclo celular en G2 debido a daño del ADN. La presente invención proporciona compuestos que tienen actividad citotóxica contra células cancerosas, y poca o ninguna actividad citotóxica contra células normales. La presente invención proporciona compuestos que pueden aumentar el efecto citotóxico de otros agentes y tratamientos anticancerosos, especialmente agentes anticancerosos que dañan el ADN y tratamientos anticancerosos que dañan el ADN. La presente invención proporciona compuestos que pueden sensibilizar a las células frente a otros agentes y tratamientos anticancerosos, especialmente agentes anticancerosos que dañan el ADN y tratamientos anticancerosos que dañan el ADN. La presente divulgación proporciona métodos para obtener y usar los compuestos divulgados en la presente memoria. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención.

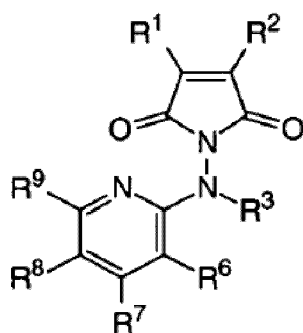
La presente invención proporciona compuestos para la utilización en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en el tratamiento de cáncer, por ejemplo para tratar la proliferación celular indeseable asociada con células tumorales benignas y malignas, células de leucemia, células de linfoma, o células de mieloma múltiple. La presente invención proporciona compuestos para la utilización para anular el punto de control G2 del ciclo celular en células que proliferan indeseablemente, tales como células cancerosas, por ejemplo células tumorales benignas y malignas, células de leucemia, células de linfoma, o células de mieloma múltiple. La presente invención proporciona compuestos para la utilización para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células que proliferan indeseablemente, tales como células cancerosas, por ejemplo células tumorales benignas y malignas, células de leucemia, células de linfoma, o células de mieloma múltiple.

La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para tratar un trastorno de proliferación celular al administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para tratar un trastorno de proliferación celular al administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a un sujeto. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para tratar un trastorno de proliferación celular en los que el trastorno de proliferación celular es cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, linfoma, mieloma, leucemia. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para tratar cáncer al administrar una cantidad eficaz de un compuesto y administrar por lo menos un tratamiento anticanceroso adicional, por ejemplo un agente que daña el ADN o un tratamiento que daña el ADN.

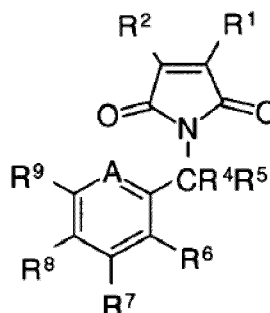
La invención proporciona compuestos o composiciones farmacéuticas para la utilización en métodos para eliminar o suprimir células al poner en contacto las células con un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en combinación con un agente o tratamiento que daña el ADN. La invención proporciona métodos para sensibilizar selectivamente las células a un agente y/o tratamiento que daña el ADN, al poner en contacto las células con un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en combinación con el agente o tratamiento que daña el ADN. La invención proporciona compuestos o composiciones farmacéuticas para la utilización en métodos para inducir apoptosis, necrosis, y/o catástrofe mitótica en células que proliferan indeseablemente, que comprenden administrar un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención a las células, en una cantidad suficiente para eliminar o suprimir las células que proliferan indeseablemente, con o sin administrar otros tratamientos. La invención proporciona compuestos o composiciones farmacéuticas para la utilización en métodos para inducir apoptosis, necrosis, y/o catástrofe mitótica en células que proliferan indeseablemente en un sujeto, que comprenden administrar un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención al sujeto, en una cantidad suficiente para eliminar o suprimir las células que proliferan indeseablemente, con o sin administrar otros tratamientos.

La selección basada en fenotipos se usó para medir la capacidad de los compuestos de la invención para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células detenidas en G2. La adaptación a la detención del ciclo celular en G2 y reingreso en el ciclo celular puede dar como resultado la muerte de la célula previamente detenida en G2, o supresión (inhibición) de la proliferación posterior de la célula previamente detenida en G2. La capacidad para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 se midió al poner en contacto las células, en las que la detención en G2 se había inducido por irradiación (por ejemplo, radiación gamma ( $\gamma$ ) o radiación de rayos X), con los compuestos de la invención en diversas concentraciones y, para cada compuesto en cada concentración, determinando el porcentaje de células que escaparon a la detención en G2 y reingresaron en el ciclo celular, al determinar el porcentaje de células en fase G1. El valor IC<sub>50</sub> para cada compuesto se calculó como la dosificación (usualmente en  $\mu$ M) que ocasionó un incremento medio máximo del porcentaje de células en fase G1 (el incremento G1) medido para ese compuesto. Ciertos compuestos de la invención se identificaron inicialmente por selección basada en fenotipos de bibliotecas de pequeñas moléculas para actividad contra células detenidas en G2 como se describe anteriormente.

Como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona compuestos que tienen la fórmula de la estructura (IV) o la estructura (VI):



(IV)



(VI)

en la que:

- 5 uno de  $R^1$  y  $R^2$  es metilo, y el otro de  $R^1$  y  $R^2$  es alquilo o alquilo sustituido con alcoxi, hidroxi, carboxi, alcocarbonilo, carbamoilo opcionalmente sustituido, o aminocarbonilo cíclico opcionalmente sustituido;

$R^3$  es H o alquilo;

- 10  $R^4$  y  $R^5$  se seleccionan independientemente de entre H y alquilo;

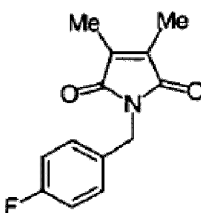
A es N o CH;

- 15  $R^6$ ,  $R^7$ , y  $R^9$  se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, ciano, nitro, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilsulfinilo opcionalmente sustituido, alquilsulfonilo opcionalmente sustituido, ariltio opcionalmente sustituido, o carbamoilo opcionalmente sustituido; y

- 20  $R^8$  es halógeno o un grupo alquilo sustituido con uno o más halógenos;

o una sal del mismo;

en el que además el compuesto no tiene la siguiente estructura:



La presente invención proporciona compuestos que anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención del ciclo celular en G2, en el que estos compuestos, cuando se administran a células o a un sujeto, tienen efectos que pueden incluir eliminar o suprimir el crecimiento de células que proliferan indeseablemente, los compuestos incluyen:

3-(1-([6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il) propanoato de terc-butilo (S01860);

etil 3 -14-([6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino }-4-2,5-dioxazolin-3-il)propanoato (S01861);

3-(1-([6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)propanoato de metilo (S01648);

3-(1-([6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)-N-metoxi-N-metilpropanamida (S01796);

1-([3-bromo-6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01981);

- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S00109);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]metilamino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S00170);
- 5 1-[[6-bromo-5-(trifluorometil)(2-piridil)]metilamino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01007);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ] -4-metil-3-(3-metilbutil)azolin-2,5-diona (S01554);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-(metoximetil)-4-metilazolin-2,5-diona (S01599);
- 10 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)-N,N-dietilpropanamida (S01711);
- 2-[(1- [ 6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ] -4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)metil]propano-1,3-dioato de dietilo (S01712);
- 15 N-(*terc*-butil)-3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanamida (S01758);
- 1-[[6-bromo-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S00994);
- 20 3,4-dimetil-1-[[6-fenil-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolin-2,5-diona (S01266);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-3-(hidroximetil)-4-metilazolin-2,5-diona (S01470);
- 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)-N-metilpropanamida (S01883);
- 25 3,4-dimetil-1-[(3,4,5-triclorofenil)amino]azolin-2,5-diona (S00832);
- 1-[[6-(3-cloro-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-3,4-dimetil (3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01313);
- 30 3,4-dimetil-1-[[6-(2-metilpropil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolin-2,5-diona (S01457);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-3-etil-4-metilazolin-2,5-diona (S01553);
- 1-[[4-cloro-6-fenil-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino ]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01734);
- 35 6-[(3,4-dimetil-2,5-dioxoazolinil)amino]-3-(trifluorometil)piridin-2-carbonitrilo (S01475);
- 1-[[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S00516);
- 40 1-[[6-(4-clorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01371);
- 3,4-dimetil-1-[[6-(4-metilfenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolin-2,5-diona (S01393);
- 1-[[6-(3-clorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona (S01474);
- 45 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]metilamino]-3-(metoximetil)-4-metilazolin-2,5-diona (S01600);
- 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)-N-metil-N-fenilpropanamida (S01759);
- 50 3,4-dimetil-1-[[6-bencil-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolin-2,5-diona (S01762);
- 3-(1-1[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanoato de metiletilo (S02022);
- 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanoato de metilpropilo (S02264);
- 55 2-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)acetato de *terc*-butilo (S02225);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-(etoximetil)-4-metilazolin-2,5-diona (S02366);
- 60 3-butil-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03448);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[2-(2-metilo(1,3-dioxolan-2-il))etil]azolin-2,5-diona (S03456);
- 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-[(2-metoxietoxi)metil]-4-metilazolin-2,5-diona (S03742);
- 65 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-(3-hidroxihehil)-3-metilazolin-2,5-diona (S03552);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-(3-hidroxipentil)-3-metilazolin-2,5-diona (S03745);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-4-metil-3-[(3-metilbutoxi)metil]azolin-2,5-diona (S03405);

3-(butoximetil)-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03518);

3-[(3,3-dimetilbutoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03747);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-(2-etoxietil)-4-metilazolin-2,5-diona (S03960);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[(2-metilpropoxi)metil]azolin-2,5-diona (S03963);

3-[(2,2-dimetilpropoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03962);

4-[(1,3-dimetilbutoxi)metil]-1-1[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metilazolin-2,5-diona (S03964);

4-[(*terc*-butoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metilazolin-2,5-diona (S03873);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-4-metil-3-[2-(2-metilpropoxi)etil]azolin-2,5-diona (S03955);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)] amino ]-4-metil-3-[2-(3-metilbutoxi)etil]azolin-2,5-diona (S03956);

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metil-4-(2-propoxietil)azolin-2,5-diona (S04034);

o una sal de cualquiera de estos compuestos.

Se han sintetizado y evaluado formas de realización adicionales de la invención, como se define en las reivindicaciones, y los detalles se exponen en la descripción a continuación y en los ejemplos, tablas, y figuras (dibujos) presentados en la presente memoria. Otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, ejemplos, tablas, dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el porcentaje de células en fase G1 después de que las células Jurkat predetenidas en la fase G2 por irradiación de rayos X (10 Gy) se tratan con los compuestos S00109 (diamantes vacíos) y S01860 (diamantes llenos), a las dosis indicadas, durante 24 horas.

La figura 2 muestra el nivel de fosforilación de histona H3 (%) en células Jurkat predetenidas en la fase G2 por irradiación de rayos X (10 Gy) y tratadas con el compuesto S00109 a 1  $\mu$ M (cuadros vacíos) y 0,3  $\mu$ M (círculos llenos) durante tiempos de tratamiento de hasta 24 horas.

La figura 3 es una imagen de una inmunotransferencia que muestra niveles de  $\gamma$ H2AX fosforilada después del tratamiento secuencial de células Jurkat con irradiación de rayos X (dosis total 10 Gy) y compuesto S00109 a 1  $\mu$ M a y durante los tiempos indicados, en el que  $\gamma$ H2AX fosforilada se detectó usando antifosfo-histona H2AX y exposición de 10 minutos de la inmunotransferencia, de izquierda a derecha: M muestra estándares etiquetados de peso molecular; la línea 1 muestra células que no recibieron radiación ni tratamiento con S00109 (células de control); la línea 2 muestra células irradiadas a 24 horas después de la irradiación y sin tratamiento con S00109; la línea 3 muestra células irradiadas a 48 horas después de la irradiación y sin tratamiento con S00109; la fila 4 muestra células irradiadas después de 0 horas de tratamiento con S00109 (a 24 horas después de la irradiación); la línea 5 muestra células irradiadas después de 3 horas de tratamiento con S00109 (a 27 horas después de la irradiación); la línea 6 muestra células irradiadas después de 9 horas de tratamiento con S00109 (a 33 horas después de la irradiación); la línea 7 muestra células irradiadas después de 15 horas de tratamiento con S00109 (a 39 horas después de la irradiación); la línea 8 muestra células irradiadas después de 21 horas de tratamiento con S00109 (a 45 horas después de la irradiación); la línea 9 muestra células irradiadas después de 24 horas de tratamiento con S00109 (a 48 horas después de la irradiación).

La figura 4 muestra recuentos de colonias (eje y) después del tratamiento de células HCT 116 con el compuesto S00109 a concentraciones de 0 a 4  $\mu$ M (eje x) para las células tratadas con el compuesto S00109 solo y sin irradiación (0 Gy, representado por círculos vacíos) y células tratadas con el compuesto S00109 en combinación con irradiación de rayos X (dosis total 1 Gy, representado por círculos llenos; dosis total 3 Gy, representado por cuadros vacíos), en el que la disminución en los recuentos de colonias es una medida de la supresión del crecimiento celular y/o de muerte celular.

La figura 5 muestra el porcentaje de células en fase subG1 (eje y) después del tratamiento *in vitro* de células ARH-77 con el compuesto S00109 a concentraciones de 0 a 10  $\mu$ g/ml (eje x) como sigue: células ARH-77 tratadas con

el compuesto S00109 solo a las concentraciones indicadas en el eje x ("S109 solamente" representado por diamantes llenos, línea continua); células ARH-77 tratadas con el compuesto S00109 a las concentraciones indicadas en el eje x, en combinación con dexametasona a 2 ng/ml ("Dex2ng/ml" representado por cuadros vacíos, línea de rayas cortas); células ARH-77 tratadas con el compuesto S00109 a las concentraciones indicadas en el eje x, en combinación con dexametasona a 20 ng/ml ("Dex20ng/ml" representado por triángulos vacíos, línea de punto y raya); y células ARH-77 tratadas con el compuesto S00109 a las concentraciones indicadas en el eje x, en combinación con dexametasona a 200 ng/ml ("Dex200ng/ml" representado por círculos vacíos, línea de rayas largas); en el que la fase subG1 indica muerte celular.

La figura 6 muestra un análisis de supervivencia para ratones SCID con trasplante intraperitoneal de  $1,9 \times 10^6$  células ARH-77, durante hasta 80 días después del trasplante (eje x, días después del trasplante; eje y, % de ratones que sobreviven) para ratones tratados por inyección intraperitoneal en el Día 1, Día 2, y Día 3 después del trasplante como sigue: ratones de control tratados con vehículo solo ("Control" línea de rayas); ratones tratados con 50 mg/kg del compuesto S00109 ("S109" línea continua); y ratones tratados con 2 mg/kg de dexametasona ("Dexa" línea de punto y raya).

La figura 7 muestra un análisis de supervivencia para ratones SCID con trasplante intraperitoneal de  $0,8 \times 10^6$  células ARH-77, durante hasta 85 días después del trasplante (eje x, días después del trasplante; eje y, % de ratones que sobreviven), para ratones tratados mediante una sola administración oral de compuestos en el Día 1 después del trasplante como sigue: ratones de control tratados por vía oral con vehículo solo ("control" línea continua); ratones tratados por vía oral con 750 mg/kg del compuesto S00109 ("S109" línea punteada); y ratones tratados por vía oral con 750 mg/kg del compuesto S001860 ("S1860" línea de rayas).

La figura 8 muestra un análisis de supervivencia para ratones SCID con trasplante intraperitoneal de  $4,1 \times 10^6$  células ARH-77, durante hasta 50 días después del trasplante (eje x, días después del trasplante; eje y, % de ratones que sobreviven), para ratones tratados por administración oral una vez al día de los compuestos en el Día 1 y en el Día 2 después del trasplante como sigue: ratones de control tratados por vía oral una vez al día durante dos días con vehículo solo ("CONT" línea continua); ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003518 ("S3518" línea punteada); ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003405 ("S3405" línea de rayas); y ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003747 ("S3747" línea de punto y raya).

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado comúnmente comprendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se especifique de otra manera.

Las expresiones "tratamiento que daña el ADN" y "agente que daña el ADN" se refieren a cualquier agente o tratamiento que directa o indirectamente daña el ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos (agentes) que dañan el ADN, irradiación con niveles que dañan el ADN de radiación X, gamma ( $\gamma$ ), o UV, diversos tipos de choque ambiental, y similares. Es conocido que un tratamiento que daña el ADN o agente que daña el ADN puede actuar directamente sobre el ADN, por ejemplo para afectar la estructura del ADN o interferir con la síntesis de ADN, o puede actuar indirectamente sobre el ADN por sus efectos sobre otros sistemas celulares implicados en síntesis y replicación de ADN, por ejemplo para afectar o inhibir las funciones de los microtúbulos o ADN topoisomerasa. ejemplos específicos de agentes que dañan el ADN incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vegetales, extractos vegetales, radioisótopos, hormonas esteroideas. ejemplos adicionales de agentes que dañan el ADN también incluyen, pero no se limitan a, agentes conocidos como "fármacos que dañan el ADN" o "fármacos anticancerosos" o "agentes anticancerosos" o "agentes anticancerosos que dañan el ADN", por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, S-1 (Tegafur, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y ácido oxónico), 5-etiniluracilo, arabinosilcitosina (ara-C), 5-azacitidina (5-AC), 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (dFdC), antimetabolitos de purina (mercaptapurina, azatiopurina, tioguanina), gemcitabina (Gemzar®), bortezomib (Velcade®) pentostatina, alopurinol, 2-fluoro-arabinosil-adenina (2F-ara-A), hidroxiurea, mostaza de azufre (sulfuro de biscloroetil), mecloretamina, melfalano, melfarano, vincristina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, AZQ, mitomicina C, dianhidrogallactol, dibromoducitol, sulfonato de alquilo (busulfano), nitrosoureas (BCNU, CCNU, 4-metil CCNU o ACNU), procarbazona, decarbazina, rebecamicina, antraciclinas tales como doxorubicina (adriamicina; ADR), daunorubicina (Cerubicina), idarubicina (Idamicina) y epirubicina (Ellence), análogos de antraciclina tales como mitoxantrona, actinimicina D, inhibidores no intercalantes de topoisomerasas tales como epipodofilotoxinas (etopósido = VP16, tenipósido = VM-26), podofilotoxina, bleomicina (Bleo), pepleomicina, taxanos, compuestos que forman aductos con ácido nucleico incluyendo derivados de platino, por ejemplo cisplatino (CDDP), análogo trans de cisplatino, carboplatino, iproplatino, tetraplatino y oxaliplatino, así como camptotecina, topotecán, irinotecán (CPT-11), y SN-38. ejemplos específicos de tratamientos que dañan el ADN incluyen radiación, por ejemplo radiación ultravioleta (UV), infrarroja (IR), rayos X,  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta), o  $\gamma$  (gamma), así como choque ambiental, por ejemplo hipertermia. Un

experto en la materia puede identificar y usar otros agentes y tratamientos que dañan el ADN.

La expresión “compuesto de la invención” está destinada a referirse a una molécula que tiene la estructura y actividad que se describe en la presente memoria. Un compuesto de la invención puede estar aislado, puro, sustancialmente puro, o puede estar en una composición que contiene una mezcla de otros componentes. La pureza de una composición que contiene un compuesto de la invención puede determinarse, por ejemplo, usando técnicas de química analítica, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) o cromatografía de gases-espectrometría de masas (GS-MS), u otras técnicas analíticas conocidas por un experto en la materia. Una composición, como se proporciona en la presente memoria, puede contener uno o más compuestos de la invención, en una mezcla con vehículos, portadores, excipientes, ingredientes inertes, y similares adecuados. Si se desea, una composición, como se proporciona en la presente memoria, puede contener ingredientes activos adicionales, incluyendo agentes que dañan el ADN y similares, así como uno o más compuestos de la invención, en una mezcla con vehículos, portadores, excipientes, ingredientes inertes, y similares adecuados.

Las expresiones “composición farmacéutica” o “medicamento” se refieren a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un sujeto, por ejemplo como agente anticáncer. El sujeto puede ser cualquier animal en el que los compuestos de la invención anulan el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionan adaptación a la detención en G2. En particular, el sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo un caballo, vaca, perro, gato, o ser humano. Una composición farmacéutica de la invención es una formulación que puede comprender una cantidad farmacológicamente eficaz de por lo menos un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las expresiones “trastorno de proliferación celular” o “trastorno proliferativo” o “trastorno proliferativo celular” o “padecimiento proliferativo” o “padecimiento caracterizado por proliferación celular indeseable” o cualquier equivalente gramatical de las mismas se utilizan para referirse a cualquier padecimiento fisiológico patológico o no patológico caracterizado por proliferación aberrante o indeseable de por lo menos una célula, incluyendo, pero sin limitarse a, padecimientos caracterizados por proliferación celular indeseable o no buscada o aberrante, padecimientos caracterizados por supervivencia celular indeseable o no buscada o aberrante, y padecimientos caracterizados por apoptosis deficiente o aberrante. La expresión “proliferación celular” y equivalentes gramaticales de la misma se utilizan para comprender un incremento en el número de células como resultado de la división celular, así como un incremento en la masa total de células como resultado del crecimiento celular, por ejemplo por el crecimiento de células hijas después de la mitosis. Un ejemplo no limitativo de un “trastorno de proliferación celular” o “trastorno proliferativo” o “padecimiento proliferativo” o “padecimiento caracterizado por proliferación celular indeseable” es cáncer, por ejemplo proliferación y supervivencia indeseable o no buscada o aberrante de células cancerosas, tales como células asociadas con linfoma, mieloma, sarcoma, leucemia, u otros trastornos neoplásicos dados a conocer en otra parte en la presente memoria y conocidos por un experto en la materia.

Las expresiones “eliminan o suprimen células” o “eliminar o suprimir células” o “eliminan o suprimen células que proliferan indeseablemente” o “eliminan o suprimen células diana” o cualquier equivalente gramatical de las mismas se utilizan para referirse a los resultados de estar en contacto con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. Los términos “eliminan” o “eliminar” se utilizan para referirse a muerte celular que resulta de los efectos de un compuesto de la invención sobre una célula, en particular la muerte de una célula que prolifera indeseablemente, tal como una célula cancerosa, en el que la muerte puede deberse a apoptosis, catástrofe mitótica, necrosis, u otra causa, dependiendo de las circunstancias de la célula. Los términos “suprimen” o “suprimir” se utilizan para referirse a supresión de la proliferación celular que resulta de los efectos de un compuesto de la invención sobre una célula, en el que la supresión puede ser parcial o completa. Un compuesto de la invención puede ocasionar supresión parcial de una célula, de tal modo que la célula puede dejar de dividirse pero continúa creciendo, o la célula puede dividirse mucho más lentamente, o la célula puede crecer mucho más lentamente, o una célula cancerosa no puede progresar de un estado premetastásico a un estado metastásico, etc. Un compuesto de la invención puede ocasionar supresión completa, en el que una célula no se divide ni crece, en particular, en el que una célula que prolifera indeseablemente no se divide ni crece.

Las expresiones “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” o cualquier equivalente gramatical de las mismas se utilizan para referirse a una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para producir por lo menos un efecto deseado. Las cantidades eficaces se determinan por cualquiera de una diversidad de medidas, incluyendo pero sin limitarse a: muerte celular; proliferación celular disminuida; cantidades disminuidas de células; inhibición de crecimiento celular; tamaño celular disminuido; supervivencia celular disminuida; metabolismo celular disminuido; apoptosis; catástrofe mitótica; adaptación a la detención del ciclo celular (es decir, escape de la detención del ciclo celular, conduciendo usualmente a reingreso al ciclo celular); marcadores de daño celular o citotoxicidad; indicadores indirectos de daño celular o citotoxicidad, tal como contracción tumoral; supervivencia mejorada de un sujeto; o desaparición de marcadores asociados con proliferación celular indeseable, no buscada, o aberrante. Por ejemplo, cuando se desea inhibir la proliferación indeseable de una célula o tipo celular particular, una cantidad eficaz será una cantidad que disminuye de manera detectable la división celular, o disminuye el metabolismo celular, o incrementa la muerte celular, o disminuye la supervivencia celular, de esa célula o tipo celular. Un efecto deseado puede ser un efecto selectivo; por ejemplo, una “cantidad eficaz” es una cantidad que elimina o suprime células diana a la vez que tiene poco o ningún efecto citotóxico sobre células no diana, o una cantidad que produce un beneficio terapéutico deseado en un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular, a la vez que tiene poco o ningún efecto adverso sobre el sujeto. Un



trastorno de proliferación celular se puede tratar *in vitro* o *ex vivo* administrando una cantidad eficaz de por lo menos un compuesto de la invención, en el que la cantidad eficaz de por lo menos un compuesto puede administrarse *in vitro* o *ex vivo* para tratar las células. Alternativamente, el compuesto de la invención es para la utilización en un método para tratar un trastorno de proliferación celular, en el que el método comprende administrar el compuesto *in vivo* a un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular.

Las expresiones “punto de control G2 del ciclo celular” o “punto de control G2” o cualquier equivalente gramatical de las mismas se refieren al punto de control G2 que se presenta al final de la fase G2 del ciclo celular. Durante la fase de “intervalo” G2 entre la síntesis de ADN (fase S, replicación del ADN en preparación para la mitosis) y la mitosis (fase M, división celular para producir células hijas), la célula continúa creciendo y produce nuevas proteínas. El punto de control G2, al final de la fase G2, es un punto de comprobación de control en el que se verifica una serie de factores para garantizar que la célula está lista para entrar en la mitosis (fase M). Las funciones del punto de control G2 incluyen detectar daño del ADN. Si el punto de control G2 se pasa, entonces se inicia la entrada en la fase M. Si el punto de control G2 detecta daño del ADN, el punto de control G2 puede generar una señal que conduce a “detención del ciclo celular” o “detención del ciclo celular en G2” o “detención en G2”, que restringe el comienzo de la mitosis hasta que la replicación y reparación del ADN se terminan, evitando en consecuencia la transmisión del daño del ADN a las células hijas. Se sabe que, dado que el daño del ADN puede iniciar o activar el punto de control G2 y ciertas actividades celulares relacionadas con el punto de control G2, en ciertos contextos también pueden usarse la expresión “punto de control G2 inducido por daño del ADN”, y equivalentes gramaticales de la misma. Se sabe además que el punto de control G2 inducido por daño del ADN puede inducirse o iniciarse por agentes o tratamientos que dañan el ADN.

Las expresiones “anulan el punto de control G2” o “anulan el punto de control G2 del ciclo celular” o “anulación del punto de control G2” o “anulación de G2” o “anulación del punto de control G2” o “afectan el punto de control G2” o “inhiben el punto de control G2” o “suprimen el punto de control G2” o cualquier equivalente gramatical de las mismas están destinadas a referirse a la capacidad de los compuestos de la invención para anular, afectar, inhibir, reprimir, o suprimir el punto de control G2. Una célula en la que se anula el punto de control G2 puede tener ausencia completa de la actividad del punto de control G2 (detención en el punto de control G2, o anulación completa del punto de control G2). Una célula en la que se anula el punto de control G2 puede exhibir una disminución en la cantidad de tiempo en el que la célula está en el punto de control G2, por ejemplo un punto de control G2 que tiene una disminución en su duración de minutos, horas, días, semanas o más bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, una disminución en la duración de tiempo del punto de control G2 puede significar que una célula que normalmente está en G2 durante cierto tiempo, por ejemplo 4 horas, cuando se pone en contacto con un compuesto de la invención, está en G2 durante menos de 4 horas, por ejemplo 3,5, 3, 2,5, 2,1 o menos horas. De esta manera, “anulación del punto de control G2” se refiere a cualquier cantidad de anulación del punto de control G2. Se entiende que el resultado de la anulación del punto de control G2 es que la célula entrará en mitosis (fase M) sin reparación del ADN, lo cual debe tener poco o ningún efecto perjudicial sobre células sin daño (normales), y lo cual debe dar como resultado severos efectos adversos sobre células dañadas en su ADN, conduciendo a menudo a muerte celular debido a apoptosis, catástrofe mitótica, o necrosis.

“Detención del ciclo celular” o “detención del ciclo celular en G2” o “detención en G2” o “detención en G2-M del ciclo celular” o cualquier equivalente gramatical de las mismas se refieren a un estado en el que una célula no sale de G2 para entrar en la mitosis (fase M), de tal modo que la célula se considera como “detenida” en la fase G2. La detención del ciclo celular en G2 a menudo se observa en células dañadas en su ADN, tales como muchas células cancerosas. La detención del ciclo celular en G2 puede resultar de cualquiera de una serie de actividades celulares, incluyendo, pero sin limitarse a, ciertas actividades del punto de control G2. El daño del ADN encontrado en muchas células cancerosas puede iniciar la detención del ciclo celular en G2. La detención del ciclo celular en G2 puede inducirse o potenciarse al tratar una célula con agentes que dañan el ADN, tales como adriamicina, doxorubicina, o bendamustina (un agente alquilante), o tratamientos que dañan el ADN, tal como irradiación con una dosis desencadenante de radiación X, gamma ( $\gamma$ ), o UV (algunas veces referida como “detención en G2 inducida por radiación”).

“Adaptación” o “adaptación a la detención del ciclo celular” o “adaptación a la detención del ciclo celular en G2” o “adaptación a la detención en G2” se refieren a la cancelación o anulación de la detención del ciclo celular en G2, de tal modo que las células anteriormente detenidas reingresan al ciclo celular. La adaptación a la detención del ciclo celular en G2 se refiere asimismo al escape de la detención del ciclo celular en G2. Los compuestos de la presente invención pueden ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células detenidas en G2. Según un aspecto de la invención, “adaptación” o “adaptación a la detención del ciclo celular” o “adaptación a la detención del ciclo celular en G2” o “adaptación a la detención en G2” pueden referirse al escape de una condición de detención del ciclo celular en G2 impuesta por la activación del punto de control G2, en particular, la detención del ciclo celular en G2 impuesta por la activación del punto de control G2 inducido por daño a ADN. Se entiende que la adaptación a la detención del ciclo celular en G2 da como resultado que las células anteriormente detenidas en G2 reingresan al ciclo celular sin reparar el daño del ADN que inició la detención en G2. La adaptación a la detención del ciclo celular en G2, en la que las células dañadas en su ADN reingresan al ciclo, a menudo da como resultado muerte celular debido a apoptosis, catástrofe mitótica, o necrosis. Dado que el mecanismo que promueve la detención del ciclo celular en G2 después del daño del ADN parece estar conservado entre las especies, desde levaduras hasta seres humanos, se entiende que los compuestos de la presente invención pueden ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en numerosas especies, en particular en todas las especies eucarióticas.

A la vez que la actividad de anulación del punto de control G2 de los compuestos de la invención puede relacionarse con la capacidad para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2, también se entiende que los compuestos de la invención pueden ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 por otros mecanismos no relacionados con la anulación del punto de control G2. De esta manera, dependiendo de las circunstancias particulares y sin pretender limitarse por esta definición, la anulación del punto de control G2 puede referirse, por lo menos en parte, a anular la capacidad de una célula para detener el ciclo celular en el punto de control G2, conduciendo a adaptación a la detención del ciclo celular en G2. En particular, la anulación del punto de control G2 inducido por daño del ADN por los compuestos de la invención, bajo condiciones que normalmente pueden iniciar la detención del ciclo celular en G2, puede incluir la anulación de una señal generada por el punto de control G2, implicada en iniciar la detención del ciclo celular en G2.

El término "apoptosis" se refiere a muerte celular programada, y cambios asociados en la fisiología celular, incluyendo fragmentación de ácidos nucleicos, activación de caspasas, condensación de cromosomas, etc., como se entiende en la técnica.

La expresión "catástrofe mitótica" se refiere a muerte celular que resulta de uno o más errores en el proceso mitótico.

El término "necrosis" se refiere a muerte celular, que a menudo resulta de daño o accidente, caracterizada a menudo por hinchamiento celular, digestión de cromatina, ruptura de la membrana plasmática y membranas de orgánulos, hidrólisis de ADN, formación de vacuolas en el retículo endoplásmico, ruptura de orgánulos, y lisis celular.

Se entiende que el término "sujeto" se refiere a animales, típicamente animales mamíferos, tales como primates (seres humanos, simios, gibones, chimpancés, orangutanes, macacos), animales domésticos (perros y gatos), animales de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales para experimentación (ratón, rata, conejo, cobaya). Los sujetos incluyen modelos de enfermedades animales (por ejemplo, ratones propensos a tumores, ratones que llevan tumores, o ratones que reciben tumores xenoinjertados).

Como se usan en la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "el/la", y "es" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De esta forma, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye una pluralidad de compuestos, y la referencia a "un resto" o "un aminoácido" incluye la referencia a uno o más restos y aminoácidos.

#### Terminología química

"Alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático. Un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido. "Alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más sustituyentes, tales como grupos halógeno (Cl, Br, F, I), cicloalquilo de C3 a C7, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alcoxi de C1 a C6, ariloxi opcionalmente sustituido, hidroxilo, amino opcionalmente sustituido, amino cíclico opcionalmente sustituido, nitro, tio, ciano, oxo, acilo de C1 a C7, aciloxi de C1 a C7, carboxi, alcóxicarbonilo de C1 a C6, carbamilo opcionalmente sustituido, aminocarbonilo cíclico opcionalmente sustituido, β-mercapto, alquiltio de C1 a C4, alquilsulfonilo de C1 a C4, o alquilsulfonilo de C1 a C4. Los grupos alquilo sustituidos pueden tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más sustituyentes, y los grupos alquilo sustituidos de forma múltiple pueden sustituirse con los mismos sustituyentes o diferentes. El resto alquilo, ya esté sustituido o no sustituido, puede ser ramificado, de cadena lineal, o cíclico. Grupos alquilo típicos incluyen, pero de ninguna manera se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, etenilo, propenilo, butenilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares.

"Alcoxi" se refiere a un grupo OR, en el que R es un alquilo o alquilo sustituido. Grupos alcoxi preferidos son "alcoxi de C1 a C6", tales como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, y grupos similares.

El término "alquiltio" se refiere a grupos sulfuro, tales como metiltio, etiltio, n-propiltio, isopropiltio, n-butiltio, t-butiltio, y grupos similares. El término "alquilsulfóxido" indica grupos sulfóxido, tales como metilsulfóxido, etilsulfóxido, n-propilsulfóxido, isopropilsulfóxido, n-butilsulfóxido, sec-butilsulfóxido, y similares. El término "alquilsulfonilo" abarca grupos, tales como metilsulfonilo, etilsulfonilo, n-propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, n-butilsulfonilo, t-butilsulfonilo, y similares.

"Acilo" quiere decir que incluye grupos alquilo, heteroalquilo, alqueno, heteroalqueno, alquino, heteroalquino, arilo, o heteroarilo acoplados a un grupo adicional mediante un grupo carbonilo, por ejemplo, -C(O)-alquilo, o -C(O)-arilo. Grupos acilo preferidos son acilo de C1 a C7, tales como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, pentanoilo, pivaloilo, hexanoilo, heptanoilo, benzoilo, y similares.

El término "amida" se refiere a un grupo con la fórmula C(O)NHR o NHC(O)R, en la que R está opcionalmente sustituido y se selecciona del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (enlazado a través de un carbono anular) y heteroalíclico (enlazado a través de un carbono anular). Cualquier cadena lateral de amina, hidroxilo, o carboxilo en los compuestos de la presente invención puede estar amidada.

“Arilo” o “aromático” se refiere a un grupo con por lo menos una estructura de anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugados, es decir, que tiene las características de aromaticidad en términos de distribución de electrones a través del sistema anular. Un arilo puede estar opcionalmente sustituido. Típicamente, los sistemas anulares contienen 5-12 átomos anulares en cada anillo. Un grupo arilo puede ser monocíclico o un arilo policíclico de anillo condensado. Un grupo arilo es un arilo carbocíclico en el que todos los átomos anulares son carbono, por ejemplo fenilo. Un heteroarilo es un grupo arilo que contiene por lo menos un heteroátomo anular, tal como oxígeno, azufre y/o nitrógeno. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen maleimidilo, imidazolilo, indolilo, pirrolidinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirrolilo, furanilo, oxazolilo, dioxazolilo, isoxazolilo, ftalimidilo, tiazolilo, y similares. Los grupos arilo pueden fusionarse a otros grupos arilo o a grupos no arilo (no aromáticos).

Como ejemplos de los sustituyentes de dicho “amino opcionalmente sustituido” y “carbamoilo opcionalmente sustituido”, pueden mencionarse fenilo, fenilo sustituido, alquilo de C1 a C6, alquilo sustituido de C1 a C6, alquenilo de C2 a C7, alquenilo sustituido de C2 a C7, alquinilo de C2 a C7, alquinilo sustituido de C2 a C7, fenilalquilo de C7 a C12, fenilalquilo sustituido de C7 a C12, heteroarilo, alquilo de C1 a C6, alquilo sustituido de C1 a C6, acilo de C1 a C7, alcoxicarbonilo de C1 a C7, carbamoilo opcionalmente sustituido, alquilsulfonilo de C1 a C4, y similares. El “amino opcionalmente sustituido” y “carbamoilo opcionalmente sustituido” pueden estar mono-sustituidos o di-sustituidos, con los mismos sustituyentes o diferentes.

“Alcoxicarbonilo” se refiere a un grupo “alcoxi” unido a un grupo carbonilo.

“Cicloalquilo” se refiere a un radical monocíclico o policíclico que contiene solamente carbono e hidrógeno, y puede estar saturado, parcialmente insaturado, o completamente insaturado. Un grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido. Grupos cicloalquilo preferidos incluyen grupos que tienen de tres a doce átomos anulares, más preferiblemente de 5 a 10 átomos anulares.

“Amino cíclico” como en “amino cíclico opcionalmente sustituido”, se refiere a grupos cíclicos que contienen por lo menos un nitrógeno anular, incluyendo piperazino, morfolino, piperidino, pirrolidino, y similares.

Ejemplos de “aminocarbonilo cíclico” como en “aminocarbonilo cíclico opcionalmente sustituido”, incluyen piperazinocarbonilo, morfolinocarbonilo, piperidinocarbonilo, pirrolidinocarbonilo, y similares.

Los sustituyentes de “alcoxi opcionalmente sustituido”, “alquiltio opcionalmente sustituido”, “arilo opcionalmente sustituido”, “ariloxi opcionalmente sustituido”, “ariltio opcionalmente sustituido”, “acilo opcionalmente sustituido”, “heteroarilo opcionalmente sustituido”, “alquiltio opcionalmente sustituido”, “alquilsufinilo opcionalmente sustituido”, “alquilsulfonilo opcionalmente sustituido”, “alcoxycarbonilo opcionalmente sustituido”, “amino cíclico opcionalmente sustituido”, y “aminocarbonilo cíclico opcionalmente sustituido” se definen de la misma manera que los sustituyentes de “alquilo sustituido”.

“Halógeno” se refiere a átomos de flúor, cloro, bromo, o yodo. Uno o más halógenos pueden presentarse en un compuesto, en el que los halógenos pueden ser los mismos o diferentes.

Las formas de realización de compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros quirales, y cada centro puede existir en la configuración R o S, de tal modo que la presente invención incluye todas las formas diastereoméricas, enantioméricas, y epiméricas, así como las mezclas apropiadas de las mismas. Las formas de realización de la presente invención pueden existir como isómeros geométricos, de tal modo que la presente invención incluye todos los isómeros cis, trans, syn, anti, entgegen (opuestos) (E), y zusammen (juntos) (Z), así como las mezclas apropiadas de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol, y similares. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas en el contexto de la presente invención.

Cualquier sal, como se da a conocer en la presente memoria, puede incluir sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, y sales con aminoácidos básicos o ácidos.

A menos que se indique de otra manera, cuando un sustituyente se estima como “opcionalmente sustituido”, se quiere decir que el sustituyente es un grupo que puede estar sustituido con un grupo o más grupos como se enumera en la presente memoria o como se conoce por un experto en la materia.

Las descripciones de compuestos de la invención están de acuerdo con los principios de enlace químico conocidos por los expertos en la materia. Por consiguiente, cuando un grupo puede estar sustituido por uno o más de una serie de sustituyentes, tales sustituciones se seleccionan para atenerse a los principios del enlace químico y para proporcionar compuestos que no son inestables inherentemente, y/o pueden conocerse por un experto en la materia como probablemente inestables, bajo condiciones ambientales, tales como condiciones acuosas, neutras, fisiológicas.

Se entiende que los compuestos de la invención pueden describirse por un experto en la materia usando terminología diferente a los términos usados en la presente memoria, sin afectar la precisión de la descripción. Los compuestos, estructuras, sustituyentes, grupos, y similares pueden describirse usando cualquiera de: nomenclatura IUPAC; nombre químico "trivial" o nombre "común"; nombre comercial; número de registro CAS; notación SMILES; u otros descriptores.

Por ejemplo, los compuestos de la invención descritos en la presente memoria como "azol dionas sustituidas" o "azolin dionas sustituidas" pueden describirse alternativamente como "maleimidas sustituidas" o "2,5-pirroldionas sustituidas" o "pirroles sustituidos" en combinación con otros descriptores, preferiblemente de acuerdo con terminología química estandarizada, para proporcionar una descripción completa de uno o más compuestos de la invención.

#### Compuestos de azol dionas sustituidas

La invención proporciona compuestos de azol (azolin) dionas sustituidas que pueden usarse para eliminar o suprimir células dañadas en su ADN, o para tratar trastornos de proliferación celular caracterizados por proliferación celular indeseable o no buscada. Los compuestos de la invención se definen en las reivindicaciones.

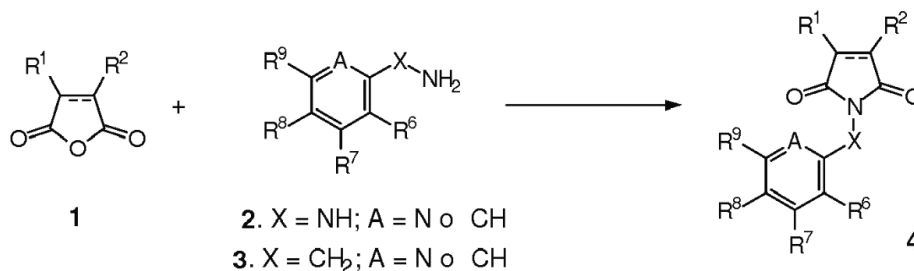
En las tablas 1, 2, y 3 en la presente memoria se muestran compuestos representativos. Se entiende en general que los compuestos dados a conocer en las tablas 1, 2, y 3 son proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

#### Esquemas de síntesis representativos

A continuación se presentan esquemas representativos para la síntesis de compuestos de la invención que tienen las Estructuras (IV) o (VI) así como los esquemas representativos para la síntesis de compuestos descritos en la presente memoria a modo de ejemplos de referencia solamente. Los esquemas representativos presentados en la presente memoria no restringen el alcance de la invención de ninguna forma. Se entiende que un experto en la materia puede adaptar los métodos presentados en la presente memoria, y/o diferentes métodos conocidos en la técnica, para sintetizar compuestos adicionales dentro del alcance de la presente invención, incluyendo análogos que tienen diferentes sustituciones o patrones de sustituciones. Se entiende además que, aunque se ha observado que ciertas sustituciones producen estructuras con mayor actividad que otras estructuras, la presente invención proporciona compuestos con todas las sustituciones que tienen todos los niveles de actividad.

En el Método 1 (Esquema 1), un anhídrido (1) se hace reaccionar con una hidrazina sustituida (2) o una bencilamina (3) para formar los compuestos que tienen la estructura general mostrada como (4) a continuación:

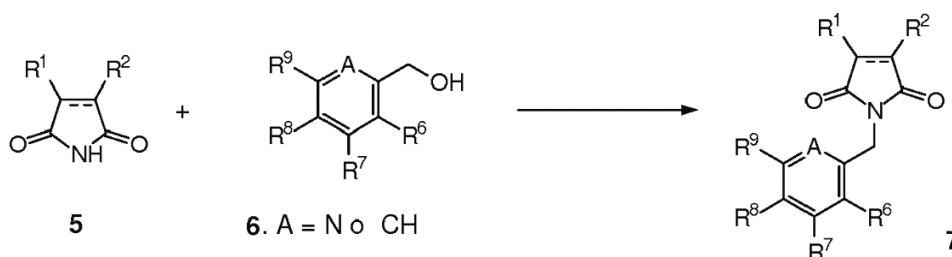
#### Esquema 1



La reacción puede llevarse a cabo en disolventes orgánicos comunes, tales como THF, cloroformo, DMF, ácido acético, etc., a temperaturas que varían de ambientales a elevadas, durante tiempos que varían de varias horas a unos cuantos días. Usualmente, no se necesitan otros aditivos. Los anhídridos e hldrazinas/bencilaminas requeridos se adquieren de fuentes comerciales, o se sintetizan de acuerdo con procedimientos conocidos en la bibliografía. En casos en los que los materiales de partida se desconocen en la bibliografía, se desarrollan métodos sintéticos, como se ilustra por ciertas síntesis descritas en los ejemplos.

En el Método 2 (Esquema 2), una imida (5) se hace reaccionar con un alcohol bencilico (6) bajo condiciones típicas de Mitsunobu para formar compuestos que tienen la estructura general mostrada como (7) a continuación:

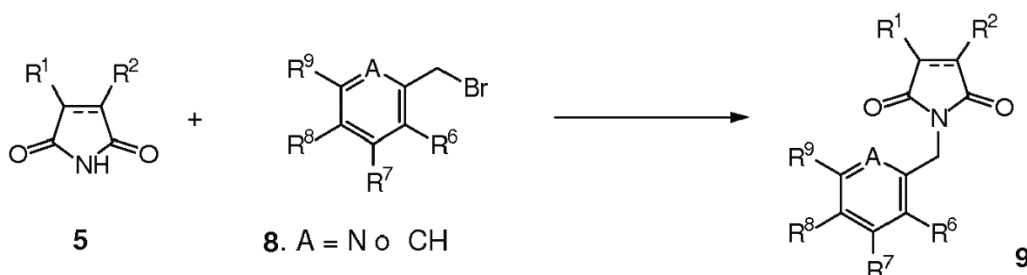
#### Esquema 2



Las condiciones típicas de Mitsunobu incluyen el uso de una fosfina (trifenilfosfina, tributitfosfina etc.), y un compuesto azo (azo-dicarboxilato de dietilo, azo-dicarboxilato de diisopropilo, etc.). La reacción puede llevarse a cabo con una base añadida, usualmente trietilamina, o sin una base añadida, en disolventes tales como THF, a temperatura ambiente o elevada durante varias horas. Las imidas y alcoholes bencílicos requeridos se adquieren de fuentes comerciales, o se sintetizan de acuerdo con procedimientos conocidos en la bibliografía. En casos en los que los materiales de partida se desconocen en la bibliografía, se desarrollan métodos sintéticos, como se ilustra por ciertas síntesis descritas en los ejemplos.

En el Método 3 (Esquema 3), una imida (5) se hace reaccionar con un bromuro de bencilo (8) bajo una condición de reacción típica de sustitución nucleofílica para formar los compuestos que tienen la estructura general mostrada como (9) a continuación:

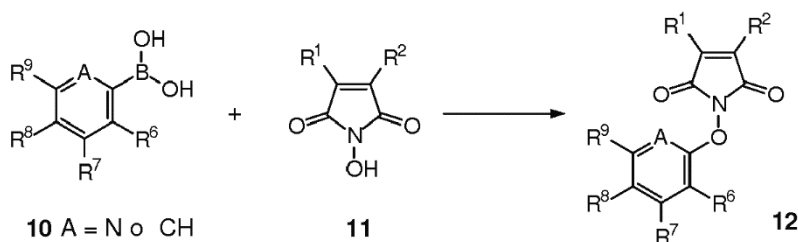
Esquema 3



La condición de reacción típica es: someter a reflujo en un disolvente adecuado (acetona, DMF, etc.) en presencia de una base añadida (carbonato de potasio, carbonato de cesio, etc.) durante varias horas a unos cuantos días. Las imidas y bromuros de bencilo requeridos se adquieren de fuentes comerciales, o se sintetizan de acuerdo con procedimientos conocidos en la bibliografía. En casos en los que los materiales de partida se desconocen en la bibliografía, se desarrollan métodos sintéticos, como se ilustra por ciertas síntesis descritas en los ejemplos.

En el Método 4 (Esquema 4), un ácido arilborónico (10) se hace reaccionar con una N-hidroxiimida (11) bajo una condición de acoplamiento mediado por Cu(I) para formar compuestos que tienen la estructura general mostrada como (12) a continuación:

Esquema 4



La condición de reacción típica es: agitar a temperatura ambiente en disolventes adecuados (DCE, THF, DMF, etc.) en presencia de una base añadida (piridina, trietilamina, etc.), con especies añadidas de Cu(I), tal como CuCl, durante varias horas hasta toda la noche. Los ácidos arilborónicos y N-hidroxiimidas requeridos se adquieren de fuentes comerciales, o se sintetizan de acuerdo con procedimientos conocidos en la bibliografía. En casos en los que los materiales de partida se desconocen en la bibliografía, se desarrollan métodos sintéticos, como se ilustra por ciertas síntesis descritas en los ejemplos.

Las síntesis de compuestos (a título de ejemplo de referencia solamente) o formas de realización particulares se dan a conocer en los ejemplos. Los compuestos sintetizados representativos, presentados como formas de realización en las tablas 1 y 2, se presentan solamente para ilustración, y de ningún modo restringen el alcance de la invención dada a conocer en la presente memoria.

Actividades biológicas de los compuestos de la invención

La presente invención proporciona compuestos para la utilización en el tratamiento de trastornos de proliferación celular. La presente invención proporciona compuestos que eliminan o suprimen células que proliferan indeseablemente. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en el tratamiento de trastornos de proliferación celular al eliminar o suprimir selectivamente células que proliferan indeseablemente. La presente

invención proporciona compuestos para la utilización en el tratamiento de trastornos de proliferación celular al eliminar o suprimir selectivamente células que proliferan indeseablemente, que tienen daño acumulado en el ADN ("células dañadas en su ADN"). En poblaciones mixtas de células normales y células que proliferan indeseablemente, los compuestos de la invención pueden usarse para eliminar o suprimir selectivamente células que proliferan indeseablemente a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales. En poblaciones mixtas de células normales y células que proliferan indeseablemente dañadas en su ADN, los compuestos de la invención pueden eliminar o suprimir selectivamente células que proliferan indeseablemente dañadas en su ADN a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales. En particular, los compuestos de la invención eliminan selectivamente células cancerosas o suprimen la proliferación de células cancerosas, a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre células "normales" no cancerosas. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para seleccionar selectivamente células dañadas en su ADN. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para seleccionar selectivamente células con un punto de control G1 del ciclo celular alterado. La presente invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para seleccionar selectivamente células cancerosas.

Los tratamientos convencionales para trastornos de proliferación celular a menudo incluyen agentes y tratamientos que dañan el ADN, como se describe en otra parte en la presente memoria. Estos tratamientos convencionales, a menudo usados como tratamientos anticancerosos, se han seleccionado para eliminar células que entran rápidamente en el ciclo (que proliferan) esperando eliminar las células que proliferan indeseablemente características del trastorno de proliferación. Ejemplos de tales tratamientos convencionales incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos y/o irradiación con radiación  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , X y/o UV. Sin embargo, los tratamientos convencionales a menudo ocasionan que los pacientes sufran efectos adversos sobre las células normales, que también están proliferando, por ejemplo, diarrea debido a daño a células epiteliales intestinales, pérdida de cabello debido a daño a células del folículo piloso, y anemia debido a daño a progenitores de células sanguíneas, todas las cuales están entre las células que proliferan más rápidamente en el cuerpo normal. Estos efectos adversos a menudo obstaculizan los tratamientos. De esta manera, las medicinas que se dirigen específicamente a células que proliferan de forma indeseable, tales como células cancerosas, sin dañar células normales, se han anhelado desde hace mucho en la clínica.

Aunque la invención no se limita por ningún mecanismo de acción particular, y sin pretender limitarse por esta teoría, los compuestos de la invención pueden eliminar o suprimir células que proliferan indeseablemente al anular el punto de control G2 en células que proliferan, y/o al ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células detenidas en G2. De esta manera, la invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para eliminar o suprimir células que proliferan indeseablemente al poner en contacto las células con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2 del ciclo celular y/u ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2.

Sin pretender limitarse por esta teoría, la anulación del punto de control G2 en células dañadas en su ADN ocasionaría que las células dañadas en su ADN progresen a través del ciclo celular sin reparar el daño del ADN. Asimismo, la adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células dañadas en su ADN ocasionaría que las células dañadas en su ADN anteriormente detenidas entren en la mitosis sin reparar el daño del ADN. Se entiende en general que las células normales dependen del punto de control G1 como el punto de control principal para detectar daño o defectos en el ADN durante el ciclo celular, y no parecen usar el punto de control G2 en la misma medida para detectar daño o defectos en el ADN, a la vez que las células que tienen un punto de control G1 afectado o defectuoso, por ejemplo la mayoría de las células cancerosas, deben depender del punto de control G2 para detectar daño o defectos en el ADN, y para iniciar la reparación antes de que la célula entre en la mitosis. De esta manera, la anulación del punto de control G2 en células con un punto de control G1 alterado ocasionaría que las células progresen a través del ciclo celular sin reparar ningún daño acumulado en el ADN. Asimismo, la adaptación a la detención del ciclo celular en G2 en células con un punto de control G1 alterado ocasionaría que las células anteriormente detenidas entren en la mitosis sin reparar ningún daño acumulado en el ADN. La expresión "daño del ADN" se utiliza para abarcar daño del ADN no relacionado con el punto de control G1, así como daño del ADN que resulta de un punto de control G1 alterado, de tal modo que las células con un punto de control G1 alterado pueden considerarse "células dañadas en su ADN". En todas las situaciones descritas anteriormente, se espera que el progreso a través del ciclo celular sin reparar daño del ADN dé como resultado supresión o muerte de las células dañadas en su ADN.

Aunque la invención no se limita a un mecanismo de acción particular, se ha observado que los compuestos de la invención pueden anular el punto de control G2 en células que proliferan, y pueden ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2. La anulación del punto de control G2 en células que proliferan dañadas en su ADN permite que la célula dañada en su ADN progrese a través de G2 y entre en la mitosis sin suficiente reparación del daño del ADN. La adaptación a la detención en G2 de células dañadas en su ADN, que da como resultado reingreso de las células anteriormente detenidas dañadas en su ADN en el ciclo celular, permite que la célula dañada en su ADN entre en la mitosis sin suficiente reparación del daño del ADN. Se entiende además que si una célula dañada en su ADN progresa además en el ciclo celular con un punto de control G1 alterado y entra en la fase S, se esperan daños, defectos, y errores adicionales. En todas las situaciones descritas anteriormente, la acumulación de daño podría dar como resultado apoptosis, catástrofe mitótica, necrosis, o supresión celular. Dado que la mayoría de las células cancerosas tienen daño del ADN y/o un punto de control G1 alterado (defectuoso), los compuestos de la invención pueden eliminar o suprimir células cancerosas dado que la anulación del punto de control G2 o adaptación a la

detención en G2 tendrá efectos citotóxicos sobre las células cancerosas, por ejemplo muerte o supresión de las células cancerosas.

Para las células normales sin daño del ADN, se espera que la anulación del punto de control G2 del ciclo celular por los compuestos de la invención tendrá poco o ningún efecto citotóxico. Adicionalmente, puesto que las células normales sin daño del ADN no son susceptibles de estar en detención en G2, se espera que la capacidad de los compuestos de la invención para ocasionar adaptación a la detención en G2 tendrá poco o ningún efecto citotóxico. De esta manera, en una población de células que incluye células que proliferan indeseablemente dañadas en su ADN y células normales, los compuestos de la invención eliminan o suprimen selectivamente células dañadas en su ADN, a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales. En una población de células que incluye células cancerosas que proliferan indeseablemente y células normales, los compuestos de la invención eliminan o suprimen selectivamente las células cancerosas, a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales.

#### Compuestos de la invención para la utilización para tratar células

Cualquier célula cuya proliferación no se desea puede tratarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* con los compuestos de la invención, aunque los métodos de tratamiento llevados a la práctica en el cuerpo humano o animal no se reivindican. Las células candidatas pueden identificarse al poner en contacto una célula de ensayo con un compuesto de la invención solo, o en combinación con un tratamiento que daña el ADN u otro tratamiento anticanceroso, y determinando si la célula puesta en contacto exhibe proliferación disminuida, muerte celular incrementada, o adaptación a la detención del ciclo celular. Las células candidatas pueden identificarse en base a las características, que incluyen, pero no se limitan a, daño del ADN, crecimiento o proliferación aberrante (*in vivo* o *in vitro*), morfología celular, o expresión de marcadores de cáncer. Un diagnóstico clínico de un trastorno proliferativo, tal como cáncer, puede utilizarse como indicio de células que deben tratarse *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* con los compuestos de la invención.

Las células pueden tratarse *in vitro* con los compuestos de la invención. A título de ejemplo solamente, las células pueden retirarse de un sujeto, tratarse *ex vivo* usando los compuestos de la invención, y devolverse al sujeto. Alternativamente, los compuestos de la invención son para la utilización en métodos en los que los trastornos de proliferación celular pueden tratarse *in vivo*, en los que los compuestos de la invención pueden administrarse de manera sistémica a un sujeto, por ejemplo por vía oral o en forma intravenosa, o por un método de administración dirigida, por ejemplo inyección en un sitio tumoral, inyección intraperitoneal, o al asociar los compuestos de la invención con dispositivos de suministro, tales como ligandos, anticuerpos, jaulas moleculares, o liposomas capaces de seleccionar por lo menos una célula a tratar.

#### Compuestos de la invención para la utilización en métodos para tratar sujetos

Los sujetos apropiados para el tratamiento usando los compuestos de la invención incluyen sujetos que actualmente se someten a un tratamiento para un trastorno de proliferación celular, o candidatos para el tratamiento para un trastorno de proliferación celular, por ejemplo sujetos que actualmente se someten a, o se designan como candidatos para, tratamiento anticanceroso. Los sujetos incluyen aquellos que tienen un trastorno de proliferación celular, por ejemplo un diagnóstico de cáncer. Los sujetos candidatos incluyen sujetos en riesgo de desarrollar un trastorno de proliferación celular. Por lo tanto, los compuestos de la invención son aplicables para la utilización en métodos para tratar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar un trastorno de proliferación celular pero que no ha exhibido todavía síntomas claros del trastorno y/o que no ha recibido todavía un diagnóstico de un trastorno de proliferación celular.

#### Compuestos de la invención para la utilización en métodos para tratar trastornos de proliferación celular.

Los trastornos de proliferación celular susceptibles al tratamiento usando las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen condiciones patológicas (enfermedades), tanto benignas como neoplásicas, y condiciones fisiológicas no patológicas, caracterizadas por cantidades de células anormales o indeseables, crecimiento celular o supervivencia celular. Los trastornos o condiciones patológicas pueden constituir un estado de enfermedad, en particular todos los tipos de cáncer, incluyendo crecimientos cancerosos, procesos oncogénicos, metástasis, células y tejidos metastásicos, y células, tejidos, u órganos transformados de manera maligna. Los trastornos de proliferación celular pueden ser no patológicos, incluyendo algunos tipos de crecimiento de tejido fibrótico (por ejemplo, durante la reparación de heridas que da como resultado cicatrización), ciertos trastornos proliferativos de vasos sanguíneos, y ciertas hiperplasias benignas. La presente descripción proporciona suficiente instrucción para permitir que un experto en la materia identifique trastornos de proliferación celular adecuados para el tratamiento usando las composiciones proporcionadas en la presente memoria, y para desarrollar protocolos para tal tratamiento.

Las células que comprenden el trastorno proliferativo pueden agregarse en una masa celular o pueden dispersarse. La expresión "tumor sólido" se refiere a hiperplasias, neoplasias o metástasis que típicamente se agregan en conjunto y forman una masa. Ejemplos particulares incluyen tumores viscerales, tales como cáncer gástrico o de colon, hepatomas, carcinomas venales, tumores/cánceres de pulmón y cerebro. Un "tumor líquido" generalmente se refiere a neoplasias del sistema hematopoyético, tales como linfomas, mielomas y leucemias, o neoplasias que son difusas

en su naturaleza, dado que no forman típicamente una masa sólida. ejemplos particulares de leucemias incluyen linfoblástica aguda y crónica, mieloblástica y mieloma múltiple.

Tales trastornos incluyen neoplasias o cánceres, que pueden afectar virtualmente cualquier tipo de célula o tejido, por ejemplo carcinoma, sarcoma, melanoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo pero sin limitarse a de mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, cerebro, linfoides, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto), aparato genitourinario (útero, ovario, cuello uterino, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, hígado, hueso, músculo, piel, etc.

Los carcinomas se refieren a neoplasias de tejido epitelial o endocrino, e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. Los carcinomas ejemplificativos incluyen aquellos que se forman en el cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon, hígado y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. El adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o en el que el tumor forma una estructura similar a una glándula.

Los sarcomas se refieren a tumores malignos de origen celular mesenquimatoso. Los sarcomas ejemplificativos incluyen, por ejemplo, linfosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, y fibrosarcoma.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno proliferativo hematopoyético" significa una enfermedad que implica células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo que surgen de los linajes mieloide, linfoides o eritroide, o células precursoras de las mismas. Típicamente, las enfermedades surgen de leucemias agudas pobremente diferenciadas, por ejemplo leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides ejemplificativos adicionales incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML); las neoplasias linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de linaje  $\beta$  y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), tricoleucemia (HLL) y macroglobulinemia de Waldenström (WM). Los linfomas malignos adicionales incluyen, pero no se limitan a, linfoma no de Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T de adultos (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

La invención proporciona composiciones para la utilización en métodos para tratar trastornos de proliferación celular usando los compuestos de la invención. La invención proporciona composiciones para la utilización en métodos para tratar cáncer usando los compuestos de la invención. La invención proporciona composiciones para la utilización en métodos para eliminar o suprimir células cancerosas, usando los compuestos de la invención. La invención proporciona composiciones para la utilización en métodos para tratar trastornos de proliferación celular *in vivo*, *in vitro*, y *ex vivo*. La invención proporciona compuestos de la invención para la utilización en métodos para tratar cáncer *in vivo*, *in vitro*, y *ex vivo*. La invención proporciona compuestos farmacéuticos de la invención para la utilización en la eliminación o supresión de células cancerosas *in vivo*, *in vitro*, y *ex vivo*. La invención proporciona composiciones farmacéuticas (medicamentos) que contienen compuestos de la invención, para la utilización como se describe en la presente memoria, incluyendo pero sin limitarse a, tratar trastornos de proliferación celular, eliminar o suprimir células cancerosas, y tratar cáncer.

La invención proporciona composiciones para la utilización en métodos que incluyen por lo menos un compuesto de la invención en combinación con por lo menos un ingrediente activo adicional. La invención proporciona composiciones farmacéuticas (medicamentos) que incluyen por lo menos un compuesto de la invención en combinación con por lo menos un ingrediente activo adicional, para la utilización en métodos para tratar trastornos de proliferación celular. En particular, la invención proporciona composiciones para la utilización en métodos que incluyen compuestos de la invención en combinación con por lo menos un tratamiento anticanceroso. La expresión "tratamiento anticanceroso", para su uso en combinación con los compuestos de la invención incluye cualquier tratamiento anticanceroso, antiproliferativo, que daña el ADN, o antitumoral como se da a conocer en la presente memoria, incluyendo los "tratamientos que dañan el ADN" y "agentes que dañan el ADN" enumerados anteriormente, o cualquier tratamiento semejante conocido en la técnica. Por ejemplo, un tratamiento anticanceroso (antiproliferativo celular, antitumoral) puede comprender tratamiento con radiación o resección quirúrgica, opcionalmente en combinación con tratamiento farmacológico. El tratamiento puede comprender la administración de una sustancia química, tal como un radioisótopo, un fármaco anticanceroso, tal como un agente quimioterapéutico, o terapia génica, tal como un antioncogén (por ejemplo, Rb, DCC, p53, etc.), un oncogén negativo dominante o un antisentido a un oncogén. Los compuestos de la invención son para la utilización en métodos en los que los compuestos pueden administrarse antes de, al mismo tiempo que o después de otros protocolos de tratamiento. Por ejemplo, los compuestos de la invención son para la utilización en métodos en los que puede administrarse a un sujeto candidato para terapia antiproliferativa celular (por ejemplo, terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica, resección quirúrgica, etc.) un compuesto de la invención antes de iniciar la terapia antiproliferativa celular. De esta manera, se proporcionan compuestos de la invención para la utilización en métodos de tratamiento profiláctico.



Como se describe en los ejemplos y se expone a continuación, los compuestos de la invención pueden usarse solos o en combinación, *in vivo*, *ex vivo*, e *in vitro*, en métodos para tratar trastornos de proliferación celular. Como se describe en los ejemplos y se discute a continuación, el compuesto o compuestos de la invención pueden usarse solos o en combinación, *in vivo*, *ex vivo*, e *in vitro*, en métodos para tratar cáncer. Como se describe en los ejemplos y se discute a continuación, los compuestos de la invención pueden usarse solos o en combinación, *in vivo* e *in vitro*, en métodos para eliminar o suprimir células cancerosas.

#### Efectos de los compuestos de la invención

Típicamente se administra una "cantidad eficaz o "cantidad suficiente" de un compuesto de la invención, en el que esa es una cantidad (concentración, dosis, nivel) suficiente para producir un efecto deseado. Las cantidades eficaces se determinan por cualquiera de una diversidad de medidas, incluyendo: muerte celular (por ejemplo, incremento en porcentaje de células en fase subG1), proliferación celular disminuida, cantidades disminuidas de células, masa celular disminuida, apoptosis incrementada, supervivencia disminuida, o adaptación a la detención del ciclo celular (escape de la detención del ciclo celular). Por ejemplo, cuando se desea inhibir la proliferación celular, una cantidad eficaz será una cantidad que disminuye de manera detectable la proliferación celular, o incrementa la muerte celular, o disminuye la supervivencia celular. La cantidad por lo tanto puede ser suficiente para reducir las cantidades de células diana, estabilizar las cantidades de células diana o inhibir los incrementos en cantidades de células diana. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para incrementar el tiempo de supervivencia de un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular.

Por ejemplo, cuando el trastorno comprende un tumor sólido, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención podría reducir el tamaño del tumor, estabilizar el tamaño del tumor, o incrementar el tiempo de supervivencia de un sujeto que tiene el tumor. Como se muestra en el ejemplo 4, cinco (5) compuestos representativos de la invención mostraron citotoxicidad selectiva *in vivo* contra células cancerosas, y citotoxicidad indetectable *in vivo* contra células normales, como se ilustra por los drásticos incrementos en la supervivencia del hospedante del tumor.

Cuando el trastorno comprende un "tumor líquido", una cantidad eficaz de un compuesto de la invención podría reducir las cantidades de células tumorales, estabilizar el número de células tumorales, inhibir incrementos posteriores en el número de células tumorales, u ocasionar que las células cancerosas detenidas en el ciclo celular vuelvan a entrar al ciclo celular (adaptación a la detención del ciclo celular). Además, cantidades eficaces de los compuestos de la invención podrían evitar o inhibir la progresión del trastorno proliferativo, por ejemplo reducir, inhibir, o evitar metástasis.

Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede ser una cantidad que produce un efecto deseado sin producir un efecto inaceptable o indeseable. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede ser una cantidad que elimina o suprime células diana (por ejemplo, células cancerosas) a la vez que tiene poco o ningún efecto citotóxico sobre células no diana (por ejemplo, células normales), o una cantidad que produce un beneficio terapéutico deseado en un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular, a la vez que tiene poco o ningún efecto adverso sobre el sujeto. Además, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede ser una cantidad que, en combinación con otro tratamiento, produce un efecto deseado sin producir un efecto indeseable inaceptable. Como se muestra en el ejemplo 7 y se ilustra en las tablas 4-11 a continuación, el compuesto S00109 tiene poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales en concentraciones que pueden eliminar o suprimir células cancerosas. Además, como se muestra en el ejemplo 7 y se ilustra en las tablas 4-11 a continuación, el compuesto S00109 puede usarse en combinación con otro tratamiento anticanceroso para eliminar o suprimir células cancerosas, a una concentración de S00109 que tiene poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales.

Las cantidades eficaces de los compuestos de la invención pueden reducir o disminuir objetiva o subjetivamente la gravedad o frecuencia de síntomas asociados con el trastorno o padecimiento. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto de la invención podría reducir el dolor, náusea u otro malestar, o incrementar el apetito o bienestar subjetivo.

Las cantidades eficaces de los compuestos de la invención podrían reducir la cantidad (por ejemplo, dosis) o frecuencia de tratamiento con otro protocolo. Por ejemplo, un paciente con cáncer tratado con un compuesto de la invención puede requerir menos agente o tratamiento anticanceroso que daña el ADN con el fin de alcanzar el nivel deseado de inhibición de la proliferación de células cancerosas, es decir, un nivel deseado de eliminación o supresión de células cancerosas que proliferan.

Los métodos descritos en la presente memoria únicamente a título de ejemplo que conducen a una mejora en la condición del sujeto o un beneficio terapéutico que puede ser permanente, pueden extenderse durante un período de tiempo más prolongado, por ejemplo meses o años, o pueden ser relativamente cortos en duración, por ejemplo la mejoría puede durar varias horas, días o semanas. Una cantidad eficaz no necesita alcanzar una terminación completa de cualquiera o todos los síntomas del padecimiento o trastorno. Una cantidad eficaz para proporcionar uno o más efectos beneficiosos, como se describe en la presente memoria o se conoce en la técnica, se refiere como una "mejora" del estado del sujeto o "beneficio terapéutico" al sujeto.

Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede determinarse en base a estudios en animales u opcionalmente en pruebas clínicas humanas. El experto apreciará los diversos factores que pueden influenciar la dosificación y duración requerida para tratar un sujeto particular incluyendo, por ejemplo, la salud general, edad, o sexo del sujeto, la gravedad o etapa del trastorno o padecimiento, tratamientos previos, susceptibilidad a efectos secundarios indeseables, desenlace clínico deseado, y la presencia de otros trastornos o padecimientos. Tales factores pueden influir en la dosis y duración requerida para proporcionar una cantidad suficiente para el beneficio terapéutico. El régimen de dosificación también tiene en consideración la farmacocinética, es decir, la velocidad de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, y aclaramiento de la composición farmacéutica. Además, las dosis o protocolos de tratamiento pueden ajustarse específicamente al sujeto o modificarse con base en datos farmacogenómicos.

#### Adaptación a la detención del ciclo celular en G2 inducida por daño del ADN

Aunque la invención no se limita a un mecanismo de acción particular, se ha determinado que los compuestos de la invención pueden ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2. De esta manera, la invención proporciona una composición para la utilización en métodos para anular o escapar de la detención del ciclo celular en G2, en particular la detención del ciclo celular en G2 iniciada por daño del ADN. En células dañadas en su ADN, se entiende que las funciones del punto de control G2 inducido por daño a ADN incluyen el reconocimiento del daño del ADN y generación de una señal que produce detención del ciclo celular, de tal modo que las células dañadas en su ADN se detienen en fase G2 hasta que la reparación se termina. Los compuestos de la invención pueden ocasionar que las células en detención del ciclo celular en G2 vuelvan a entrar al ciclo celular, posiblemente al anular el punto de control G2 inducido por daño a ADN en las células detenidas en G2. Como se demuestra en los ejemplos, tablas y figuras de la presente descripción, los compuestos de la invención pueden inducir a las células en detención del ciclo celular en G2 (es decir, células que tienen daño preexistente en el ADN) a reingresar al ciclo celular, procediendo a través de las fases G2 y M y entrando a las fases G1 (duplicación de ADN) con daño no reparado en el ADN, conduciendo a muerte celular o supresión celular, usualmente por catástrofe mitótica o apoptosis.

Como se describe en el ejemplo 1 y se muestra en la figura 1, células Jurkat (una línea celular derivada de linfoma humano de células T) se "predetuvieron" en la fase G2 por irradiación de rayos X y se trataron con S00109 o S01860 a diversas dosificaciones. La adaptación a la detención del ciclo celular en G2 se determinó al medir el porcentaje de células en fase G1, en el que las células en G1 se identificaron por tener 2N ADN. Las células expuestas a S00109 o S01860 mostraron un incremento dependiente de la dosis en el porcentaje de células en fase G1 (el "incremento G1"). Estos resultados indicaron que la exposición a S00109 o S01860 en concentraciones de 0,019  $\mu\text{M}$  a 0,625  $\mu\text{M}$  ocasionó que las células detenidas en G2 volvieran a entrar al ciclo celular y procedieran a través de la fase M y entraran a la fase G1. En contraste, solamente cierto porcentaje de células en la población de células sin tratar detenidas en G2 (es decir, sin exposición a S00109 o S01860) entraron en la fase G1.

La adaptación a la detención del ciclo celular en G2 por los compuestos de la invención se presenta en los ejemplos 5 y 6, y se ilustran en las tablas 1, 2 y 3, que exponen las estructuras y valores  $\text{IC}_{50}$  (la concentración que ocasiona un incremento G1 medio máximo) para aproximadamente 144 compuestos de la invención. Los abundantes datos proporcionados en las tablas 1, 2 y 3 permitieron determinaciones de estructura-actividad.

Otras medidas de actividad del ciclo celular también pueden utilizarse para demostrar la capacidad de los compuestos de la invención para anular el ciclo celular en G2 y/u ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular inducida por daño a ADN. Como se describe en el ejemplo 1 e ilustrada en la figura 2, se midió la fosforilación de histona H3, en la que la fosforilación incrementada de histona H3 indicó adaptación a (escape de) la detención del ciclo celular inducida por daño a ADN. La detención del ciclo celular en G2 se indujo en células Jurkat por daño del ADN, es decir, al suministrar una dosis de 10 Gy de rayos X para producir células "predetenidas". Las células predetenidas se expusieron al compuesto S00109 (también llamado S109) a 0,3  $\mu\text{M}$  o 1  $\mu\text{M}$ , y se observaron incrementos significativos en fosforilación de histona H3 durante un período de tratamiento de 24 horas. Sin pretender limitarse por esta teoría, los compuestos de la invención presumiblemente ocasionaron adaptación a (escape de) la detención del ciclo celular inducida por daño a ADN al anular el punto de control G2 inducido por daño a ADN.

Los compuestos de la invención tienen efectos citotóxicos sobre células cancerosas

Los compuestos de la invención pueden tener un efecto citotóxico sobre células cancerosas, sin ningún tratamiento adicional. De esta manera, la invención proporciona composiciones para la utilización en métodos para eliminar o suprimir células cancerosas sin ningún tratamiento adicional. Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la figura 4, la exposición de células cancerosas humanas a S00109 solo tiene un efecto citotóxico dependiente de la dosis sobre las células cancerosas cuando se mide por un ensayo de formación de colonias (figura 4, "0 Gy" círculos vacíos, línea continua, que indica sin tratamiento de radiación).

Como se describe en el ejemplo 4 y se muestra en las figuras 6, 7, y 8, se proporcionan compuestos de la invención que tienen un efecto citotóxico sobre células cancerosas, sin ningún tratamiento anticanceroso adicional, y sin efectos citotóxicos sobre las células normales. En la figura 4, los ratones recibieron xenoinjertos de células de mieloma humano por trasplante intraperitoneal, y se midieron los efectos de los compuestos de la invención sobre las tasas de

supervivencia. Como se describe en el ejemplo 4 y se muestra en las figuras 6, 7, y 8, el tratamiento con S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747 solo fue suficiente para prolongar la supervivencia de ratones con xenoinjertos de células de mieloma humano, indicando que S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747 tuvieron efectos citotóxicos sobre las células cancerosas trasplantadas en el xenoinjerto. Como se muestra en la figura 6, el tratamiento con S00109 (por inyección intraperitoneal) tuvo un efecto terapéutico mucho mayor sobre la supervivencia que el tratamiento “estándar” con dexametasona, o sin tratamiento en absoluto. Como se muestra en las figuras 7 y 8, la administración oral de diversos compuestos representativos de la invención produjo incrementos drásticos en las tasas de supervivencia, en el que algunos tratamientos tuvieron 100% de tasas de supervivencia al final del experimento. Estos resultados demuestran que los compuestos de la invención, como se ilustra por los cinco (5) distintos compuestos representativos ensayados en el ejemplo 4, pueden tener citotoxicidad selectiva contra células cancerosas, y citotoxicidad indetectable contra células normales (es decir, las células normales del hospedante del injerto tumoral de ratón). Estos resultados *in vivo* demuestran que los compuestos de la invención, como se ilustra por los cinco (5) distintos compuestos representativos ensayados en el ejemplo 4, pueden tener citotoxicidad selectiva *in vivo* contra células cancerosas, y citotoxicidad indetectable *in vivo* contra células normales. Estos resultados demuestran que los compuestos de la invención, como se ilustra por los cinco (5) distintos compuestos representativos de la presente invención administrados por diferentes rutas en el ejemplo 4, pueden administrarse a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto.

Los compuestos de la invención pueden sensibilizar células a los tratamientos anticancerosos

Los compuestos de la invención pueden incrementar, o exacerbar, los efectos citotóxicos de otros tratamientos. De esta manera, la invención proporciona composiciones y métodos para sensibilizar células a tratamientos anticancerosos, en particular para sensibilizar células a agentes y tratamientos que dañan el ADN. Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la figura 4, cuando células cancerosas humanas que se han “predetenido” en G2 por irradiación de rayos X también se exponen a S00109, el tratamiento de combinación tiene un mayor efecto citotóxico sobre las células cuando se mide por un ensayo de formación de colonias. En la figura 4, el efecto de sensibilización de los compuestos de la invención se ilustra mejor para las células que recibieron una dosis de 1 Gy (“1 Gy” círculos llenos, línea de rayas) y tratamiento con diversas dosis de S00109, en el que S00109 mostró un efecto aditivo dependiente de la dosis sobre la citotoxicidad. Como se describe en el ejemplo 3 y se muestra en la figura 5, los tratamientos de combinación de S00109 y dexametasona tienen mucha mayor citotoxicidad que cualquier tratamiento solo, cuando se mide por el porcentaje de células en fase subG1, es decir, el porcentaje de células muertas.

Como se describe en el ejemplo 2 y se muestra en la figura 3, la expresión de  $\gamma$ -H2AX fosforilada se midió como un indicador de citotoxicidad. Células tratadas con irradiación de rayos X sola mostraron expresión incrementada de  $\gamma$ -H2AX fosforilada, durante un período de 48 horas. El efecto de sensibilización o “aditivo” de los compuestos de la invención puede observarse en células tratadas con irradiación de rayos X seguido de exposición a 1  $\mu$ M de S00109 (indicado como “S-109 +” en la leyenda de la figura) dando como resultado niveles significativamente mayores de expresión de  $\gamma$ -H2AX fosforilada durante el mismo período de 48 horas, que indica niveles significativamente mayores de citotoxicidad debido a la administración de S00109.

Los compuestos de la invención tienen citotoxicidad selectiva frente a células cancerosas

Según todavía otro aspecto de la invención, los compuestos de la invención pueden eliminar o suprimir selectivamente células diana, en particular células cancerosas, con poco o ningún efecto citotóxico sobre células normales (no diana). La mayoría de los agentes anticancerosos convencionales seleccionan como objetivo células que proliferan independientemente de si son células cancerosas o células normales, con el resultado de que la mayoría de los medicamentos anticancerosos convencionales dan lugar a efectos secundarios tales como náusea, diarrea, o pérdida de cabello. En contraste, los compuestos de la invención seleccionan selectivamente como dianas a células que tienen condiciones tales como un punto de control G1 alterado, detención del ciclo celular en G2, u otros tipos de daño del ADN, eliminando o suprimiendo selectivamente las células diana a la vez que tienen poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales.

La selectividad de los compuestos de la invención se describe en el ejemplo 7 y se muestra en las tablas 4 a 11, en las que los compuestos de la invención no fueron citotóxicos para las células normales en concentraciones en las que los compuestos de la invención tuvieron severos efectos citotóxicos sobre células cancerosas y células dañadas en su ADN (por ejemplo, células irradiadas). De esta manera, la invención proporciona compuestos para la utilización en métodos para seleccionar selectivamente a células dañadas en su ADN tales como células cancerosas, con poco o ningún efecto citotóxico sobre células normales (sin daño), al poner en contacto las células con por lo menos un compuesto de la invención en una cantidad suficiente para anular el punto de control G2. La invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen por lo menos un compuesto de la invención, adecuadas para la utilización en métodos para seleccionar selectivamente a células dañadas en su ADN tales como células cancerosas, con poco o ningún efecto citotóxico sobre células normales (sin daño).

Uso de los compuestos de la invención para cribado

Los compuestos de la invención pueden usarse en protocolos de cribado basados en el fenotipo del ciclo celular, por

ejemplo como se da a conocer por Sha et al. ((2007) Mol Cancer Ther, 6: 147-153), para identificar compuestos candidatos que pueden interactuar con el punto de control G2 y/o con otros procesos implicados en la adaptación a la detención del ciclo celular en G2. Los compuestos de la invención pueden usarse en protocolos de cribado para identificar compuestos candidatos para la anulación terapéutica del punto de control G2 y/o adaptación terapéutica a la detención en G2. Este protocolo de cribado puede usarse para identificar compuestos que tienen actividad biológica deseada. Los compuestos identificados de esta manera pueden evaluarse además para actividad citotóxica selectiva contra células cancerosas. Los compuestos pueden evaluarse en tratamientos de combinación con agentes anticancerosos convencionales, tal como dexametasona.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Efectos de los compuestos de ensayo S00109 y S01860 sobre células Jurkat detenidas en la fase G2.

Células Jurkat (una línea celular derivada de linfoma humano de células T) se detuvieron en la fase G2 por irradiación de rayos X a 10 Gy, y se cultivaron durante 24 horas en 10% de suero fetal de ternera (FCS)/RPMI1640 a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>/aire (el FCS procedía de Equitech-Bio, Kerrville, TX, y el RPMI1640 procedía de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.). Los compuestos de ensayo se añadieron al medio en las dosis indicadas, y las células se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente, durante 24 horas adicionales antes de recolectarlas.

Las células recolectadas se tiñeron con amortiguador de Krishan (0,1% de citrato de sodio, 50 µg/ml de yoduro de propidio, 20 µg/ml de RNasa A, 0,5% de Nonidet P-40) y se analizaron por citometría de flujo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para identificar la etapa celular de cada célula en la muestra. Las células en fase G1 se identificaron por tener doble contenido de ADN (2N). La figura 1 muestra el porcentaje de células en fase G1 después del tratamiento con cada compuesto a las dosificaciones indicadas.

El valor de IC<sub>50</sub> para cada compuesto se calculó como la dosificación que muestra la actividad media máxima para inducir el incremento del porcentaje de células en fase G1 (el incremento G1). Los valores de IC<sub>50</sub> se usaron para medir la actividad de los compuestos y para determinar las interrelaciones estructura-actividad.

Como se muestra en la figura 1, las poblaciones de células Jurkat predetenidas, tratadas con el compuesto S00109 o S01860 durante 24 horas, mostraron un incremento significativo en el número de células en G1, indicando que las células fueron capaces de entrar en el ciclo celular nuevamente.

#### Fosforilación de histona H3

Las cantidades incrementadas de células en fase G1 ("células en G1" detectadas por 2N ADN) después del tratamiento con rayos X indicaron que el punto de control G2 se había anulado y/o que las células se habían adaptado a (escapado de) la detención del ciclo celular en G2 impuesta por la activación del punto de control G2 por el tratamiento con rayos X (es decir, activación del punto de control G2 inducido por daño a ADN por el tratamiento con rayos X). El nivel de fosforilación de histona H3 se midió en células predetenidas tratadas con los compuestos de ensayo, para confirmar que las células predetenidas habían reingresado al ciclo celular y pasado a través de la fase M antes de proceder a la fase G1. La fosforilación incrementada de histona H3 indicó adaptación a (escape de) detención del ciclo celular o anulación del punto de control G2/M inducidas por daño.

Células Jurkat se irradiaron con 10 Gy de rayos X y se cultivaron 24 horas en 10% de FCS-RPMI. El compuesto de ensayo S00109 se añadió al medio de cultivo a 0,3 o 1 µM, y las células se cultivaron con el compuesto de ensayo durante tiempos de tratamiento de 0 a 24 horas. Las células se fijaron con etanol frío, se trataron con 0,1% de saponina/PBS, se tiñeron con antifosfo-histona H3 (Ser10) (Upstate Biotechnology, Uppsala, Suecia) y se analizaron con citometría de flujo (BD Biosciences). En la figura 2, el eje X indica tiempo de tratamiento, es decir, tiempo después de la adición de S00109, y el eje Y indica la relación (%) de células que fueron positivas a fosfo-histona-H3. El nivel de fosforilación de histona H3 (%) después del tratamiento secuencial de células Jurkat con irradiación de rayos X (10 Gy) y compuesto S00109 a 1 µM (cuadros vacíos) y 0,3 µM (círculos llenos) aumentó al aumentar el tiempo de tratamiento hasta 24 horas.

### Ejemplo 2: Citotoxicidad de S00109 solo o en combinación con radiación

#### Expresión de histona H2AX fosforilada

La expresión de histona H2AX fosforilada (γH2AX fosforilada en Ser139) se midió como indicador de citotoxicidad, en particular citotoxicidad relacionada con ADN dañado. Células Jurkat se irradiaron con 10 Gy de rayos X y se cultivaron 24 horas en 10% de FCS-RPMI como se describe anteriormente. Entonces, S00109 se añadió al medio de cultivo a 1 µM durante los tiempos de tratamiento de hasta 24 horas. Las células se lisaron en un amortiguador (100 mM de NaCl,

10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM de DTT, 0,2% de NP-40, 10 mM de NaF, 10 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 500 nM de ácido okadaico, e inhibidores de proteinasas). Alícuotas del lisado (30  $\mu\text{g}$  de proteína) se sometieron a electroforesis en un gel de SDS PAGE al 15% y se transfirieron a una membrana para análisis de transferencia Western. Un anticuerpo antifosfo-histona H2AX (Ser 139) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) se usó para detectar  $\gamma\text{-H2AX}$  en la membrana transferida. Como se muestra en la figura 3, los niveles de  $\gamma\text{H2AX}$  incrementaron el tiempo de tratamiento con S00109, indicando que S00109 ocasionó daño al ADN, además del daño del ADN ocasionado por la radiación.

#### Análisis de formación de colonias

La actividad citotóxica de S00109 se confirmó además por análisis de formación de colonias usando células HCT-116, una línea celular de cáncer de colon humano, en el que una disminución en los recuentos de colonias es una medida de la supresión del crecimiento celular y/o de muerte celular. Células de cáncer de colon humano HCT-116 se cultivaron en McCoy's 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% de FCS, 5% de  $\text{CO}_2$ /aire a 37°C. Las células se sembraron a 300 células por placa de 6 pocillos por triplicado, se irradiaron con rayos X como se muestra en la leyenda de la figura, y se cultivaron durante 24 horas, entonces se trataron con S00109 a las dosificaciones indicadas y se cultivaron durante 8 días. En el día 8, las colonias se fijaron y tiñeron con violeta cristal (Sigma-Aldrich), y se contó el número de colonias. La figura 4 muestra el efecto de la dosis de S00109 (eje x) sobre las cantidades de colonias (eje y) contadas en el día 8.

Las células que no recibieron radiación ("0 Gy" círculos vacíos, línea continua en la leyenda de la figura 4) se cultivaron bajo las mismas condiciones que las células irradiadas, y se trataron con S00109 para mostrar los efectos de S00109 solo. De esta manera, como se muestra en la figura 4, S00109 solo suprimió la formación de colonias por células HCT-116 de manera dependiente de la dosis, indicando que S00109 solo puede suprimir el crecimiento de células cancerosas y/o eliminar células cancerosas a una dosificación suficientemente alta.

El recuento de colonias "normales" para las células control sin tratar se muestra por el valor para 0 Gy y 0  $\mu\text{M}$  de S00109.

Las células que recibieron una dosis de radiación de 1 Gy (círculos llenos, línea punteada) mostraron una inhibición de la formación de colonias debido a radiación sola. Las células que recibieron una dosis de radiación de 1 y se expusieron a S00109 mostraron además inhibición de la formación de colonias, indicando que S00109 puede aumentar la citotoxicidad del tratamiento con radiación. Bajo estas condiciones de radiación y tratamiento con S00109, se observó un fuerte efecto aditivo dependiente de la dosis de S00109.

Las células que recibieron una dosis de radiación de 3 Gy ("3 Gy" cuadro vacío, línea continua) mostraron una fuerte inhibición de la formación de colonias debido a radiación sola. S00109 parece tener un efecto inhibitor adicional detectable en la concentración más alta (4  $\mu\text{M}$ ), indicando nuevamente que S00109 puede aumentar la citotoxicidad del tratamiento con radiación.

#### **Ejemplo 3: Citotoxicidad de S00109 solo y en combinación con dexametasona.**

La citotoxicidad de S00109 solo y en combinación con dexametasona se midió al identificar el número de células en fase subG1 después del tratamiento, en el que la fase subG1 indica muerte celular, de tal modo que el número de células en fase subG1 después del tratamiento indica eliminación de células por el tratamiento. Una línea celular derivada de mieloma múltiple humano, ARH-77, se cultivó en presencia o ausencia de S00109, con o sin dexametasona, durante 24 horas en 10% de suero fetal de ternera (FCS)/RPMI1640 a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ /aire usando materiales y condiciones descritos anteriormente. Las células recolectadas se tiñeron con amortiguador de Krishan (0,1% de citrato de sodio, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de yoduro de propidio, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNasa A, 0,5% de Nonidet P-40) y se analizaron con citometría de flujo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

La figura 5 muestra el porcentaje de células ARH-77 en fase subG1 (eje y) después del tratamiento con S00109 (eje x) solo o en combinación con dexametasona. El porcentaje "normal" de células en subG1 en una población de células de control sin tratar se muestra por el valor para S00109 solo (diamantes llenos, línea continua, "S109 solamente" en la leyenda de la figura) a 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de S00109. El tratamiento con S00109 solo, a concentraciones de hasta 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ocasionó muerte celular de manera dependiente de la dosis. El tratamiento con dexametasona solo a 2 ng/ml (cuadros vacíos, línea punteada), 20 ng/ml (triángulos vacíos, línea de puntos/rayas) y 200 ng/ml círculos vacíos, línea de rayas) sin S00109 mostró niveles ligeramente incrementados de células en subG1, es decir, citotoxicidad ligeramente incrementada, en comparación con el control. Sin embargo, el tratamiento con S00109 en combinación con dexametasona dio como resultado un incremento drástico en los niveles de células en subG1. El efecto de la combinación mostró una fuerte dependencia de la concentración de S00109, demostrando un efecto dependiente de la dosis de S00109. La combinación de S00109 y dexametasona dio como resultado un nivel de muerte celular que fue significativamente mayor que el nivel observado con cualquier compuesto solo. De esta manera, S00109 aumentó la citotoxicidad de la dexametasona.

**Ejemplo 4: Efectos de los compuestos representativos de la invención, solos y en combinación, sobre la supervivencia de ratones con xenoinjertos de células ARH-77**

Ratones con xenoinjertos de ARH-77 (una línea celular derivada de mieloma múltiple humano) se trataron con S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747 o con dexametasona, un tratamiento “estándar” reconocido, y su supervivencia se midió y comparó con la supervivencia de ratones con xenoinjertos tratados con vehículo (control). La capacidad de un tratamiento para prolongar la supervivencia se consideró como un indicador de la citotoxicidad del tratamiento frente a las células cancerosas injertadas, sin actividad adversa significativa sobre células normales (ratón) *in vivo*.

A ratones macho con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) de 8 semanas de edad se les trasplantaron, de manera intraperitoneal,  $1,9 \times 10^6$  (Fig. 6),  $0,8 \times 10^6$  (Fig. 7),  $4,1 \times 10^6$  (Fig. 8) células/animal de células ARH-77 (n = 10).

Los animales se alojaron según las directrices de la Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, y los protocolos se aprobaron por el comité del cuidado de animales de institucional de CanBas Co. Ltd.

Para el experimento mostrado en la figura 6, los ratones recibieron  $1,9 \times 10^6$  células ARH-77 por trasplante intraperitoneal. Los ratones tratados con S00109 (“S109”) recibieron una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de S00109. Los ratones tratados con dexametasona (“Dexa”) recibieron una inyección intraperitoneal de 2 mg/kg de dexametasona. Los animales de control tratados con vehículo recibieron una inyección intraperitoneal de vehículo. Cada inyección se realizó en el día 1, día 2 y día 3 después del trasplante de células ARH-77. La supervivencia (eje y, % de ratones que sobreviven) se midió durante hasta 80 días después del trasplante (eje x) para ratones de control tratados con vehículo solo (“Control” línea de rayas); ratones tratados con 50 mg/kg del compuesto S00109 (“S109” línea continua); y ratones tratados con 2 mg/kg de dexametasona (“Dexa” línea de punto y raya). Los ratones tratados con S00109 tuvieron un plazo significativamente más prolongado de supervivencia que los ratones de control sin tratar. Aunque los ratones tratados con dexametasona tuvieron un plazo más prolongado de supervivencia que los ratones de control sin tratar, el efecto terapéutico de la dexametasona fue mucho menor que el efecto terapéutico de S00109.

Para el experimento mostrado en la figura 7, los ratones recibieron  $0,8 \times 10^6$  células ARH-77 por trasplante intraperitoneal. Los ratones se trataron por una sola administración oral de compuestos en el Día 1 después del trasplante como sigue: ratones de control tratados por vía oral con vehículo solo (“Control” línea continua); ratones tratados por vía oral con 750 mg/kg del compuesto S00109 (“S109” línea punteada); y ratones tratados por vía oral con 750 mg/kg del compuesto S01860 (“S1860” línea de rayas). Aunque los ratones tratados con S00109 inicialmente mostraron una supervivencia ligeramente inferior a la de los ratones de control, después de alrededor de 64 días los ratones tratados con S00109 mostraron una supervivencia significativamente mayor a la de los ratones de control, con casi 70% de supervivencia a 85 días, en comparación con solamente alrededor de 20% de los ratones de control que sobreviven a 85 días. Los ratones tratados con S01860 mostraron tasas de supervivencia drásticamente mayores que los ratones de control o ratones tratados con S00109, en el que la primera disminución en supervivencia no se observó hasta 70 días después del trasplante, y casi 90% de los ratones tratados con S01860 sobrevivieron a los 85 días.

Para el experimento mostrado en la figura 8, los ratones recibieron  $4,1 \times 10^6$  células ARH-77 por trasplante intraperitoneal. Los ratones se trataron por administración oral una vez al día de los compuestos en el Día 1 y administración oral una vez al día de los compuestos en el Día 2 después del trasplante como sigue: ratones de control tratados por vía oral una vez al día durante dos días con vehículo solo (“CONT” línea continua); ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003518 (“S3518” línea punteada); ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003405 (“S3405” línea de rayas); y ratones tratados por vía oral una vez al día durante dos días con 250 mg/kg del compuesto S003747 (“S3747” línea de punto y raya). Los ratones tratados con S03518, S03405 o S03747 mostraron todas las tasas de supervivencia drásticamente mayores que los ratones de control. Los ratones de control mostraron supervivencia disminuida comenzando alrededor de 29 días después del trasplante, y solamente alrededor de 30% de supervivencia a 50 días después del trasplante. En contraste, los ratones tratados con S03518, S03405 o S03747 mostraron muy poca disminución en supervivencia, y aún tuvieron tasas extremadamente altas de supervivencia de entre 80-100% a los 50 días después del trasplante.

Estos resultados demostraron que S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747, administrados de manera intraperitoneal o por vía oral, tuvieron citotoxicidad selectiva *in vivo* contra células cancerosas (células ARH 77 del tumor xenoinjertado) a la vez que tienen citotoxicidad indetectable contra células normales (el hospedante del injerto de ratón). Estos resultados demostraron que cinco compuestos diferentes de la presente invención se administraron a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto.

**Ejemplo 5: Capacidad de los compuestos representativos para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 e inducir células detenidas en G2 para reingresar al ciclo celular**

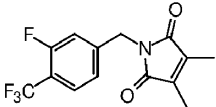
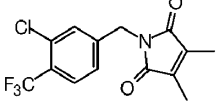
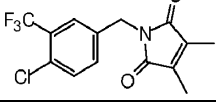
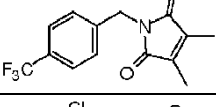
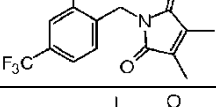
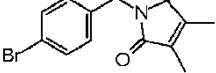
Los compuestos representativos se sintetizaron de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria. La estructura y otras propiedades de cada compuesto se determinaron por espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  para cada compuesto sintetizado.

Células Jurkat predetenidas se prepararon como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, las células Jurkat se sometieron a irradiación de rayos X a una dosis de 10 Gy, y se cultivaron durante 24 horas en 10% de suero fetal de ternera (FCS)/RPMI1640 a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>/aire, después de cuyo tiempo las células se expusieron a diversas concentraciones de compuestos de ensayo, y se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas adicionales antes de recolectarlas. Las células recolectadas se tiñeron con amortiguador de Krishan (0,1% de citrato de sodio, 50 µg/ml de yoduro de propidio, 20 µg/ml de RNasa A, 0,5% de Nonidet P-40) y se analizaron por citometría de flujo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para identificar la etapa celular de cada célula en la muestra. Las células en fase G1 se identificaron por tener doble contenido de ADN (2N).

El valor de IC<sub>50</sub> para cada compuesto se calculó como la dosificación (concentración en µM) que ocasionó un incremento medio máximo del porcentaje de células en fase G1 (el incremento G1) medido para ese compuesto de ensayo. La tabla 1 a continuación presenta la estructura, masa, valores de RMN 1H, y valores de IC<sub>50</sub> para los compuestos representativos.

Tabla 1. Compuestos representativos y valores de IC<sub>50</sub>

|    | SCID   | Estructura | MS (m/e)       | RMN 1H   | IC <sub>50</sub> (µM) |
|----|--------|------------|----------------|--|-----------------------|
| 2  | S00073 |            | 286,4<br>(M+1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 8,37 (s, 1H), 7,70-7,60 (dd, J= 1,8, 8,7 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,60 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 2,05 (s, 6H)                                     | 2,5                   |
| 5  | S00109 |            | 318,0 (M-1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,70 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,45 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 2,07 (s, 6H)  | 0,12                  |
| 6  | S00170 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,7970 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,65-7,62 (m, 2H), 7,53-7,48 (m, 3H), 7,14 (s, 1H), 6,5640 (d, J= 8,47 Hz, 1H), 3,44 (s, 3H), 2,3108 (s, 3H6H) | 0,12                  |
| 11 | S00451 |            | 314,2 (M-1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,63 (d, J=8,4 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,26 (d, J=8,4 Hz, 1H), 3,61(s, 3H), 2,05 (s, 6H), HPLC-MS (m/e): 314,2 (M-1)                       | 60                    |
| 13 | S00110 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 8,79 (s, 1H), 7,85-7,89 (dd, J=2,2, 8,3 Hz, 1H), 7,33-7,36 (d, J=8,0 Hz, 1H), 4,87 (s, 2H), 2,01 (s, 6H)                                  | 60                    |
| 29 | S00499 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,60 (s, 1H), 7,40 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,61 (d, J=8,4 Hz, 1H), 3,88 (s, 2H), 2,03 (s, 6H), 1,59(s, 3H)                       | 5                     |
| 30 | S00699 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 2,05 (s, 6H), 6,50 (s, 1H), 6,62 (d, J=8,7 Hz, 1H), 7,36 (d, J=8,4, 1H), 7,59 (s, 1H)   | 10                    |
| 31 | S00624 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,75 (d, J=1,2 Hz, 1H), 7,39-7,42 (m, 1H), 6,59 (d, J=8,7 Hz, 1H), 6,50 (s, 1H), 2,06 (s, 6H)   | 10                    |
| 35 | S00405 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,33 (m, 1H), 7,04 (m, 1H), 6,82 (m, 1H), 6,01 (s, 1H), 2,05 (s, 6H)  | 2,5                   |
| 36 | S00516 |            |                | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,50 (d, J=9,0 Hz, 1H), 7,05 (d, J=3,0 Hz, 1H), 6,76-6,72 (dd, J=2,7, 8,4 Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 2,05 (s, 6H)                             | 1,25                  |

|    | SCID   | Estructura   | MS (m/e) | RMN 1H  | IC50 (μM) |
|----|--------|--|----------|---|-----------|
| 47 | S00412 |   |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,51-7,56 (m, 1H), 7,14-7,21 (m, 2H), 4,66 (s, 2H), 2,00 (s, 6H)                                   | 10        |
| 48 | S00513 |   |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,60 (d, J=8,1 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,30 (d, J=8,1 Hz, 1H), 4,64 (s, 2H), 1,98 (s, 6H)           | 5         |
| 49 | S00201 |   |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,65 (s, 1H), 7,45 (d, J=3 Hz, 2H), 4,64 (s, 2H), 1,97 (s, 6H)                                     | 10        |
| 50 | S00088 |   |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,50 (d, J=8,1 Hz, 2H), 7,40 (d, J=8,7 Hz, 2H), 4,69 (s, 2H), 1,97 (s, 6H)                         | 10        |
| 51 | S00408 |   |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,63 (s, 1H), 7,44-7,46 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,26-7,27 (d, J=6,2 Hz, 2H), 4,82 (s, 2H), 2,01 (s, 6H) | 10        |
| 52 | S00543 |  |          | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,43 (m, 2H), 7,30 (m, 2H), 5,25 (m, 1H), 1,92 (s, 6H), 1,77 (d, J=5,4 Hz, 3H)                     | 60        |

**Ejemplo 6: Capacidad de los compuestos representativos para ocasionar adaptación a la detención del ciclo celular en G2 e inducir células detenidas en G2 para que reingresen al ciclo celular**

5 Los compuestos representativos se sintetizaron de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria. La estructura y otras propiedades fisicoquímicas de cada compuesto se determinaron por espectroscopía de RMN 1H para cada compuesto sintetizado.

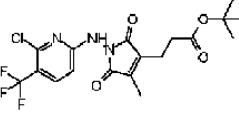
10 Células Jurkat predetenidas se prepararon como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, las células Jurkat se sometieron a irradiación de rayos X a una dosis de 10 Gy, y se cultivaron durante 24 horas en 10% de suero fetal de ternera (FCS)/RPMI1640 a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>/aire, después de cuyo tiempo las células se expusieron a diversas concentraciones de compuestos de ensayo, y se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas adicionales antes de recolectarlas. Las células recolectadas se tiñeron con amortiguador de Krishan (0,1% de citrato de sodio, 50 μg/ml de yoduro de propidio, 20 μg/ml de RNasa A, 0,5% de Nonidet P-40) y se analizaron por

15 citometría de flujo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para identificar la etapa celular de cada célula en la muestra. Las células en fase G1 se identificaron por tener doble contenido de ADN (2N).

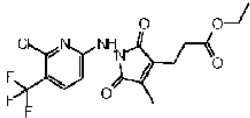
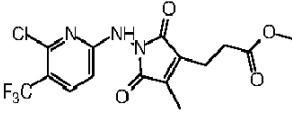
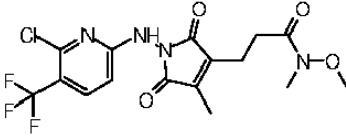
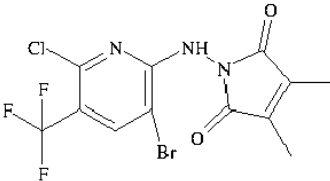
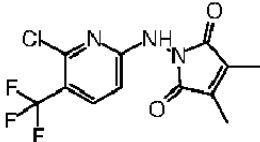
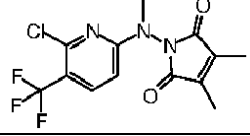
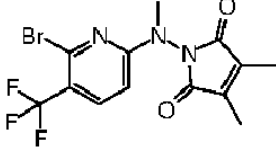
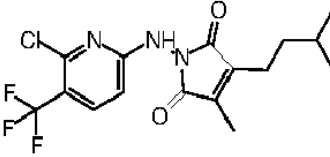
El valor de IC<sub>50</sub> para cada compuesto se calculó como la dosificación (concentración en μM) que ocasionó un incremento medio máximo del porcentaje de células en fase G1 (el incremento G1) medido para ese compuesto de ensayo. La tabla 2 a continuación presenta estructuras, nombre IUPAC, fórmula molecular, número ID ("SCID"), masa, valores de RMN 1H, y valores de IC<sub>50</sub> para los compuestos representativos. La tabla 3 presenta estructuras, nombre IUPAC, fórmula molecular, número ID ("SCID"), masa, valores de RMN 1H, y valores de IC<sub>50</sub> para compuestos

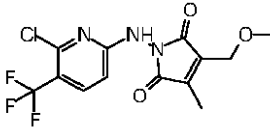
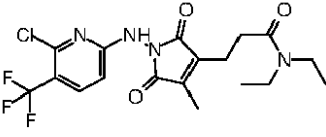
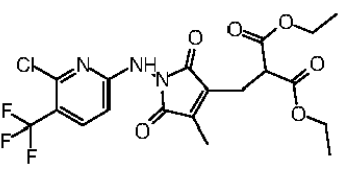
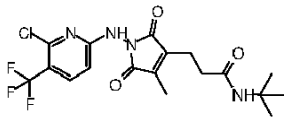
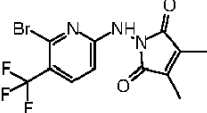
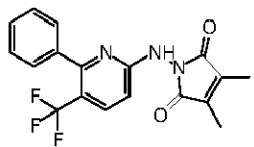
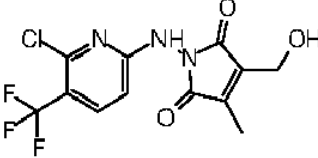
20 representativos adicionales.

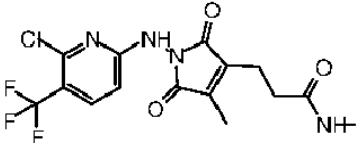
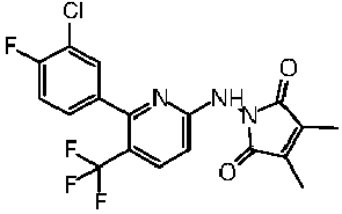
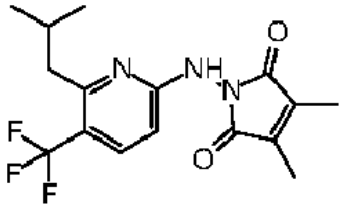
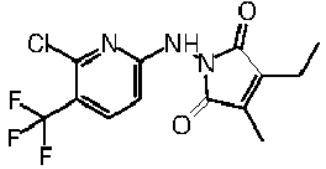
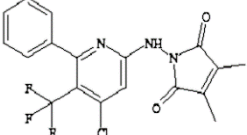
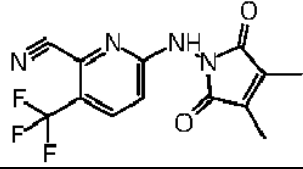
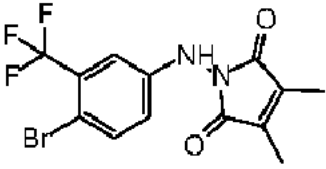
25 Tabla 2. Compuestos representativos y valores de IC<sub>50</sub>

| Caracteres fisicoquímicos |   |  |                          |   |                       |
|---------------------------|---|--|--------------------------|---|-----------------------|
| SCID                      | Estructura  | Nombre IUPAC   | Masa (m/e)               | <sup>1</sup> H NMR  | IC <sub>50</sub> (μM) |
| S01860                    |  | 3-(1-([6-cloro-5-(trifluorometil)](2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)propanoato de <i>terc</i> -butilo | 432,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,79 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,50 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 2,75 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,58 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,43 (s, 9H) | 0,03                  |



| Caracteres fisicoquímicos |   |   |                          |  |                       |
|---------------------------|---|---|--------------------------|--|-----------------------|
| SCID                      | Estructura  | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)               | <sup>1</sup> H NMR   | IC <sub>50</sub> (μM) |
| S01861                    |    | 3-(1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanoato de etilo          | 404,1(M <sup>-</sup> 1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,79 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,50 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,79-2,65 (m, 4H), 2,12 (s, 3H), 1,26 (t, J = 7,1Hz, 3H). | 0,05                  |
| S01648                    |    | 3-(1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)propanoato de metilo         | 390(M <sup>+</sup> +1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,78 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,50 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 2,81-2,66 (m, 4H), 2,11 (s, 3H).  | 0,078                 |
| S01796                    |    | 3-(1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-2,5-dioxoazolin-3-il)-N-metoxi-N-metilpropanamida | 419,2(M <sup>-</sup> 1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,76 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,51 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,17 (s, 3H), 2,81 (s, 4H), 2,11 (s, 3H).                              | 0,078                 |
| S01981                    |   | 1-((3-bromo-6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                          | 396(M <sup>-</sup> 1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,97(s, 1H), 7,07(s, 1H), 2,07(s, 6H)  | 0,078                 |
| S00109                    |  | 1-((6-cloro-3-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                                  | 318,0 (M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,80-7,70(d, J=8,7Hz, 1H), 7,10(s, 1H), 6,55-6,45(d, J=8,7Hz, 1H), 2,07(s, 6H)   | 0,12                  |
| S00170                    |  | 1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]metilamino)-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                             | /                        | (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) δ: 7,70 (d J= 8,4 Hz, 1H), 6,40 (d, J=8,7 Hz, 1H), 3,44 (s, 3H), 2,08 (s, 6H)  | 0,12                  |
| S01007                    |  | 1-((6-bromo-5-(trifluorometil)(2-piridil)]metilamino)-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                             | 375,9(M <sup>-</sup> 1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,70-7,67(d, J=8,7Hz, 1H), 6,48-6,45(d, J=8,7Hz, 1H), 3,44(s, 3H), 2,06(s, 6H)   | 0,12                  |
| S01554                    |  | 1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino)-4-metil-3-(3-metilbutil)azolin-2,5-diona                     | 374(M <sup>-</sup> 1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,81-7,77 (d, J=8,7Hz, 1H), 6,73(s, 1H), 6,51-6,47(d, J=8,7Hz, 1H), 2,50-2,44(m, 2H), 2,07(s, 3H), 1,50-1,42(m, 3H), 0,97-0,94 (d, J=6,6Hz, 6H)        | 0,12                  |

| Caracteres fisicoquímicos |   |  |                         |   |                       |
|---------------------------|---|--|-------------------------|---|-----------------------|
| SCID                      | Estructura  | Nombre IUPAC   | Masa (m/e)              | <sup>1</sup> H NMR  | IC <sub>50</sub> (μM) |
| S01599                    |    | 1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-3-(metoximetil)-4-metilazolin-2,5-diona                             | 348(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,80-7,77(d, J =8,4Hz, 1H), 6,92(s, 1H), 6,53-6,50(d, J =8,7Hz, 1H), 4,38(s, 2H), 3,44(s, 3H), 2,20(s, 3H)  | 0,12                  |
| S01711                    |    | 3-(1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)-N,N-dietilpropanamida               | 431(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77(d, J=8,7Hz 1H), 7,13(s,1H), 6,52 (d, J=8,4Hz 1H), 3,40-3,26 (m, 4H), 2,84-2,67(m, 4H), 2,13(s, 3H), 1,18-1,08 (m, 6H)  | 0,156                 |
| S01712                    |    | 2-((1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)metil]propano-1,3-dioato de dietilo | 476(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,79 (d, J = 8,6 Hz 1H), 6,94 (s, 1H), 6,50 (d, J = 8,2 Hz,1H), 4,25-4,16 (m, 4H), 3,86 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 3,05 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 2,11(s, 3H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 6H). | 0,156                 |
| S01758                    |  | N-( <i>terc</i> -butil)-3-(1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)propanamida  | 431,3(M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,79 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,53 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 5,33 (s, 1H), 2,79 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,43 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,10 (s, 3H), 1,32 (s, 9H),               | 0,156                 |
| S00994                    |  | 1-((6-bromo-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-3,4-dimetilazolino-2,5-diona  | 362,0(M <sup>-</sup> 1) | CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,76-7,73(d, J =8,4Hz, 1H), 6,77(br, 1H), 6,53-6,50(d, J =8,7Hz, 1H), 2,08(s, 6H)  | 0,2                   |
| S01266                    |  | 3,4-dimetil-1-((6-fenil-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)azolin-2,5-diona   | 360,2(M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,86-7,82 (d, J=9,0Hz, 1H), 7,45-7,35(m, 5H), 6,48-6,44(d, J=9,0Hz, 1H), 2,02(s, 6H)  | 0,2                   |
| S01470                    |  | 1-((6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil))amino)-3-(hidroximetil)-4-metilazolin-2,5-diona                            | 336(M <sup>+</sup> +1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,93-7,90(d, J=8,5Hz, 1H), 7,69(s, 1H), 6,28-6,25(d, J=8,5Hz, 1H), 3,69(s, 2H), 2,90-2,70(br, 1H), 2,14(s, 3H)  | 0,2                   |

| Caracteres fisicoquímicos |   |   |                           |   |                       |
|---------------------------|---|---|---------------------------|---|-----------------------|
| SCID                      | Estructura  | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)                | <sup>1</sup> H NMR  | IC <sub>50</sub> (μM) |
| S01883                    |    | 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)-N-metilpropanamida | 389,1(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,80-7,77 (d, J=8,4Hz, 1H), 7,08 (s, 1H), 6,56-6,53 (d, J= 8,4Hz, 1H), 5,60-5,50 (br, 1H), 2,90-2,75 (m, 5H), 2,55-2,50(t, J=7,2Hz, 2H), 2,10(s, 3H)          | 0,234                 |
| S01313                    |    | 1-[[6-(3-cloro-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona      | 414,0 (M <sup>+</sup> +1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,89-7,85 (d, J=8,4Hz, 1H), 7,51-7,47 (dd, J=7,5Hz, 2,1Hz, 1H), 7,40-7,35 (br, 1H), 7,18-7,12 (m, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,62-6,58 (d, J=8,7Hz, 1H), 2,05 (s, 6H) | 0,3                   |
| S01457                    |   | 3,4-dimetil-1-[[6-(2-metilpropil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolin-2,5-diona              | 340,3(M <sup>+</sup> +1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,70-7,67 (d, J=6,3Hz, 1H), 6,65 (br, 1H), 6,47-6,44 (d, J=6,6Hz, 1H), 2,61 (d, J=5,4Hz, 2H), 2,07 (s, 6H), 0,85 (s, 3H), 0,84 (s, 3H)                        | 0,3                   |
| S01553                    |  | 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-etil-4-metilazolin-2,5-diona                     | 332(M <sup>-</sup> 1)     | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,79-7,76 (d, J=8,4Hz, 1H), 6,95 (s, 1H), 6,50-6,47 (d, J=8,4Hz, 1H), 2,54-2,46 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 1,27-1,17 (m, 3H)                                      | 0,45                  |
| S01734                    |  | 1-[[4-cloro-6-fenil-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                | 396,3(M <sup>+</sup> +1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,52 (br, 1H), 7,37-7,33 (m, 5H), 6,49 (s, 1H), 2,02 (s, 6H)  | 0,45                  |
| S01475                    |  | 6-[(3,4-dimetil-2,5-dioxazolinil)amino]-3-(trifluorometil)piridin-2-carbonitrilo                    | 309,2(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,83-7,81 (d, J=6,6Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,86-6,84 (d, J=6,6Hz, 1H), 2,08 (s, 6H)  | 0,5                   |
| S00516                    |  | 1-[[4-bromo-3-(trifluorometil)fenil]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona                              | 360,9(M <sup>-</sup> 1)   | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,54-7,50 (d, J=9,0Hz, 1H), 7,07-7,05 (d, J=3,0Hz, 1H), 6,76-6,72 (dd, J=8,7Hz, 2,7Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 2,08 (s, 6H)  | 0,625                 |

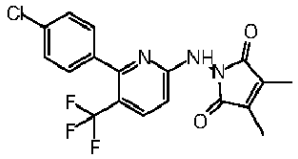
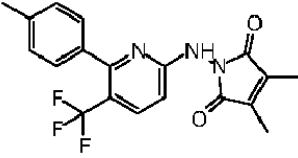
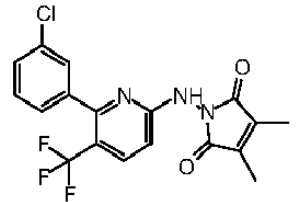
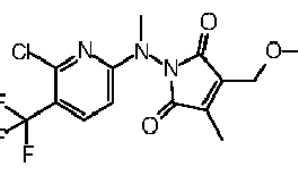
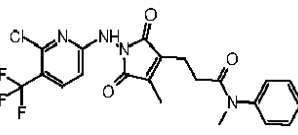
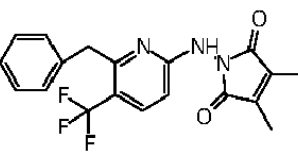
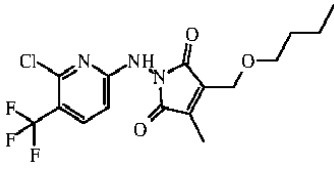
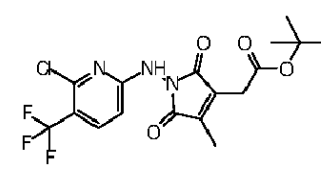
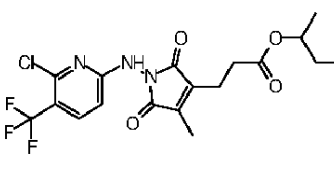
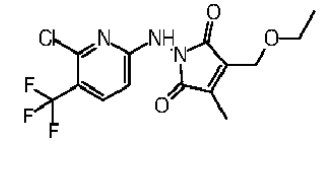
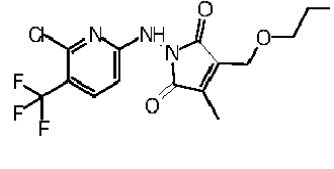
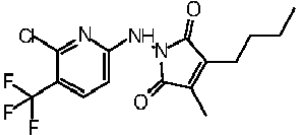
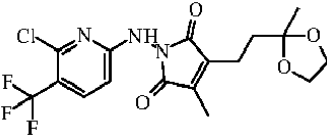
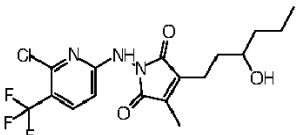
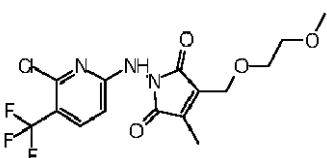
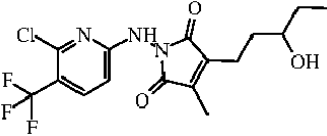
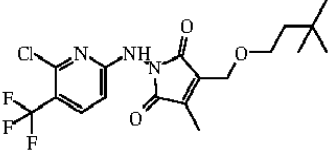
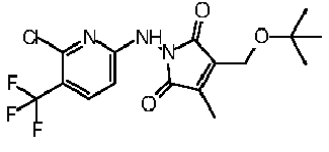
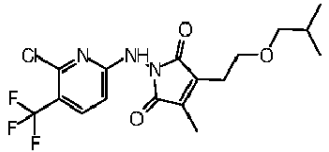
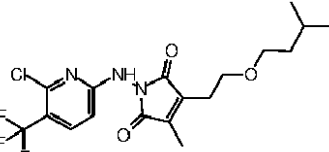
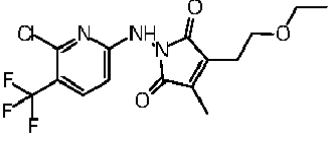
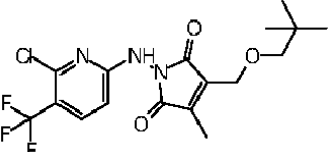
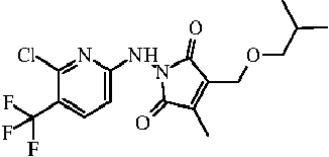
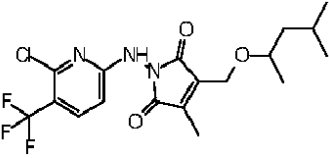
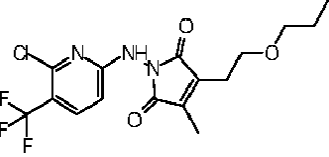
| Caracteres fisicoquímicos |   |   |                           |  |                       |
|---------------------------|---|---|---------------------------|--|-----------------------|
| SCID                      | Estructura  | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)                | <sup>1</sup> H NMR   | IC <sub>50</sub> (μM) |
| S01371                    |    | 1-[[6-(4-clorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolino-2,5-diona                      | 394,4(M <sup>-</sup> -1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,85-7,81 (d, J =8,7Hz, 1H), 7,57 (br, 1H), 7,38-7,31 (m, 4H), 6,47-6,44 (d, J =8,4Hz, 1H), 2,04 (s, 6H)   | 0,625                 |
| S01393                    |    | 3,4-dimetil-1-[[6-(4-metilfenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolino-2,5-diona                      | 374,3 (M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,87-7,84 (d, J =9,0Hz, 1H), 7,36-7,33 (d, J = 8,1Hz, 2H), 7,21-7,18 (d, J = 8,1Hz , 2H), 6,81 (s, 1H), 6,54-6,51 (d, J = 8,7Hz, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,04 (s, 6H)                       | 0,625                 |
| S01474                    |    | 1-[[6-(3-clorofenil)-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolino-2,5-diona                      | 394(M <sup>-</sup> -1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,87-7,84 (d, J =6,6Hz, 1H), 7,41-7,31 (m, 4H), 7,21 (br, 1H), 6,56-6,54 (d, J =6,6Hz, 1H), 2,04 (s, 6H)   | 0,625                 |
| S01600                    |  | 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)-(2-piridil)metilamino]-3-(metiloximetil)-4-metilazolina-2,5-diona            | 362(M <sup>-</sup> -1)    | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77-7,74 (d, J =8,6Hz, 1H), 6,47-6,44 (d, J =8,4Hz, 1H), 4,37 (s, 2H), 3,45 (s, 3H), 3,44 (s, H), 2,20 (s, 3H)  | 0,625                 |
| S01759                    |  | 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)-N-metil-N-fenilpropanamida | 465,3 (M <sup>+</sup> +1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,94 (s, 1H), 7,73 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,43-7,33 (m, 3H), 7,19-7,16 (m, 2H), 6,51 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,24 (s, 3H), 2,70 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,06 (s, 3H) | 0,625                 |
| S01762                    |  | 3,4-dimetil-1-[[6-bencil-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]azolino-2,5-diona                              | 374,3(M <sup>-</sup> -1)  | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,67-7,63 (d, J = 8,4Hz, 1H), 7,22-7,12 (m, 5H), 6,84 (s, 1H), 6,45-6,41 (d, J = 8,7Hz, 1H), 4,08 (s, 2H), 2,00 (s, 6H)  | 0,625                 |

Tabla 3. Compuestos representativos y valores de IC50

| SCID   | Estructura  | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)               | RMN <sup>1</sup> H   | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------|---|---|--------------------------|--|-----------------------|
| S03518 |    | 3-(Butoximetil)-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino}-4-metilazolin-2,5-diona                | 390,2(M-1)               | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 0,90-0,95 (t, J=7,2Hz,3H), 1,35-1,43 (m,2H), 1,54-1,63 (m,2H), 2,20(s,3H), 3,50-3,55(t, J=6,6Hz,2H), 4,41 (s,2H), 6,49-6,52 (d, J=8,4Hz,1H), 6,88 (s,1H), 7,77-7,79 (d, J=8,4Hz, 1H)   | 0,02                  |
| S02225 |    | terc-butil 2-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino}-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)acetato      | 418,0(M-1)               | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,79-7,76 (d, J =8,4Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,51-6,48 (d, J = 8,7Hz, 1H), 3,45 (s, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,25 (s, 9H)  | 0,03                  |
| S02264 |  | 4-metilfenil 3-(1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino}-4-metil-2,5-dioxazolin-3-il)propanoato | 433,9(M <sup>+</sup> +1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,78-7,75 (d, J =8,7Hz,1H), 7,08 (s,1H), 6,50-6,47 (d, J =8,4Hz,1H), 4,85-4,83 (m,1H), 2,79-2,66 (m,4H), 1,59-1,52 (m,2H), 1,21-1,18 (d, J =6,3Hz,3H), 0,90-0,86 (t,3H) CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 1,23-1,28 (t, J =6,9Hz, (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 1,23-1,28 (t, J =6,9Hz, | 0,04                  |
| S02366 |  | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino}-3-(etoximetil)-4-metilazolino-2,5-diona                | 364,0(M <sup>+</sup> +1) | 3H), 2,21 (t, J =1,2Hz,3H), 3,56-3,63 (q, J =6,9Hz,2H), 4,41 (q, J =1,2Hz,2H), 6,48-6,51 (d, J =8,7Hz, 1H), 7,00(s, 1H), 7,75-7,78 (d, J =8,4Hz, 1H)   | 0,04                  |
| S03405 |  | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino}-4-metil-3-[(3-metilbutoxi)metil]azolino-2,5-diona      | 404,2(M-1)               | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 0,87-0,95 (m,6H), 1,47-1,54 (m,2H), 1,66-1,75 (m,1H), 2,19 (s,3H), 3,53-3,57 (t, J =7,2Hz,2H), 4,41 (s,2H), 6,49-6,52 (d, J =8,4Hz,1H), 6,90 (s,1H), 7,77-7,80 (d, J =8,4Hz,1H)  | <0,019                |

| SCID   | Estructura  | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)               | RMN <sup>1</sup> H  | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------|---|---|--------------------------|---|-----------------------|
| S03448 |    | 3-butil-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolino-2,5-diona                                 | 360,0(M <sup>+</sup> +1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,78-7,74 (d, J =9,0Hz, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,50-6,46 (d, J = 8,7Hz, 1H), 2,51-2,45 (t, J = 7,5Hz, 2H), 2,07 (s, 3H), 1,60-1,52 (m, 2H), 1,42-1,34 (m, 2H), 0,97-0,92 (t, J = 7,2Hz, 3H) | 0,156                 |
| S03456 |    | 1-[[6-Chloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[2-(2-metil(1,3-dioxolan-2-il))etil]azolino-2,5-diona | 418,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 1,35 (s,3H), 1,98-2,03 (t, J = 7,2Hz, 2H), 2,07 (s,3H), 2,56-2,61(t, J = 7,2Hz, 2H), 3,88-4,00 (m, 4H), 6,47-6,50 (d, J = 8,7Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 7,76-7,79 (d, J = 8,7Hz, 1H)        | 0,156                 |
| S03552 |   | 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-(3-hidroxiheptil)-3-metilazolino-2,5-diona                     | 404,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77-7,74 (d, J =8,7Hz, 1H), 7,21 (br, 1H), 6,51-6,48 (d, J =8,7Hz, 1H), 3,61-3,59 (m, 1H), 2,65-2,60 (t, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,77-1,62 (m, 3H), 1,47-1,25 (m, 4H), 0,94-0,90 (m, 3H)    | 0,06                  |
| S03742 |  | 1-[[6-Chloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-[(2-metoxietoxi)metil]-4-metilazolino-2,5-diona               | 392,0(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77-7,74 (d, J =8,4Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,52-6,49 (d, J =8,4Hz, 1H), 4,48 (s, 1H), 3,72-3,69 (m, 2H), 3,60-3,56 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 2,20 (s, 3H)                                  | 0,12                  |
| S03745 |  | 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-(3-hidroxiheptil)-3-metilazolino-2,5-diona                     | 390,0(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,76-7,73 (d, J =8,7Hz, 1H), 7,36 (br, 1H), 6,51-6,48 (d, J =8,7Hz, 1H), 3,52-3,51 (m, 1H), 2,64-2,59 (t, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,83-1,62 (m, 2H), 1,55-1,42 (m, 2H), 0,94-0,90 (m, 3H)    | 0,06                  |

| SCID   | Estructura  | Nombre IUPAC   | Masa (m/e)               | RMN <sup>1</sup> H   | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------|---|--|--------------------------|--|-----------------------|
| S03747 |    | 3-[(3,3-Dimetilbutoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona  | 418,1(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77-7,80 (d, J =8,7Hz,1H), 6,77 (s,1H), 6,49-6,52 (d, J =8,4Hz,1H), 4,40 (s,2H), 3,55-3,60 (t, J =7,5Hz,2H), 2,20 (s,3H), 1,53-1,58 (t, J =6,9Hz,2H), 0,92-0,96 (s,9H),   | <0,019                |
| S03873 |    | 4-[(terc-Butoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metilazolin-2,5-diona        | 390,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,80-7,77 (d, J =8,4Hz, 1H), 6,85 (br, 1H), 6,51-6,49 (d, J =8,4Hz, 1H), 4,37 (s, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,28 (s, 9H)  | 0,02                  |
| S03955 |   | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[2-(2-metilpropoxi)etil]azolin-2,5-diona    | 404,1(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 0,86-0,88 (d, J =8,4Hz, 6H), 1,79-1,83 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 2,72-2,76 (t, J =6,6Hz, 2H), 3,17-3,19 (d, J =6,6Hz, 2H), 3,60-3,64 (t, J =6,6Hz, 2H), 6,45-6,48 (d, J =8,7Hz, 1H), 7,03 (s, 1H), 7,75-7,78 (d, J =8,4Hz, 1H)                    | 0,06                  |
| S03956 |  | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[2-(3-metilbutoxi)etil]azolin-2,5-diona     | 418,3(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 0,85-0,92 (d, J =6,6Hz, 6H), 1,39-1,46 (m, 2H), 1,60-1,69 (m, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,72-2,76 (t, J =6,6Hz, 2H), 3,41-3,46 (d, J =6,6Hz, 2H), 3,60-3,64 (t, J =6,6Hz, 2H), 6,45-6,47 (d, J =8,4Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,73-7,76 (d, J =8,4Hz, 1H) | 0,156                 |
| S03960 |  | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-(2-etoxietil)-4-metilazolin-2,5-diona               | 376,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,76-7,73 (d, J =8,4Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 6,48-6,45 (d, J =8,4Hz, 1H), 3,65-3,61 (t, 2H), 3,52-3,45 (q, 2H), 2,76-2,72 (t, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,19-1,14 (t, 3H)   | 0,04                  |
| S03962 |  | 3-[(2,2-Dimetilpropoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona | 404,2(M <sup>-</sup> -1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,80-7,77 (d, J =8,7Hz, 1H), 6,83 (s, 1H), 6,53-6,50 (d, J =8,7Hz, 1H), 4,43 (s, 2H), 3,17 (s, 2H), 2,22 (s, 3H), 0,94 (s, 9H)   | <0,019                |

| SCID   | Estructura   | Nombre IUPAC  | Masa (m/e)              | RMN <sup>1</sup> H   | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------|--|---|-------------------------|--|-----------------------|
| S03963 |   | 1-[[6-Cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metil-3-[(2-metilpropoxi)metil]azolin-2,5-diona    | 390,2(M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,78-7,75 (d, J=8,7Hz, 1H ), 7,12 (s, 1H ), 6,51-6,48 (d, J=8,4Hz, 1H ), 4,41 (s, 2H), 3,30-3,28 (d, J=6,6Hz, 2H), 2,21 (s, 3H ), 1,95-1,86 (m, 1H ), 0,94-0,91 (d, J=6,6Hz, 6H )  | <0,019                |
| S03964 |   | 4-[(1,3-Dimetilbutoxi)metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metilazolin-2,5-diona | 418,1(M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,77-7,74 (d, J=8,4Hz, 1H ), 7,15 (br, 1H ), 6,50-6,47 (d, J=8,4Hz, 1H ), 4,51-4,30 (m, 2H ), 3,64-3,57 (m, 1H), 2,20 (s, 3H ), 1,76-1,69 (m, 1H ), 1,56-1,49 (m, 1H), 1,27-1,23 (m, 1H), 1,21-1,18 (m, 3H), 0,92-0,88 (m, 6H) | 0,04                  |
| S04034 |  | 1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3-metil-4-(2-propoxietil)azolin-2,5-diona            | 390,3(M <sup>-</sup> 1) | (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz) δ: 7,73 (s, 1H ), 7,70 (br, 1H ), 6,47-6,44 (d, J=8,7Hz, 1H ), 3,64-3,60 (t, 2H ), 3,39-3,50 (t, 2H ), 2,76-2,72 (t, 2H ), 2,09 (s, 3H), 1,61-1,49 (m, 2H), 0,91-0,86 (t, 3H)   | 0,04                  |

**Ejemplo 7: Efectos de S00109 solo, y S00109 en combinación con tratamientos adicionales anticancerosos, sobre células normales y sobre células cancerosas**

- 5 Los efectos de S00109 solo, y S00109 en combinación con tratamientos anticancerosos bien conocidos, se determinaron para fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), y células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC), y para células MIAPaCa2 (línea celular derivada de cáncer pancreático), células HCT116 (línea celular derivada de cáncer de colon), células IM9 (línea celular derivada de mieloma múltiple), células ARH-77 (línea celular derivada de mieloma múltiple), células RPMI-8226 (línea celular derivada de mieloma múltiple) y células NCI-H929 (línea celular derivada de mieloma múltiple).

15 Las células se trataron como se describe en las tablas 4-11, luego se recolectaron, se tiñeron con yoduro de propidio para permitir la medida del contenido de ADN, y se analizaron por citometría de flujo para determinar la etapa del ciclo celular de cada célula presente en cada población después del tratamiento. De esta manera, un “fenotipo” o “fenotipo predominante” o “patrón del ciclo celular” se determina en base al porcentaje de células en diversas etapas del ciclo celular (G1, S, G2, M, subG1 (muerta), etc.). Las tablas 4-11 dan a conocer el patrón predominante del ciclo celular, o el cambio más relevante en el patrón del ciclo celular, que corresponde a cada combinación de tratamientos. Por ejemplo, el resultado para una combinación de tratamientos puede darse a conocer como un incremento en el número de células en fase G2 después de la exposición a cierta concentración de S00109, en comparación con el fenotipo predominante que resulta de la exposición a una concentración inferior de S00109, para el mismo tratamiento anticanceroso. De manera similar, el resultado para un tratamiento anticanceroso, en ausencia de tratamiento con S00109, puede darse a conocer como un incremento en el número de células en fase S, en comparación con el control correspondiente (sin tratamiento anticanceroso, sin S00109, mismas condiciones de cultivo).

25 Células normales humanas y células cancerosas humanas se expusieron a S00109 (abreviado S109 en las tablas 4-11) a diversas concentraciones desde nada de S00109 hasta 100 μM de S00109, como se muestra en el encabezado para cada columna.

30 Células normales humanas y células cancerosas humanas se expusieron a una diversidad de tratamientos anticancerosos incluyendo radiación de rayos X, y los agentes anticancerosos (“fármacos anticancerosos”) metotrexato, CPT-11 (irinotecán, Camptosar® ), 5-FU (5-fluorouracilo), CDDP (cisplatino), adriamicina, Gemzar® (gemcitabina), taxol, Velcade® (bortezomib), vincristina, dexametasona, y melfarano. Los tratamientos incluyeron



tratamiento simultáneo con el agente anticanceroso y la dosis indicada de S00109, así como combinaciones de tratamientos escalonados, en los que las células se trataron primero con un tratamiento anticanceroso y luego con la dosis indicada de S00109. En las tablas 4-11 a continuación se presenta una clave para los tratamientos, como se describe en la leyenda para cada fila.

5 Los experimentos de control incluyeron experimentos en los que las células se trataron con S109 a la dosis indicada, y sin tratamiento adicional, indicado como “solo” en las tablas 4-11, en las que “S109 a la dosis indicada” incluye nada de S00109 o S00109 a diversas concentraciones de hasta 100  $\mu$ M, como se indica en cada encabezado de columna. Los experimentos de control incluyeron experimentos diseñados para evaluar los efectos de tiempos de cultivo de 24 h y 48, así como los efectos de etapas adicionales tales como un cambio del medio de cultivo a 3 horas, o la adición de S00109 en una etapa posterior.

| Clave para tratamientos en las tablas 4-11 |  |
|--|--|
| solo 24 h                                  | Las células se cultivaron 24 h sin ningún tratamiento anticanceroso adicional, en medio de cultivo con la dosis indicada de S109, en el que “la dosis indicada de S109” incluye tratamientos de control “Sin S109”   |
| Rayos X 10Gy 24 h estim. simul.            | Las células se irradiaron con rayos X para una dosis total de 10Gy al comienzo del experimento (requiriendo alrededor de 5-10 min.), y se cultivaron en presencia de la dosis indicada de S109, durante 24 horas   |
| Rayos X 10Gy pre-irrad.                    | Las células se irradiaron con rayos X para una dosis total de 10 Gy (alrededor de 5-10 min.) y se cultivaron en medio de cultivo solo durante 24 horas, después a 24 horas tras la irradiación, la dosis indicada de S109 se añadió al medio de cultivo y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales   |
| MTX 0.4 24 h                               | Las células se cultivaron en medio que contenía 0,4 ( $\mu$ g/ml de metotrexato y la dosis indicada de S109 durante 24 horas   |
| MTX 2 24 h                                 | Las células se cultivaron en medio que contenía 2 $\mu$ g/ml de metotrexato y la dosis indicada de S109 durante 24 horas   |
| MTX 10 24 h                                | Las células se cultivaron en medio que contenía 10 $\mu$ g/ml de metotrexato y la dosis indicada de S109 durante 24 horas  |
| solo 3 h 24 h de cultivo                   | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía S109 a la dosis indicada, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin S109, y las células se cultivaron en el medio nuevo durante 24 horas adicionales  |
| CPT-11 50                                  | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 50 $\mu$ g/ml de CPT-11 (irinotecán, Camptosar®) y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin CPT-11 o S109, y las células se cultivaron en el medio nuevo durante 24 horas adicionales |
| 5-FU 20                                    | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 20 $\mu$ g/ml de 5-FU (5-fluorouracilo) y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin 5-FU o S109, y las células se cultivaron en el medio nuevo durante 24 horas adicionales            |
| solo 3 h 48 h cultivo                      | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin S109, y las células se cultivaron en el medio nuevo durante 48 h adicionales   |
| CDDP3                                      | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 3 $\mu$ g/ml de CDDP (cisplatino) y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin CDDP o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| CDDP 10                                    | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 10 $\mu$ g/ml de CDDP y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin CDDP o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| ADR 1                                      | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 1 $\mu$ g/ml de adriamicina y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin adriamicina o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales                                       |
| Gemzar 0,016                               | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,016 $\mu$ g/ml de Gemzar® (Gemcitabina) y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales                             |
| Gemzar 0,08                                | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,08 $\mu$ g/ml de Gemzar® y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo con Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| Gemzar 0,4                                 | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0.04 $\mu$ g/ml de Gemzar® y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |

| Clave para tratamientos en las tablas 4-11 |   |
|--|---|
| Gemzar 2                                   | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,2 µg/ml de Gemzar® y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales |
| Gemzar 10                                  | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 10 µg/ml de Gemzar® y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| Gemzar 50                                  | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 50 µg/ml de Gemzar® y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Gemzar® o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| Taxol 0,0032                               | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,0032 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales  |
| Taxol 0,016                                | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,016 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales   |
| Taxol 0,08                                 | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,08 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales    |
| Taxol 0,4                                  | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 0,4 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales     |
| Taxol 2                                    | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 2 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales       |
| Taxol 10                                   | Las células se cultivaron durante 3 horas en medio que contenía 10 µg/ml de Taxol y la dosis indicada de S109, luego, a las 3 horas, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo sin Taxol o S109, y las células se cultivaron durante 48 h adicionales      |
| 24 h                                       | Las células se cultivaron durante 24 horas sin tratamiento anticanceroso adicional (igual que “solo, 24 h” anteriormente)   |
| Velcade 3                                  | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 3 µg/ml de Velcade® (bortezomib) y S109 a la dosis indicada  |
| Velcade 6                                  | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 6 µg/ml de Velcade® (bortezomib) y S109 a la dosis indicada  |
| Vincristina 2                              | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 2 µg/ml de Vincristina y S109 a la dosis indicada  |
| Vincristina 20                             | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 20 µg/ml de Vincristina y S109 a la dosis indicada   |
| Dexametasona 2                             | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 2 µg/ml de Dexametasona y S109 a la dosis indicada   |
| Dexametasona 20                            | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 20 µg/ml de Vincristina y S109 a la dosis indicada   |
| Dexametasona 200                           | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 200 µg/ml de Vincristina y S109 a la dosis indicada  |
| Sim 24 h ADR 0,1                           | Las células se cultivaron durante 24 horas en presencia de 0,1 µg/ml de adriamicina y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 24 h ADR 0,5                           | Las células se cultivaron durante 24 horas en presencia de 0,5 µg/ml de adriamicina y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 24 h Melf 1                            | Las células se cultivaron durante 24 horas en presencia de 1 µg/ml de melfarano y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 24 h Melf 4                            | Las células se cultivaron durante 24 horas en presencia de 4 µg/ml de melfarano y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| 48 h                                       | Las células se cultivaron durante 48 horas sin ningún tratamiento anticanceroso adicional y en presencia de la dosis indicada de S109   |
| Sim 48 h ADR 0,1                           | Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de 0,1 µg/ml de adriamicina y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 48 h ADR 0,5                           | Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de 0,5 µg/ml de adriamicina y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 48 h Melf 1                            | Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de 1 µg/ml de melfarano y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |
| Sim 48 h Melf 4                            | Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de 4 µg/ml de melfarano y la dosis indicada de S109 (es decir, simultáneamente)   |

| Clave para tratamientos en las tablas 4-11 |   |
|--|---|
| Adición a 24 h                             | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio solo, luego, a las 24 horas, la dosis indicada de S109 se añadió al medio de cultivo y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales   |
| Pre ADR 0,1 Adición 24 h                   | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 0,1 µg/ml de adriamicina, luego, a las 24 horas, se añadió la dosis indicada de S109 al medio que contenía adriamicina y las células se cultivaron en presencia de adriamicina y S109 durante 24 horas adicionales |
| Pre ADR 0,5 Adición 24 h                   | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 0,5 µg/ml de adriamicina, luego, a las 24 horas, se añadió la dosis indicada de S109 al medio que contenía adriamicina y las células se cultivaron en presencia de adriamicina y S109 durante 24 horas adicionales |
| Pre Mel 1 Adición 24 h                     | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 1 µg/ml de melfarano, luego, a las 24 horas, se añadió la dosis indicada de S109 al medio que contenía melfarano y las células se cultivaron en presencia de melfarano y S109 durante 24 horas adicionales         |
| Pre Mel 4 Adición 24 h                     | Las células se cultivaron durante 24 horas en medio que contenía 4 µg/ml de melfarano, luego, a las 24 horas, se añadió la dosis indicada de S109 al medio que contenía melfarano y las células se cultivaron en presencia de melfarano y S109 durante 24 horas adicionales         |
| Adición a 48 h                             | Las células se cultivaron en medio solo durante 48 horas, luego, a las 48 horas, se añadió la dosis indicada de S109 y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales   |
| Pre ADR 0,1 Adición 48 h                   | Las células se cultivaron en medio que contenía 0,1 µg/ml de adriamicina durante 48 horas, luego, a las 48 horas, se añadió la dosis indicada de S109 y las células se cultivaron en presencia de adriamicina y S109 durante 24 horas adicionales                                   |
| Pre ADR 0,5 Adición 48 h                   | Las células se cultivaron en medio que contenía 0,5 µg/ml de adriamicina durante 48 horas, luego, a las 48 horas, se añadió la dosis indicada de S109 y las células se cultivaron en presencia de adriamicina y S109 durante 24 horas adicionales                                   |
| Pre Mel 1 Adición 48 h                     | Las células se cultivaron en medio que contenía 1 µg/ml de melfarano durante 48 horas, luego, a las 48 horas, se añadió la dosis indicada de S109 y las células se cultivaron en presencia de melfarano y S109 durante 24 horas adicionales   |
| Pre Mel 4 Adición 48 h                     | Las células se cultivaron en medio que contenía 4 µg/ml de melfarano durante 48 horas, luego, a las 48 horas, se añadió la dosis indicada de S109 y las células se cultivaron en presencia de melfarano y S109 durante 24 horas adicionales   |

En las tablas 4-11, los resultados se dieron a conocer como sigue.

| Clave para los resultados en las tablas 4-11 |  |
|--|--|
| flecha horizontal →                          | El patrón del ciclo celular (fenotipo) observado después de este tratamiento es el mismo que el patrón observado para células de control (no tratadas) en las condiciones correspondientes, O el patrón para esta dosis de S00109 es el mismo que el patrón observado en la siguiente dosis inferior de S00109   |
| ligeramente G2↑ o ligero G2↑                 | El porcentaje de células en la fase G2 (la población celular en G2) se incrementa ligeramente, en alrededor de 5-10%   |
| ligeramente muertas o ligera muerte↑         | El porcentaje de células en la población celular en subG1 (en el que subG1 es el fenotipo de una célula muerta) se incrementa ligeramente, es decir, alrededor de un 5-10% de incremento en la población en subG1  |
| G2↑  | El porcentaje de células en la población celular en G2 se incrementa (10% -20%)  |
| G1 desafilado                                | Cuando los resultados de la clasificación celular por citometría de flujo se representan gráficamente, la forma del pico que representa la población celular en G1 se ha “desafilado” (más redondeado, más difusamente distribuido, usualmente con colas más prolongadas) en comparación con un pico “puntiagudo” observado en otras poblaciones celulares |
| retraso en S                                 | El porcentaje de células en fase S (la población en fase S) se ha incrementado   |
| G2↑Muerte↑                                   | La población celular en G2 se incrementa en alrededor de 10% -20%, y la población en subG1 (es decir, células muertas) también se incrementa   |
| Congelación o ¿Congelación?                  | El patrón del ciclo celular observado para esta combinación de tratamientos fue el mismo que el control no tratado (sin tratamiento anticanceroso y sin S00109, mismas condiciones de cultivo) aun cuando estas células se sometieron a la combinación especificada de tratamientos.   |
| G1 desafilado G2↓                            | La forma del pico que representa la población celular en G1 se ha “desafilado” (véase anteriormente), y el porcentaje de células en fase G2 (la “población celular en G2”) disminuye   |
| G2↓  | La población celular en G2 disminuye   |

|             |   |
|-------------|---|
| G2          | La población celular en G2 se incrementa ligeramente  |
| S/G2        | El porcentaje de células en fase S/G2 (la "población celular en S/G2") se incrementa ligeramente  |
| S/G2↑       | El porcentaje de células en fase S/G2 (la "población celular en S/G2") se incrementa significativamente   |
| Muerte      | La población celular en subG1 (células muertas) se incrementa   |
| SIN o Ciclo | El patrón del ciclo celular para esta población celular es el mismo que el patrón de las células de control sin tratar correspondientes, a pesar del hecho de que esta población celular se trató como se indica.   |
| Desafilado  | Cuando los resultados de la clasificación celular por citometría de flujo se representan gráficamente, las formas de todos los picos que corresponden a células en diferentes fases del ciclo celular están "desafiladas" (redondeadas, difusamente distribuidas, no "puntiagudas") |

## Resultados

5 Los resultados muestran que S00109 tuvo efectos citotóxicos más graves sobre células cancerosas y poco o ningún efecto citotóxico sobre las células normales. Expresado alternativamente, los resultados muestran que la mayoría de las células cancerosas son más sensibles a S00109 que lo que lo son la mayoría de las células normales. Estos resultados coinciden con los resultados de los experimentos de trasplante de tumor de xenoinjerto ARH-77 del ejemplo 4, en los que el tratamiento de ratones que llevan tumores xenoinjertados con S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747 dio como resultado incrementos drásticos en las tasas de supervivencia de los ratones que llevan tumores, indicando que S00109, S01860, S03518, S03405 o S03747 han eliminado o suprimido específicamente las células ARH-77 (mieloma múltiple) en los tumores del xenoinjerto sin que tengan efectos citotóxicos sobre las células u órganos normales del ratón hospedante.

## A. Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF)

15 Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 4, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2) o a S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-9. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

20 Tabla 4. Fenotipo de células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) tratadas con S00109 solo, o en combinación con tratamientos anticancerosos

| Tratamiento de NHDF             | Nada de S109  | 0,0064 $\mu$ M S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109  | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109    |
|---------------------------------|---------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| solo 24h                        |               | →                   | →                  | →                 | ligeramente G2↑  | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑ | Ligeramente muertas |
| Rayos X 10Gy 24 h estim. simul. | G2↑           | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| Rayos X 10Gy pre-irrad.         | G2↑           | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| MTX0,4 24h                      | G1 desafilado | →                   | →                  | →                 | ligeramente G2↑  | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑     |
| MTX 2 24h                       | desafilado    | →                   | →                  | →                 | ligeramente G2↑  | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑     |
| MTX 10 24h                      | G1 desafilado | →                   | →                  | →                 | ligeramente G2↑  | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑ | ligeramente G2↑     |
| solo 3h 24h de cultivo          |               | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | Ligeramente muertas |
| CPT-11 50                       | Retraso en S  | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| 5-FU 20                         | Ligera G2↑    | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| solo 3h 48h de cultivo          |               | →                   | →                  | →                 | →                | G2 ↑ Muerte ↑   | G2 ↑ Muerte ↑   | G2 ↑ Muerte ↑       |
| CDDP 3                          | Ligera G2↑    | →                   | →                  | →                 | G2↑              | G2↑             | G2 ↑ Muerte ↑   | G2 ↑ Muerte ↑       |
| CDDP 10                         | G2↑           | →                   | →                  | →                 | G2↓              | Congelación     | Congelación     | Congelación         |
| ADR 1                           | G2↑           | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| Gemzar 0,016                    | G1 desafilado | →                   | →                  | →                 | →                | Congelación     | Congelación     | G2↑                 |
| Gemzar 0,08                     | G2↓           | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | G2↑                 |

| Tratamiento de NHDF | Nada de S109 | 0,0064 $\mu$ M S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109 |
|---------------------|--------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Gemzar 0,4          | S/G2         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | G2               |
| Gemzar 2            | S/G2↑        | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Gemzar 10           | S/G2↑        | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Gemzar 50           | S/G2↑        | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Taxol 0,0032        | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | →              | M↑              | M↑               |
| Taxol 0,016         | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | →              | M↑              | M↑               |
| Taxol 0,08          | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | →              | M↑              | M↑               |
| Taxol 0,4           | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | Congelación    | Congelación     |                  |
| Taxol 2             | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | Congelación    | Congelación     |                  |
| Taxol 10            | Muertas      | →                   | →                  | →                 | →                | Congelación    | Congelación     |                  |

#### B. Células endoteliales umbilicales humanas normales (HUVEC)

Células normales endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 5, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2) o S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-9. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

Tabla 5. Fenotipo de células normales endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) tratadas con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos

| Tratamiento de HUVEC          | Nada de S109 | 0,0064 $\mu$ M S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109  | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109    |
|-------------------------------|--------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| solo 24h                      |              | →                   | →                  | →                 | Ligeramente G2↑  | Ligeramente G2↑ | Ligeramente G2↑ | Ligeramente muertas |
| Rayos X 10Gy24h estim. simul. | G2↑          | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| Rayos X 10Gy pre irradi.      | G2↑          | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| MTX 0,4 24h                   | S/G2↑        | →                   | →                  | ¿Ciclo?           | ¿Ciclo?          | ¿Ciclo?         | ¿Ciclo?         | Ligeramente muertas |
| MTX 2 24h                     | S/G2↑        | →                   | →                  | →                 | ¿Ciclo?          | ¿Ciclo?         | ¿Ciclo?         | Ligeramente muertas |
| MTX 10 24h                    | S/G2↑        | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| solo 3h 24h de cultivo        |              | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| CPT-11 50                     | Retraso en S | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| 5-FU 20                       | Ligera G2↑   | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| solo 3h 48h de cultivo        |              | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | →                   |
| CDDP 3                        | Ligera G2↑   | →                   | →                  | →                 | →                | G2↑             | G2↑             | G2↑                 |
| CDDP 10                       | G2↑          | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| ADR 1                         | Muerte G2↑   | →                   | →                  | →                 | →                | →               | →               | Muerte              |
| Gemzar 0,016                  | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | ¿Congelación?   | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| Tratamiento de HUVEC          | Nada de S109 | 0,0064 $\mu$ M S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109  | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109    |
| Gemzar 0,08                   | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| Gemzar 0,4                    | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| Gemzar 2                      | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| Gemzar 10                     | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |
| Gemzar 50                     | Muerte       | →                   | →                  | →                 | →                | →               | ¿Congelación?   | ¿Congelación?       |

| Tratamiento de HUVEC | Nada de S109   | 0,0064 $\mu$ M S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109 |
|----------------------|----------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Taxol 0,0032         | Muerte         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Taxol 0,016          | Muerte         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Taxol 0,08           | Muerte         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →                |
| Taxol 0,4            | Muerte         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | ¿Congelación?   | ¿Congelación?    |
| Taxol 2              | Muerte         | →                   | →                  | →                 | →                | →              | ¿Congelación?   | ¿Congelación?    |
| Taxol 10             | Detención en M | →                   | →                  | →                 | →                | →              | ¿Congelación?   | ¿Congelación?    |

### C. Línea celular derivada de cáncer pancreático humano MIA PaCa2

5 Células de la línea celular derivada de cáncer pancreático humano MIA PaCa2 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 6, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2) o S00109 a las concentraciones presentadas en las Columnas 3-7. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

10 Tabla 6. Fenotipo de la línea celular de cáncer pancreático humano (MIA PaCa2) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos

| Tratamiento de MIA PaCa2       | Nada de S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 |
|--------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|
| solo 24h                       | SIN          | SIN                | SIN               | SG2↓             | SG2↓           | SG2↓            |
| Rayos X 2Gy 24h estim. simul.  | SIN          | SIN                | SIN               | SG2↓             | SG2↓           | SG2↓            |
| Rayos X 10Gy 24h estim. simul. | G2↑          | →                  | →                 | →                | G1↑ G2↓        | G1↑ G2↓         |
| Rayos X 2Gy pre irradi.        | G2↑          | →                  | SG2↓              | SG2↓             | SG2↓           | SG2↓            |
| Rayos X 10Gy pre irradi.       | G2↑          | →                  | G1↑               | G1↑ G2↓          | G1↑ G2↓        | G1↑ G2↓         |
| MTX 0,12 24h                   | SG2↓         | →                  | →                 | →                | →              | →               |
| MTX 0,6 24h                    | SG2↓         | →                  | →                 | →                | →              | →               |
| MTX 3 24h                      | SG2↓         | →                  | →                 | →                | →              | →               |
| solo 3h 24h de cultivo         | SIN          | SIN                | SIN               | SIN              | SIN            | SG2↓            |
| CPT-11 50                      | G2↑          | →                  | →                 | →                | →              | G1↑ G2↓         |
| 5-FU 20                        | SG2↓         | →                  | →                 | →                | →              | →               |
| solo 3h 48h de cultivo         | SIN          | SIN                | SIN               | SIN              | SIN            | SIN             |
| CDDP 3                         | Ligera G2↑   | →                  | →                 | →                | →              | →               |
| CDDP 10                        | G2↑          | →                  | →                 | →                | →              | G2↓             |
| ADR 1                          | SG2↑         | →                  | →                 | →                | →              | G2↓ Muerte↑     |
| Gemzar 2                       | SG2↓         | →                  | →                 | →                | →              | SG2↓            |
| Gemzar 10                      | G1↓          | →                  | →                 | →                | →              | SG2↓            |
| Gemzar 50                      | Desafilado   | →                  | Muerte            | →                | →              | SG2↓            |
| Taxol 0.4                      | Muerte       | →                  | →                 | →                | G2↑            | G2↑             |
| Taxol 2                        | Muerte       | →                  | →                 | →                | →              | G2↑             |
| Taxol 10                       | Muerte       | →                  | →                 | G2↑              | G2↑            | G2↑             |

### D. Línea celular derivada de cáncer de colon humano HCT116

15 Células de la línea celular derivada de cáncer de colon humano HCT116 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 7, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2) o S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-8. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

20 Tabla 7. Fenotipo de la línea celular de cáncer de colon humano (HCT116) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos

| Tratamiento de HCT116         | Nada de S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109 |
|-------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| solo 24h                      | SIN          | SIN                | SIN               | S↓               | G2↑            | G2↑ Muerte↑     | ND               |
| Rayos X 2Gy 24h estim. simul. | SIN          | SIN                | SIN               | S↓               | G2↑↑           | G2↑ Muerte↑     |                  |

| Tratamiento de HCT116          | Nada de S109 | 0,032 $\mu$ M S109 | 0,16 $\mu$ M S109 | 0,8 $\mu$ M S109 | 4 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 | 100 $\mu$ M S109 |
|--------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Rayos X 10Gy 24h estim. simul. | G2↑          | →                  | →                 | →                | →              | →               |                  |
| Rayos X 2Gy pre irradi.        | SIN          | SIN                | SIN               | Muerte↑          | G2↑Muerte↑     | G2↑Muerte↑      |                  |
| Rayos X 10Gy pre irradi.       | G2↑          | →                  | →                 | →                | Muerte         | Muerte          |                  |
| MTX 0,12 24h                   | G2↓          | →                  | →                 | →                | →              | →               |                  |
| MTX 0,6 24h                    | G2↓          | →                  | →                 | →                | →              | →               |                  |
| MTX 3 24h                      | G2↓          | →                  | →                 | →                | →              | →               |                  |
| solo 3h 24h de cultivo         | SIN          | SIN                | SIN               | G2↑              | G2↑            | S↓              |                  |
| CPT-11 50                      | G2↑          | →                  | →                 | →                | G1             | G1↑             |                  |
| 5-FU 20                        | SIN          | SIN                | SIN               | SIN              | SIN            | SIN             |                  |
| solo 3h 48h de cultivo         | SIN          | SIN                | SIN               | SIN              | SIN            | SIN             |                  |
| CDDP 3                         | Ligera G2↑   | →                  | →                 | →                | →              | →               |                  |
| CDDP 10                        | G2↑          | →                  | →                 | →                | →              | Muerte          |                  |
| ADR 1                          | G2↑          |                    |                   | Muerte↑          | G2↓Muerte↑     | G2↓Muerte↑      |                  |
| Gemzar 2                       | Muerte G2↓   | →                  | →                 | →                | →              | Muerte          |                  |
| Gemzar 10                      | Muerte G2↓   | →                  | →                 | →                | Muerte         | Muerte          |                  |
| Gemzar 50                      | Muerte G2↓   | →                  | →                 | →                | Muerte         | Muerte          |                  |
| Taxol 0,4                      | Muerte       |                    |                   | Muerte↑          | M↓Muerte↑      | M↓Muerte↑       |                  |
| Taxol 2                        | Muerte       |                    |                   | M↓Muerte↑        | M↓Muerte↑      | M↓Muerte↑       |                  |
| Taxol 10                       | Muerte       |                    |                   |                  | M↓Muerte↑      | M↓Muerte↑       |                  |

## E. Línea celular derivada de mieloma múltiple humano IM9

- 5 Células de la línea celular derivada de mieloma múltiple humano IM9 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 8, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2, tabla 8A) o S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-7 de la tabla 8A y Columnas 2-7 de la tabla 8B. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

- 10 Tabla 8. Fenotipo de la línea celular de mieloma múltiple humano (IM9) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos. tabla 8A. Resultados para nada de S00109, y 0,02 a 0,3125  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de IM9       | Nada de S109 | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | G2↑Muerte    | →                 | →                  | →                  | →                  | →                   |
| 24h                      |              |                   | S/G2↓              | S/G2↓              | S/G2↓              | S/G2↓Muerte↑        |
| Velcade 3                | →            | →                 | →                  | →                  | →                  | G1↑S↓               |
| Velcade 6                | →            | S/G2↓             | S/G2↓              | S/G2↓              | S/G2↓              | S/G2↓               |
| Vincristina 2            | →            | →                 | G1↑                | G1↑S↓              | G1↑S↓              | G1↑S↓               |
| Vincristina 20           | Muerte S↓    | G1↑               | G1↑                | G1↑                | G1↑                | G1↑                 |
| Dexametasona 2           | →            | →                 | →                  | →                  | →                  | S/G2↓Muerte↑        |
| Dexametasona 20          | →            | →                 | →                  | G1↑                | G1↑S↓              | S↓Muerte↑           |
| Dexametasona 200         | →            | →                 | →                  | →                  | G↑S↓               | S↓Muerte↑           |
| Sim24h ADR0,1            | G2↑          |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim24h ADR0,5            | G2↑Muerte    |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim24h Melph 1           | S/G2↑        |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim24h Melph 4           | S/G2↑        |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| 48h                      |              |                   | →                  | →                  | Muerte↑            | Muerte↑             |
| Sim48h ADR0,1            | G2↑Muerte    |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim48h ADR0,5            | G2↑Muerte    |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓            |
| Sim48h Melph 1           | →            |                   | G2↑                | G2↑Muerte↑         | G2↑Muerte↑         | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim48h Melph 4           | G2↑Muerte    |                   | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Adición a 24 h           |              |                   | →                  | →                  | G1↑                | G1↑                 |

| Tratamiento de IM9           | Nada de S109 | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|------------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Pre ADR0,1 Adición 24h       | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,5 Adición 24h       | Muerte       |                   | →                  | G2↓                | G2↓                | →                   |
| Pre Mel 1 Adición 24h        | →            |                   | →                  | G2↑                | G2↑                | G2↑                 |
| Pre Mel 4 Adición 24h        | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | S/G2↓Muerte↑        |
| Pre S109 Adición 24h ADR0, 1 | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre S109 Adición 24h ADR0,5  | Muerte       |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre S109 Adición 24h Mel 1   | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre S109 Adición 24h Mel 4   | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |

Tabla 8B. Resultados para 0,625 a 20  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de IM9      | 0,625 $\mu$ M S109 | 1,25 $\mu$ M S109 | 2,5 $\mu$ M S109 | 5 $\mu$ M S109 | 10 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 |
|-------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Rayos X 10Gy pre irrad. | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| 24h                     | S/G2↓Muerte ↑      | S ↓Muerte↑        | S ↓Muerte↑       | S ↓Muerte↑     | S ↓Muerte↑      | S↓Muerte↑       |
| Velcade 3               | G1↑S↓Muerte ↑      | G1↑S↓Muerte↑      | G1↓S↑Muerte↑     | G1↑S↓Muerte↑   | G1↑S↓Muerte ↑   | G1↑S↓Muerte ↑   |
| Velcade 6               | S↓Muerte↑          | S↓Muerte↑         | S↓Muerte↑        | S↓Muerte↑      | S↓Muerte↑       | S↓Muerte↑       |
| Vincristina 2           | S↓Muerte↑          | S↓Muerte↑         | S↓Muerte↑        | S↓Muerte↑      | S↓Muerte↑       | S↓Muerte↑       |
| Vincristina 20          | Muerte↑            | Muerte↑           | Muerte↑          | Muerte↑        | Muerte↑         | Muerte↑         |
| Dexametasona 2          | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte ↑   | S/G2↓Muerte↑    |
| Dexametasona 20         | S↓Muerte↑          | S↓Muerte↑         | S↓Muerte↑        | S↓Muerte ↑     | S↓Muerte ↑      | S↓Muerte↑       |
| Dexametasona 200        | S↓Muerte↑          | S↓Muerte↑         | S↓Muerte↑        | S↓Muerte↑      | S↓Muerte↑       | S↓Muerte↑       |
| Sim24h ADR0,1           | S/G2 ↓Muerte ↑     | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2 ↓Muerte↑  | S/G2 ↓Muerte ↑  | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim24h ADR0,5           | S/G2 ↓Muerte ↑     | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2 ↓Muerte↑  | S/G2 ↓Muerte ↑  | S/G2 ↓Muerte↑   |
| Sim24h Melph 1          | S/G2 ↓Muerte ↑     | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2 ↓Muerte ↑  | S/G2 ↓Muerte↑   |
| Sim24h Melph 4          | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| 48h                     | Muerte↑            | Muerte↑           | Muerte↑          | Muerte↑        | Muerte↑         | Muerte↑         |
| Sim48h ADR0,1           | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte ↑   | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h ADR0,5           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓          | G1↑S/G2↓         | G1↑S/G2↓       | G1↑S/G2↓        | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h Melph 1          | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte ↑   | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h Melph 4          | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte ↑   | S/G2↓Muerte↑    |
| Adición a 24h           | G1↑                | sin               | sin              | sin            | G1↓G2↑Muerte↑   | G1↓G2↑Muerte↑   |
| Pre ADR0,1 Adición 24h  | →                  | →                 | →                | →              | →               | G2↓             |
| Pre ADR0,5 Adición 24h  | →                  | →                 | →                | Muerte↑        | Muerte↑         | Muerte↑         |
| Pre Mel 1 Adición 24h   | G2↑Muerte↑         | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 4 Adición 24h   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| 24h                     |                    |                   |                  |                |                 |                 |



| Tratamiento de IM9          | 0,625 $\mu$ M S109 | 1,25 $\mu$ M S109 | 2,5 $\mu$ M S109 | 5 $\mu$ M S109 | 10 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Pre S109 Adición 24h ADR0.1 | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre S109 Adición 24h ADR0.5 | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre S109 Adición 24h Mel 1  | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre S109 Adición 24h Mel 4  | →                  | →                 | →                | →              | →               | Muerte          |

## F. Línea celular derivada de mieloma múltiple humano ARH-77

- 5 Células de la línea celular derivada de mieloma múltiple humano ARH-77 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 9, y se expusieron a nada de S00109 (Tabla 9A, Columna 2) o S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-7 de la tabla 9A y 2-7 de la tabla 9B. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

10 Tabla 9. Fenotipo de la línea celular de mieloma múltiple humano (ARH-77) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos. tabla 9A. Resultados para nada de S00109, y 0,02 a 0,3125  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de ARH-77    | Nada de S109 | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | G2↑Muerte    | →                 | →                  | →                  | →                  | →                   |
| 24h                      |              |                   | G1↑G2↓             | G1↑G2↓             | G1↑G2↓             | Muerte↑G2↓          |
| Velcade 3                | →            | →                 | →                  | G1↑G2↓             | G1↑G2↓             | S/G2↓Muerte ↑       |
| Velcade 6                | Muerte       | →                 | →                  | →                  | →                  | Muerte↑G2↓          |
| Vincristina 2            | Muerte       | G1↑               | G1↑                | G1↑                | G1↑                | G1↑                 |
| Vincristina 20           | Muerte M↑    | G1↑               | G1↑                | G1↑                | G1↑                | Muerte↑             |
| Dexametasona 2           | Muerte       | →                 | →                  | →                  | Muerte↑G2 ↓        | Muerte↑G2↓          |
| Dexametasona 20          | Muerte       | →                 | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2 ↓        | Muerte↑G2↓          |
| Dexametasona 200         | Muerte       | →                 | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2 ↓        | Muerte↑G2↓          |
| Sim24h ADR0,1            | G2↑          |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim24h ADR0,5            | G2↑Muerte    |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim24h Melph 1           | S/G2↑        |                   | →                  | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim24h Melph 4           | S/G2↑        |                   | →                  | G1↑S/G2↓           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| 48h                      |              |                   | →                  | →                  | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim48h ADR0,1            | G2↑          |                   | →                  | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim48h ADR0,5            | G2↑Muerte    |                   | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓            |
| Sim48h Melph 1           |              |                   | →                  | →                  | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Sim48h Melph 4           | G2↑Muerte    |                   | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte ↑      | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte ↑       |
| Adición a 24 h           | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,1 Adición 24h   | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,5 Adición 24h   | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | G2↓                | →                   |
| Pre Mel 1 Adición 24h    | →            |                   | →                  | G2↑                | G2↑                | G2↑Muerte↑          |
| Pre Mel 4 Adición 24h    | G2↑Muerte    |                   | G2↓Muerte↑         | →                  | →                  | →                   |
| Adición a 48 h           | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,1 Adición 48h   | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,5 Adición 48h   | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre Mel 1 Adición 48h    | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre Mel 4 Adición 48h    | G2↑Muerte    |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |

Tabla 9B. Resultados para 0,625 a 20  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de ARH-77    | 0,625 $\mu$ M S109 | 1,25 $\mu$ M S109 | 2,5 $\mu$ M S109 | 5 $\mu$ M S109 | 10 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | →                  | →                 | →                | →              | Muerte          | Muerte          |
| 24h                      | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓        | Muerte↑G2↓       | Muerte↑G2↓     | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Velcade 3                | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Velcade 6                | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓        | Muerte↑G2↓       | Muerte↑G2↓     | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Vincristina 2            | G1↑                | G1↑               | G1↑              | G1↑            | G1↑             | G1↑             |
| Vincristina 20           | Muerte↑            | Muerte↑           | Muerte↑          | Muerte↑        | Muerte↑         | Muerte↑         |
| Dexametasona 2           | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓        | Muerte↑G2↓       | Muerte↑G2↓     | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Dexametasona 20          | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓        | Muerte↑G2↓       | Muerte↑G2↓     | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Dexametasona 200         | Muerte↑G2↓         | Muerte↑G2↓        | Muerte↑G2↓       | Muerte↑G2↓     | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Sim24h ADR0,1            | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim24h ADR0,5            | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim24h Melph 1           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim24h Melph 4           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| 48h                      | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h ADR0,1            | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h ADR0,5            | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓          | G1↑S/G2↓         | G1↑S/G2↓       | G1↑S/G2↓        | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h Melph 1           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h Melph 4           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Adición a 24 h           | →                  | →                 | G2↑Muerte↑       | G2↑Muerte↑     | G2↑Muerte↑      | G2↑Muerte↑      |
| Pre ADR0,1 Adición 24h   |                    | G1↓Muerte↑        | →                | →              | →               | →               |
| Pre ADR0,5 Adición 24h   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 1 Adición 24h    | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 4 Adición 24h    | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Adición a 48h            | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre ADR0,1 Adición 48h   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre ADR0,5 Adición 48h   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 1 Adición 48h    | →                  | →                 | →                | →              | Muerte↑         | Muerte↑         |
| Pre Mel 4 Adición 48h    | →                  | →                 | Muerte↑          | →              | →               | →               |

## G. Línea celular derivada de mieloma múltiple humano RPMI-8226

Células de la línea celular derivada de mieloma múltiple humano RPMI-8226 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 10, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2, tabla 10A) o S00109 a las concentraciones presentadas en las Columnas 3-7 de la Columna 10A y Columnas 2-7 de la Columna 10B. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

Tabla 10. Fenotipo de la línea celular de mieloma múltiple humano (RPMI-8226) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos. tabla 10A. Resultados para nada de S00109, y 0,02 a 0,3125  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de RPMI-8226 | Nada de S109 | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | G2↑Muerte    | →                 | →                  | →                  | →                  | →                   |
| 24h                      |              |                   | →                  | G2↓                | G1↑G2↓             | G1↑G2↓              |
| Sim24h ADR0,1            | →            |                   | →                  | →                  | G2↓                | G2↓                 |
| Sim24h Melph 1           | S arrest     |                   | →                  | →                  | →                  | G1↑S/G2↓            |
| Sim24h Melph 4           | S arrest     |                   | →                  | →                  | →                  | G1↑                 |
| 48h                      |              |                   | →                  | G1↑S/G2↓           | MuerteG1↑<br>S/G2↓ | S/G2↓Muerte↑        |
| Velcade 3                | Muerte       | Muerte            | Muerte             | Muerte             | Muerte             | Muerte              |

| Tratamiento de RPMI-8226 | Nada de S109 | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Velcade 6                | Muerte       | Muerte            | Muerte             | Muerte             | Muerte             | Muerte              |
| Vincristina 2            | Muerte       | Muerte            | Muerte             | Muerte             | Muerte             | Muerte              |
| Vincristina 20           | Muerte       | Muerte            | Muerte             | Muerte             | Muerte             | Muerte              |
| Dexametasona 2           |              |                   | Muerte↑            | Muerte↑            | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Dexametasona 20          | S/G2↓Muerte↑ |                   | G1↑                | G1↑                | G1↑                | G1↑                 |
| Dexametasona 200         | Muerte       |                   | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑        |
| Sim48h ADR0,1            | G2↑          |                   | →                  | →                  | →                  | G1↑S/G2↓            |
| Sim48h Melph 1           | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Sim48h Melph 4           | G2↑          |                   | →                  | →                  | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓            |
| Adición a 48 h           |              |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre ADR0,1 Adición 48h   | G2↑          |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre Mel 1 Adición 48h    | →            |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |
| Pre Mel 4 Add 48h        | G2↑          |                   | →                  | →                  | →                  | →                   |

Tabla 10B. Resultados para 0,625 a 20  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de RPMI-8226 | 0,625 $\mu$ M S109 | 1,25 $\mu$ M S109 | 2,5 $\mu$ M S109 | 5 $\mu$ M S109 | 10 $\mu$ M S109 | 20 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| 24h                      | G1↑G2↓             | G1↑G2↓            | G1↑G2↓           | G1↑G2↓         | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Sim24h ADR0,1            | G2↓                | G2↓               | G2↓              | G2↓            | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Sim24h Melph 1           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓          | G1↑S/G2↓         | G1↑S/G2↓       | G1↑S/G2↓        | G1↑S/G2↓        |
| Sim24h Melph 4           | G1↑                | G1↑               | G1↑              | G1↑            | G1↑             | G1↑             |
| 48h                      | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Velcade 3                | Muerte             | Muerte            | Muerte           | Muerte         | Muerte          | Muerte          |
| Velcade 6                | Muerte             | Muerte            | Muerte           | Muerte         | Muerte          | Muerte          |
| Vincristina 2            | Muerte             | Muerte            | Muerte           | Muerte         | Muerte          | Muerte          |
| Vincristina 20           | Muerte             | Muerte            | Muerte           | Muerte         | Muerte          | Muerte          |
| Dexametasona 2           | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Dexametasona 20          | G1↑                | G1↑               | G1↑Muerte↓       | G1↑Muerte↑     | G1↑Muerte↑      | G1↑Muerte↑      |
| Dexametasona 200         | S/G2↓Muerte↑       | S/G2↓Muerte↑      | S/G2↓Muerte↑     | S/G2↓Muerte↑   | S/G2↓Muerte↑    | S/G2↓Muerte↑    |
| Sim48h ADR0,1            | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓          | G1↑S/G2↓         | G1↑S/G2↓       | G1↑S/G2↓        | G1↑S/G2↓        |
| Sim48h Melph 1           | →                  | →                 | Muerte           | Muerte         | Muerte          | Muerte          |
| Sim48h Melph 4           | G1↑S/G2↓           | G1↑S/G2↓          | G1↑S/G2↓         | G1↑S/G2↓       | Muerte↑G2↓      | Muerte↑G2↓      |
| Adición a 48 h           | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre ADR0,1 Adición 48h   | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 1 Adición 48h    | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |
| Pre Mel 4 Adición 48h    | →                  | →                 | →                | →              | →               | →               |

## 5 H. Línea celular derivada de mieloma humano NCI-H929

Células de la línea celular derivada de mieloma humano NCI-H929 se trataron como se describe en la primera celda de cada fila de la tabla 11, y se expusieron a nada de S00109 (Columna 2, tabla 11A) o S00109 a las concentraciones listadas en las Columnas 3-7 de la tabla 11A y Columnas 2-7 de la tabla 11B. El fenotipo predominante para cada combinación de tratamientos se describe en la celda correspondiente.

Tabla 11. Fenotipo de la línea celular de mieloma múltiple humano (NCI-H929) tratada con S00109 solo o en combinación con tratamientos anticancerosos. tabla 11A. Resultados para nada de S00109, y 0,02 a 0,3125  $\mu$ M de S00109

| Tratamiento de NCI-H929  | Nada de S109     | 0,02 $\mu$ M S109 | 0,039 $\mu$ M S109 | 0,078 $\mu$ M S109 | 0,156 $\mu$ M S109 | 0,3125 $\mu$ M S109 |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | Ligera G2↑Muerte | →                 | →                  | →                  | →                  | →                   |

# ES 2 927 954 T3

| Tratamiento de NCI-H929 | Nada de S109 | 0,02 µM S109 | 0,039 µM S109 | 0,078 µM S109 | 0,156 µM S109 | 0,3125 µM S109 |
|-------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 24h                     |              |              | →             | →             | →             | →              |
| Sim24h ADR0,1           | G2↑          |              | →             | →             | G1↑S/G2↓      | G1↑S/G2↓       |
| Sim24h ADR0,5           | SG2↑         |              | →             | →             | →             | →              |
| Sim24h Melph 0,25       | →            |              | →             | →             | →             | →              |
| Sim24h Melph 1          | →            |              | →             | →             | →             | →              |
| Sim24h Melph 4          | SG2↑         |              | →             | G1↑S/G2↓      | G1↑S/G2↓      | G1↑S/G2↓       |
| 48h                     |              |              | →             | →             | Muerte        | Muerte         |
| Sim48h ADR0,1           | G2↑          |              | →             | →             | →             | S/G2↓          |
| Sim48h ADR0,5           | Muerte       |              | →             | →             | →             | →              |
| Sim48h Melph 0,25       | →            |              | →             | →             | →             | Muerte         |
| Sim48h Melph 1          | →            |              | →             | →             | →             | Muerte         |
| Sim48h Melph 4          | G2↑          |              | →             | →             | →             | Muerte         |
| Adición a 48h           |              |              | →             | →             | →             | →              |
| Pre ADR0,1 Adición 48h  | Muerte G2↑   |              | →             | →             | →             | S/G2↓Muerte ↑  |
| Pre ADR0,5 Adición 48h  | Muerte       |              | →             | →             | →             | →              |
| Pre Me10,25 Adición 48h | →            |              | →             | →             | →             | →              |
| Pre Mel 1 Adición 48h   | →            |              | →             | →             | →             | →              |
| Pre Mel 4 Adición 48h   | SG2↑         |              | →             | →             | →             | →              |

Tabla 11B. Resultados para 0,625 a 20 µM de S00109

| Tratamiento de NCI-H929  | 0,625 µM S109 | 1,25 µM S109 | 2,5 µM S109 | 5 µM S109   | 10 µM S109  | 20 µM S109 |
|--------------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Rayos X 10Gy pre irradi. | Muerte↑G2↓    | Muerte↑G2 ↓  | Muerte↑G2 ↓ | Muerte↑G2 ↓ | Muerte↑G2 ↓ | Muerte↑G2↓ |
| 24h                      | →             | →            | →           | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Sim24h ADR0,1            | G1↑S/G2↓      | G1↑S/G2↓     | G1↑S/G2↓    | G1↑S/G2↓    | G1↑S/G2↓    | G1↑S/G2↓   |
| Sim24h ADR0,5            | →             | →            | →           | →           | →           | →          |
| Sim24h Melph 0,25        | →             | →            | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Sim24h Melph 1           | →             | →            | →           | →           | Muerte      | Muerte     |
| Sim24h Melph 4           | G1↑S/G2↓      | G1↑S/G2↓     | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| 48h                      | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Sim48h ADR0,1            | S/G2↓         | Muerte↑G2 ↓  | Muerte↑G2↓  | Muerte↑G2 ↓ | Muerte↑G2 ↓ | Muerte↑G2↓ |
| Sim48h ADR0,5            | →             | →            | →           | →           | →           | →          |
| Sim48h Melph 0,25        | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Sim48h Melph 1           | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Sim48h Melph 4           | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Adición a 48h            | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Pre ADR0,1 Adición 48h   | →             | →            | →           | →           | →           | →          |
| Pre ADR0,5 Adición 48h   | →             | →            | →           | →           | →           | Muerte     |
| Pre Me10,25 Adición 48h  | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Pre Mel 1 Adición 48h    | Muerte        | Muerte       | Muerte      | Muerte      | Muerte      | Muerte     |
| Pre Mel 4 Adición 48h    | →             | →            | →           | →           | Muerte      | Muerte     |

**Ejemplo 8: Síntesis de compuestos representativos**

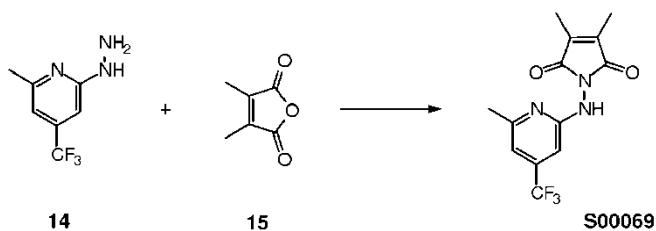
Debe apreciarse que los siguientes ejemplos sirven como ilustraciones, y todos los compuestos de esta invención podrían sintetizarse usando métodos similares a los descritos en estos ejemplos.

Procedimiento general para la síntesis de 2-piridilhidrazinas sustituidas



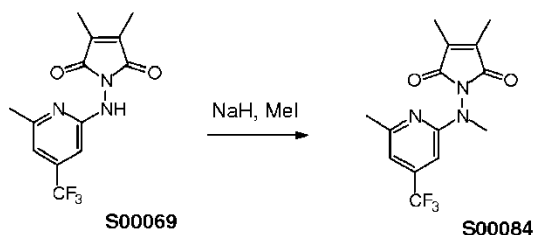
El procedimiento general para la síntesis de 2-piridilhidrazinas sustituidas se representa en la presente memoria en la síntesis de 4-(trifluorometil)-6-metil-2-piridilhidrazina (14). Un equivalente de 2-cloro-4-(trifluorometil)-6-metilpiridina (13) y 1,5 equivalentes de hidrato de hidrazina se mezclaron en etanol. La disolución se volvió amarilla tras agitarla durante varios minutos. La mezcla de reacción se puso a reflujo hasta que el análisis mediante TLC mostró que no quedaba material de partida. El disolvente se eliminó entonces a vacío, y la suspensión resultante se extrajo con éter tres veces. La disolución etérea resultante se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó para producir el producto bruto, que se recrystalizó después en etanol para proporcionar el compuesto 14.

Síntesis de S00069 (solo para referencia)



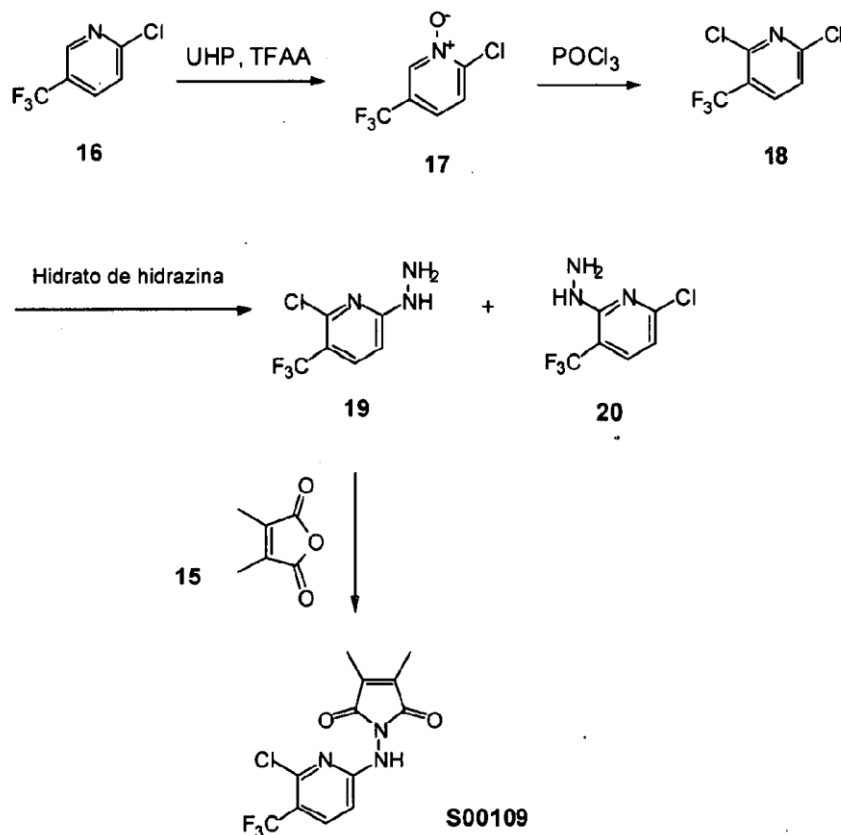
El anhídrido 15 (1 eq.) se añadió a una disolución de la hidrazina 14 (1,0 mmol) en cloroformo y se agitó a reflujo durante 4 h. Se determinó que la reacción estaba terminada mediante TLC (éter de petróleo:acetato de etilo = 3:1). El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (éter de petróleo:acetato de etilo = 2:1) para proporcionar el producto.

Síntesis de S00084 (solo para referencia)



A una disolución de S00069 (35 mg, 0,117 mmoles) en THF (6 ml) a 0°C se le añadió NaH (60% en aceite mineral, 8 mg, 0,12 mmoles). La mezcla se agitó durante 30 min., y después se añadió MeI (20 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, y después se vertió en el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado. Éste se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . La capa orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El disolvente se eliminó, y el residuo se purificó mediante TLC preparativa (éter de petróleo/éter dietílico 5:1) para producir S00084 (3 mg).

## Síntesis de S00109



## 5 Etapa 1: Síntesis de N-óxido de 2-cloro-5-trifluorometil-piridina (17):

Se disolvió 2-cloro-5-trifluorometil-piridina (16, 10 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml), y se añadió UHP (compuesto de adición de urea-peróxido de hidrógeno, 21 mmoles). La mezcla se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ , y después se añadió lentamente anhídrido trifluoroacético (20 mmoles) a la mezcla de reacción. Se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó hasta que se juzgó que la reacción se había terminado mediante TLC. La reacción se paralizó con  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  acuoso, se agitó durante 4 h, se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado, y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La cromatografía en columna produjo 1,8 g de compuesto 17 como un aceite.

## 15 Etapa 2: Síntesis de 2,6-dicloro-5-trifluorometil-piridina (18):

Se disolvió N-óxido de 2-cloro-5-trifluorometil-piridina (17, 4 mmoles) en  $\text{POCl}_3$  recientemente destilado (4,5 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta  $80^\circ\text{C}$  durante 17 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió hielo, y la mezcla se dejó reposar durante 4 h. La mezcla se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) y  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado. La cromatografía en columna produjo el compuesto 18 como un aceite amarillo (rendimiento: 50%).

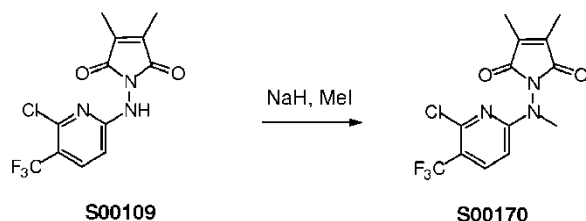
## Etapa 3: Síntesis de 6-cloro-5-trifluorometil-2-piridilhidrazina (19):

A la disolución de 2,6-dicloro-5-trifluorometil-piridina (18, 2 g, 9,26 mmoles) en etanol (30 ml) se le añadió hidrato de hidrazina (2,9 g, 46 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, después se concentró para eliminar el disolvente, y se añadió acetato de etilo, se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/acetato de etilo = 4/1~3/1) produjo el compuesto 19 como un sólido blanco (rendimiento: 56%) y otro isómero 20 (rendimiento: 18%).

## 30 Etapa 4: Síntesis de S00109:

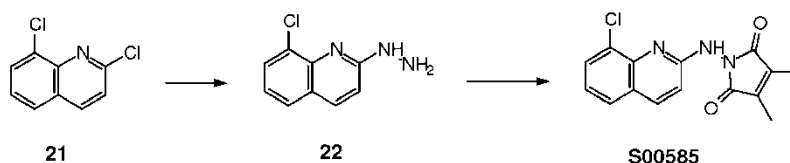
Se añadió anhídrido 2,3-dimetilmaleico (15, 0,126 g, 1,0 mmol) a una disolución de 6-cloro-5-trifluorometil-2-piridilhidrazina (19, 0,211 g, 1,0 mmol) en 5 ml de cloroformo, y la mezcla se puso a reflujo durante 4 horas. El disolvente se eliminó, y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (éter de petróleo/acetato de etilo 5:1 hasta 2:1) para proporcionar S00109 (0,21 g).

## Síntesis de S00170



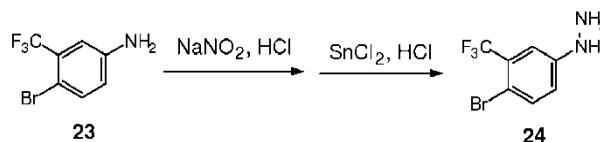
- 5 Se suspendieron Compuesto S00109 (40 mg, 0,125 mmoles) y NaH (60% en aceite mineral, 7 mg, 0,188 mmoles) en 2 ml de THF anhidro, y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 min. Se añadió lentamente yoduro de metilo (21 mg, 0,150 mmoles) a la disolución a la misma temperatura, y después la mezcla se calentó hasta 25-30°C y se agitó durante toda la noche. El disolvente se evaporó, y se añadió ácido acético para llevar la disolución a pH = 4. Ésta se extrajo con cloroformo tres veces, y la fase orgánica combinada se lavó con HCl 1N, y después con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado.
- 10 Después se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó, y el residuo se purificó mediante TLC preparativa (éter de petróleo/éter dietílico 4:1) para proporcionar el compuesto S00170 (4,2 mg).

## Síntesis de S00585 (solo para referencia)



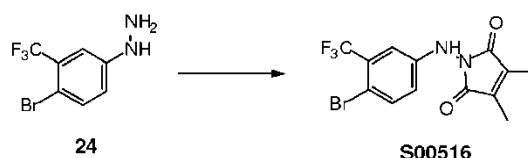
El Compuesto 21 se convirtió en el Compuesto 22 usando un procedimiento similar al que se describió en el ejemplo 1. El Compuesto 22 se convirtió en el Compuesto S00585 usando un procedimiento similar al que se describió en el ejemplo 2.

## Procedimiento general para la síntesis de fenilhidrazinas sustituidas



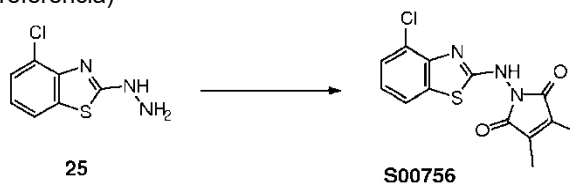
- 25 El procedimiento general para la síntesis de fenilhidrazinas sustituidas se representa en la presente memoria en la síntesis de 3-(trifluorometil)-4-bromofenilhidrazina (24). Se añadió la bencilamina 23 correspondiente (0,08 moles) a HCl conc. (40 ml). La mezcla se enfrió hasta -5°C mediante hielo y sal con agitación. Después se añadió nitrito de sodio (5,52 g, 0,08 moles) disuelto en agua (20 ml). La agitación se continuó durante 1 h, y se añadió lentamente durante un período de dos horas cloruro estañoso (30g) en HCl conc. (30 ml), mientras se mantiene la temperatura por debajo de 0°C. La mezcla se agitó durante otra hora tras la adición y se filtró. El sólido filtrado se trató con hidróxido de sodio acuoso diluido y después se extrajo con éter. La capa etérea se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó, y el residuo se cristalizó en hexano para proporcionar el Compuesto 24.

## Síntesis de S00516



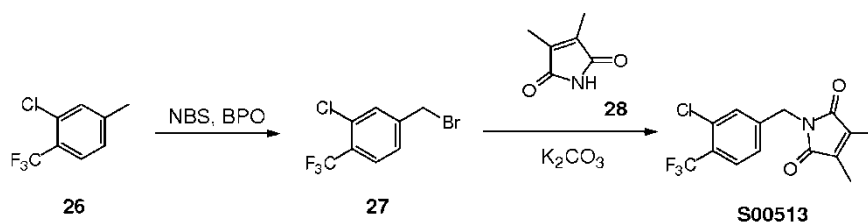
El Compuesto S00516 se sintetizó a partir de la hidrazina 24 correspondiente usando un procedimiento similar al que se describió en el ejemplo 2.

Síntesis de S00756 (solo para referencia)



El Compuesto 25 se sintetizó según un procedimiento bibliográfico (Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 1997, 32(5), 397-408). Se convirtió en el Compuesto S00756 usando un método similar al que se describió en el ejemplo 2.

Síntesis de S00513



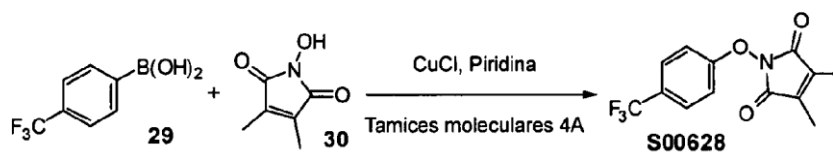
Etapas: bromuro de 3-cloro-4-trifluorometilbencilo 27:

Una mezcla de 2-chloro-4-metil-1-trifluorometilbenceno 26 (0,20 g, 1 mmol), N-bromosuccinimida (0,17 g, 1 mmol) y peróxido de benzoilo (7,4 mg, 0,03 mmoles) en tetracloruro de carbono (2 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas. Se añadió otra porción de peróxido de benzoilo (20 mg, 0,08 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante otras 0,5 horas. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 16 horas. El sólido se eliminó mediante filtración. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice, usando éter de petróleo como eluyente, para proporcionar 0,22 g (80%) de Compuesto 27.

Etapas: Compuesto S00513

A una disolución de 3,4-dimetilmaleimida 28 (43 mg, 0,34 mmoles) en 1,3 ml de acetona se le añadió carbonato de potasio anhidro (50 mg, 0,37 mmoles) y Compuesto 27 (100 mg, 0,37 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó con salmuera, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía sobre sílice, usando éter de petróleo/acetato de etilo (10:1) como eluyente, para proporcionar 70 mg (60%) de Compuesto S00513.

Síntesis de S00628 (solo para referencia)



En una disolución de 1-hidroxi-3,4-dimetilazolin-2,5-diona 30 (56 mg, 0,39 mmoles, 1 equiv.) en 1,2-dicloroetano (2,5 ml), se añadieron CuCl (39 mg, 0,39 mmoles, 1 equiv.), tamices moleculares 4 Å recientemente activados (-100 mg), y ácido 4-trifluorometilfenilborónico 29 (150 mg, 0,78 mmoles, 2 equiv.), seguido de piridina (34 mg, 0,43 mmoles, 1,1 equiv.). La suspensión marrón clara resultante se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró. La cromatografía del filtrado (éter de petróleo/acetato de etilo = 7: 1) produjo el compuesto S00628 como un sólido blanco (65 mg, 59%).

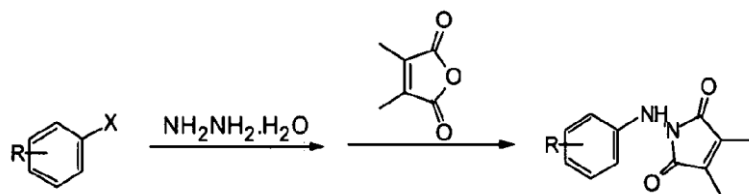
### Ejemplo 9: Procedimientos sintéticos

Todos los compuestos enumerados en las tablas 1, 2, y 3 se sintetizaron usando métodos idénticos a o similares a los descritos en los ejemplos más abajo.

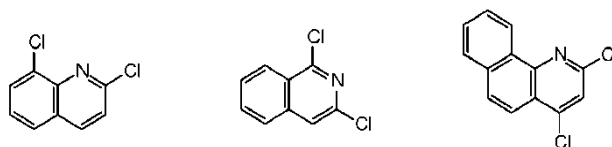
Procedimiento general para la síntesis de análogos de piridina sustituidos con haluro hasta compuestos diana



Esquema 1



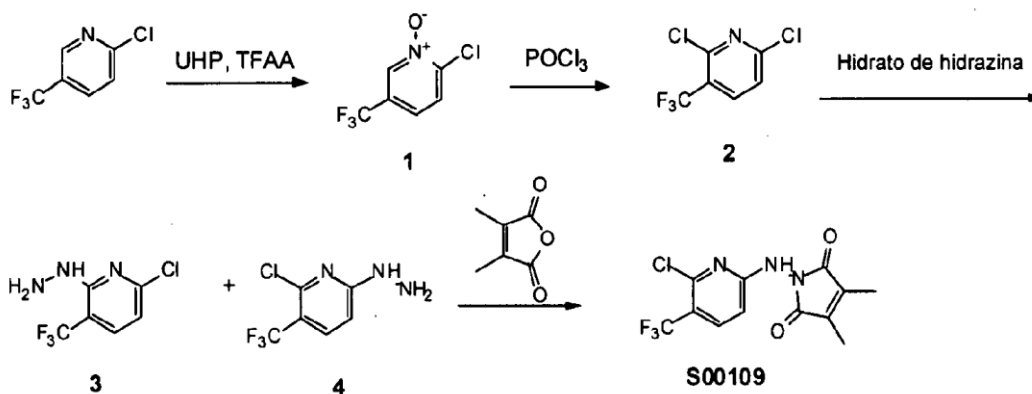
Se añadió material de partida disuelto en etanol e hidrato de hidrazina (10,0 eq.) para formar una mezcla, la mezcla se agitó a 50-60°C (temperatura del aceite) durante varias horas (la terminación se comprobó mediante TLC), el disolvente se evaporó, se añadió agua, y la mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo, se secó y se concentró para formar una preparación bruta que se usó sin purificación adicional para la siguiente etapa. La preparación bruta se disolvió en cloroformo (o tolueno, ácido acético, u otro disolvente adecuado), se añadió anhídrido (1,0 eq.), la mezcla se calentó a 50-60°C (temperatura del aceite) durante varias horas (la terminación se comprobó mediante TLC), el disolvente se evaporó, y la preparación se purificó mediante TLC prep. para proporcionar el compuesto deseado.



Los materiales de partida estaban comercialmente disponibles, de manera que la ruta sintética de los compuestos S00585, S01098, S01207 fue similar al procedimiento general.

Compuesto S00109

Esquema 2



Producto intermedio 1

Se disolvió 2-cloro-5-trifluorometil-piridina (10 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml), y se añadió UHP (compuesto de adición de urea-peróxido de hidrógeno, 21 mmoles). La mezcla se enfrió hasta 0°C, después se añadió lentamente anhídrido trifluoroacético (20 mmoles) a la mezcla de reacción. Se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó hasta que la reacción se terminó mediante monitorización mediante TLC. La reacción se paralizó con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  acuoso, se agitó durante 4 h, se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado, y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La cromatografía en columna produjo 1,8 g de compuesto 1 como un aceite.

Producto intermedio 2

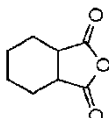
Se disolvió 1 (4 mmoles) en  $\text{POCl}_3$  recientemente destilado (4,5 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C durante 17 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió hielo, y la mezcla se dejó reposar durante 4 h. La mezcla se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) y  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado. La cromatografía en columna produjo el compuesto 2 como un aceite amarillo (rendimiento: 50%).

## Producto intermedio 4

A la disolución de 2 (2 g, 9,26 mmoles) en etanol (30 ml) se le añadió hidrato de hidrazina (2,9 g, 46 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, después se concentró para eliminar el disolvente, y se añadió acetato de etilo, se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/acetato de etilo = 4/1~3/1) produjo el compuesto 4 como un sólido blanco (rendimiento: 56%) y otro isómero 3 (rendimiento: 18%).

## Compuesto S00109

El procedimiento sintético fue similar al procedimiento general.

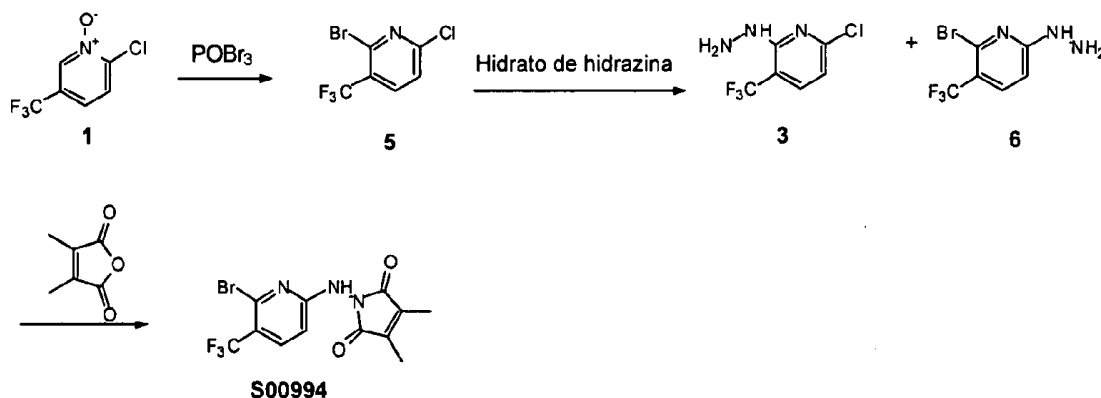


## Compuesto S00186 (solo para referencia)

El material de partida (anhídrido) estaba comercialmente disponible, de manera que la ruta sintética del compuesto S00186 fue similar al procedimiento general (el anhídrido reacciona con el producto intermedio 4).

## Compuesto S00994

## Esquema 3



## Producto intermedio 5

1 (4 mmoles) se disolvió en POBr<sub>3</sub> recientemente destilado (4,5 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C durante 17 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió hielo, y la mezcla se dejó reposar durante 4 h. La mezcla se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La cromatografía en columna produjo el compuesto 5 como un aceite amarillo (rendimiento: 50%).

## Producto intermedio 6

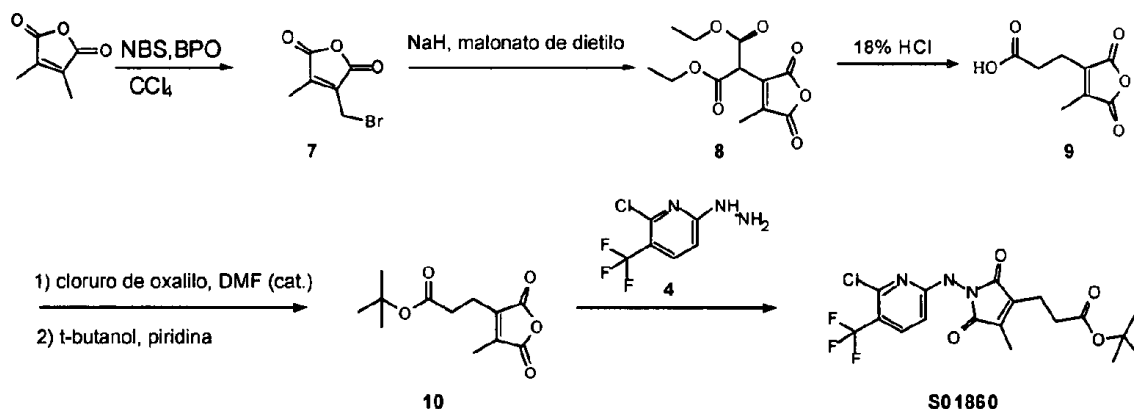
Se añadió hidrato de hidrazina a la disolución de 5 en etanol. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente, después se concentró para eliminar el disolvente, se añadió acetato de etilo, y la mezcla se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/acetato de etilo = 4/1~3/1) produjo el compuesto 6 como un sólido blanco.

## Compuesto S00994

El procedimiento sintético fue similar al procedimiento general.

## Compuesto S01860

## Esquema 4



## 5 Producto intermedio 7

Una disolución de material de partida (5,0 g, 0,040 moles), NBS (10,6 g, 0,059 moles), BPO (296 mg) en 300 ml de  $\text{CCl}_4$  se agitó a reflujo durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió después hasta la temperatura ambiente, y se añadió otra porción de BPO (296 mg), y la reacción se agitó a reflujo durante otras 5 h. Después la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche. Después se filtró, y el residuo se lavó mediante  $\text{CCl}_4$  durante tres (3) veces, y la capa orgánica combinada se lavó con agua y con salmuera, después se secó y se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna (PE:EA = 4:1) para proporcionar producto bruto que después se purificó mediante destilación. La segunda fracción obtenida a  $128^\circ\text{C}\sim 135^\circ\text{C}$  (3 mmHg) fue el producto intermedio 7.

## 15 Producto intermedio 8

A la suspensión de hidruro de sodio (60 mg, 1,5 mmoles) en benceno (5 ml), se le añadió gota a gota a temperatura ambiente malonato de dietilo (320 mg, 2,0 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 5 min., después se añadió una disolución de 7 (210 mg, 1,0 mmol) en benceno (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otras 8 h. Después la mezcla se acidificó con HCl diluido y se extrajo con EtOAc ( $2\times 15$  ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, con salmuera y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La concentración de las capas orgánicas a vacío seguido de la purificación cromatográfica en columna en gel de sílice del residuo (éter de petróleo:EtOAc = 4:1) proporcionó el producto como un aceite espeso. El rendimiento fue 200 mg, (74,0%).

## 25 Producto intermedio 9

Una disolución de 8 (80 mg, 0,3 mmoles) en hidroccloruro diluido (2 ml, 18%) se puso a reflujo con agitación durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se saturó añadiendo cloruro de sodio sólido. La capa acuosa filtrada se extrajo con EtOAc, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró para proporcionar ácido puro. El rendimiento fue 50 mg (90,6%).

## Producto intermedio 10

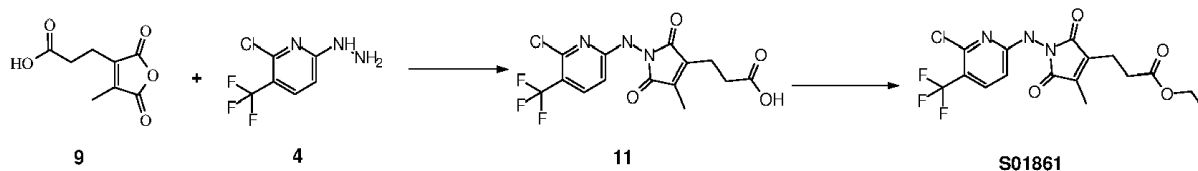
A una disolución agitada de 9 (0,46 g, 2,5 mmoles) y dos gotas de DMF en DCM (10 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (0,48 g, 3,75 mmoles) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente (temperatura del aceite  $20\text{--}30^\circ\text{C}$ ) durante dos horas, después el disolvente se evaporó. Se disolvieron el residuo y *tert*-butanol (0,22 g, 3 mmoles) en 10 ml de DCM, se añadió piridina gota a gota a temperatura ambiente (0,3 g, 3,75 mmoles) a esta disolución. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat. para detener la reacción, el pH se ajustó a 2 con HCl 1N y se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 10 como un sólido blanco (0,42 g, 70%).

## Compuesto S01860

Los Intermedios 10 (119 mg, 0,45 mmoles) y 4 (95 mg, 0,49 mmoles) se añadieron a 5 ml de DCM y se pusieron a reflujo toda la noche, después el disolvente se evaporó, y el residuo se purificó mediante TLC prep. para proporcionar el producto (Rendimiento = 150 mg, 77%).

## Compuesto S01861

## Esquema 5



## Producto intermedio 11

Se disolvieron 9 (1,0 g, 5,43 mmoles) y 4 (1,15 g, 5,43 mmoles) en 20 ml de cloroformo y se pusieron a reflujo durante 48 h, después se evaporó el disolvente, y el residuo se recrystalizó para proporcionar 11 (1,4 g, 68,2%).

## Compuesto S01861

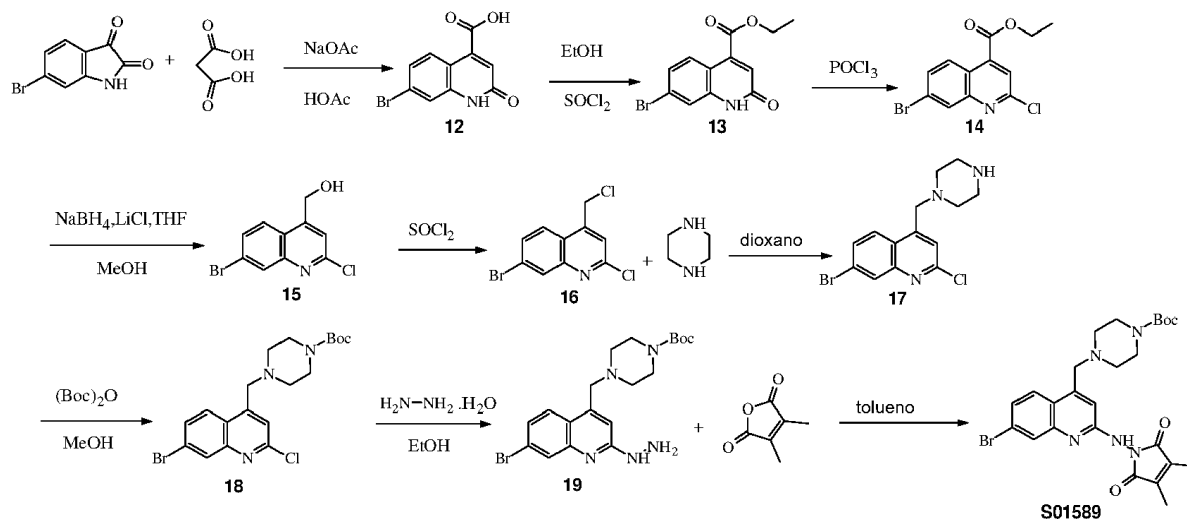
El producto intermedio 11 (15 mg, 0,04 mmoles), EDCI (45 mg, 0,24 mmoles), Et<sub>3</sub>N (1 gota) y etanol (1 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante alrededor de 3 h. Después el disolvente se eliminó a vacío. El producto se separó mediante TLC prep. El rendimiento fue 12 mg (76,7%).

## Compuestos S01648, S01796, S01711, S01758, S01883, y S01759

La ruta sintética de los compuestos S01648, S01796, S01711, S01758, S01883, y S01759 fue similar a S01861, es decir, el producto intermedio 11 se acopló a diferentes sustancias químicas).

## Compuesto S01589 (solo para referencia)

## Esquema 6



## Producto intermedio 12

La mezcla de material de partida (6,5 g, 28,7 mmoles), ácido malónico (3,3 g, 31,7 mmoles), HOAc (60 ml), NaOAc (2,95 g, 36 mmoles) se agitaron a RT. Tras 6-7 h, se añadió más NaOAc (2,95 g, 36 mmoles), después se puso a reflujo toda la noche. Tras enfriar, la mezcla se filtró, y el filtrado se lavó con agua y con acetato de etilo, después se secó a presión reducida. Se recogieron 5 g de un sólido marrón poco consistente (rendimiento = 65,4%).

## Producto intermedio 13

Se añadieron gota a gota cuatro (4) ml de SOCl<sub>2</sub> a una suspensión de compuesto 12 y EtOH, en un baño de hielo, y la mezcla se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente, después se puso a reflujo durante 6 h. Tras enfriar, la mezcla se filtró y se lavó con EtOH enfriado, y se secó a vacío para obtener 5,25 g un polvo gris pálido (rendimiento = 95%)

## Producto intermedio 14

Una mezcla de compuesto 13 y  $\text{POCl}_3$  (15 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 min., después se puso a reflujo durante 2 h. La mezcla se concentró a vacío. El residuo se paralizó con agua fría y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado y con salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se concentró y se recogieron 4,68 g un sólido marrón poco consistente.

## Producto intermedio 15

A una disolución de THF y MeOH, se le añadieron compuesto 14 (4,68 g, 14,9 mmoles) y LiCl con un baño de hielo-sal, se le añadió  $\text{NaBH}_4$  en porciones. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, se comprobó mediante TLC, se concentró a vacío, y se añadió lentamente HCl diluido al residuo sobre un baño de hielo hasta que la mezcla alcanzó pH 7. Después la mezcla se extrajo con acetato de etilo y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , disoluciones de NaCl (en secuencia), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se concentró, y se recogieron 4,15 g de un sólido marrón poco consistente.

## Producto intermedio 16

El compuesto 15 (4,15 g) se disolvió en  $\text{SOCl}_2$  y se puso a reflujo toda la noche. El disolvente se evaporó, se añadió agua al residuo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, el disolvente se evaporó, y se recogieron 4,0 g de compuesto 16.

## Producto intermedio 17

El compuesto 16 (200 mg, 0,69 mmoles) se disolvió en dioxano, y se añadió piperazina anhidra (177 mg, 2,05 mmoles), y la mezcla se agitó toda la noche. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró a vacío, y se recogieron 250 mg de producto bruto.

## Producto intermedio 18

Una disolución de dicarbonato de di-*tert*-butilo (0,246 g, 1,13 mmoles) en MeOH se añadió gota a gota al compuesto 17 (0,35 g, 1,03 mmoles) en MeOH a temperatura ambiente.

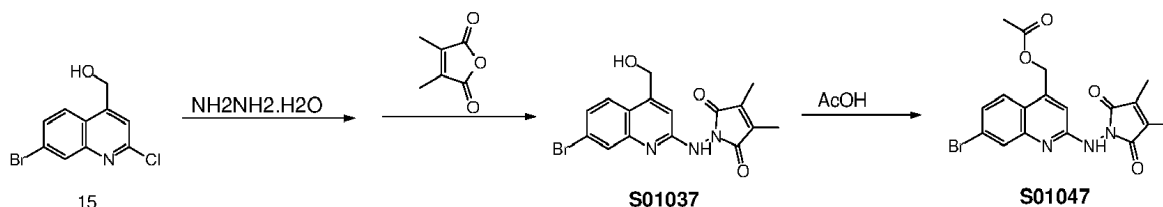
La mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó, el residuo se extrajo de la manera habitual como se describió anteriormente, y el extracto se purificó mediante cromatografía en columna (EA:PE=1:10). El producto se obtuvo como un sólido blanco.

## Compuesto S01589 (solo para referencia)

El procedimiento sintético del producto intermedio 18 al compuesto S01589 fue similar al procedimiento general descrito en la presente memoria.

## Compuestos S01037 y S01047 (solo para referencia)

## Esquema 7



## Compuesto S01037 (solo para referencia)

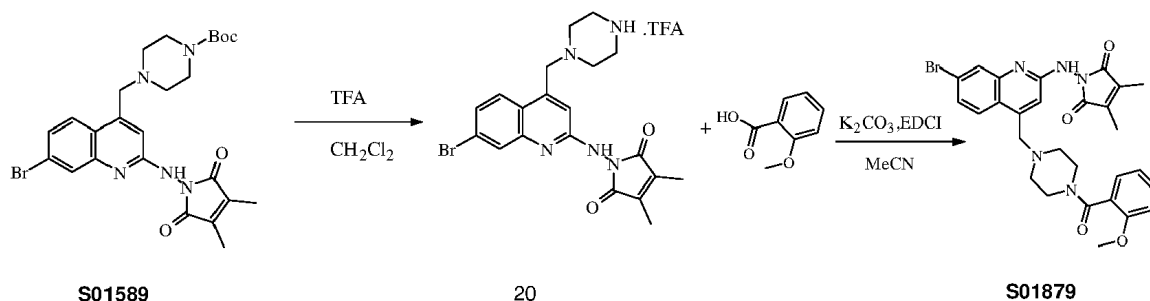
El procedimiento sintético del producto intermedio 15 al compuesto S01037 es similar al procedimiento general.

## Compuesto S01047 (solo para referencia)

El material de partida (0,145 g, 0,54 mmoles) se disolvió en 5 ml de ácido acético, y la mezcla se calentó con reflujo durante 1 h, después se evaporó y se purificó mediante TLC prep. (éter de petróleo: acetato de etilo = 1:1) para proporcionar el producto.

Compuesto S01879 (solo para referencia)

Esquema 8



El material de partida (50 mg, 0,09 mmoles) se disolvió en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se añadió TFA (5 ml) gota a gota a la mezcla agitada sobre un baño de hielo. La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se comprobó mediante TLC. El disolvente se evaporó para proporcionar el producto como un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional (40 mg).

Compuesto S01879

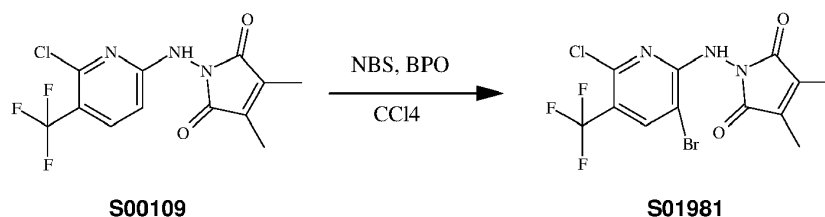
El compuesto 20 se disolvió en MeCN, y se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), después de lo cual, la mezcla se agitó durante alrededor de 30 min., y se añadió ácido benzoico (1 eq.) y EDCI (2 eq.), y la mezcla se agitó toda la noche, después se concentró y se trató de la manera habitual descrita anteriormente. La preparación final se purificó mediante TLC de placa prep., y el producto se obtuvo como un sólido amarillo poco consistente.

Compuestos S01925, S01878, S01877, S01699, S01800, S01801, S01822, S01880, S01683, S01928, S01929 (solo para referencia)

La ruta sintética de los compuestos S01925, S01878, S01877, S01699, S01800, S01801, S01822, S01880, S01683, S01928, S01929 fue similar a la de S01879 (el producto intermedio 20 se acopló con químicas diferentes).

Compuesto S01981

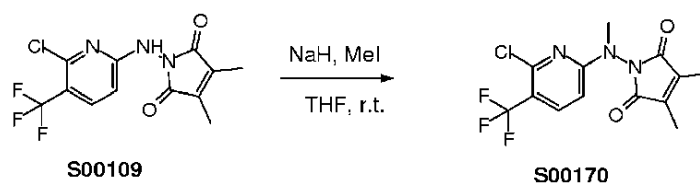
Esquema 9



El material de partida (100 mg, 0,314 mmoles) se disolvió en CCl<sub>4</sub>, se añadieron NBS (112 mg, 0,629 mmoles) y BPO (1,5 mg, 0,0062 mmoles), y la mezcla se puso a reflujo durante alrededor de 4 h. La mezcla de reacción se paralizó con agua, se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró *a vacío*, después se purificó mediante placa prep. para obtener el producto.

Compuesto S00170

Esquema 10



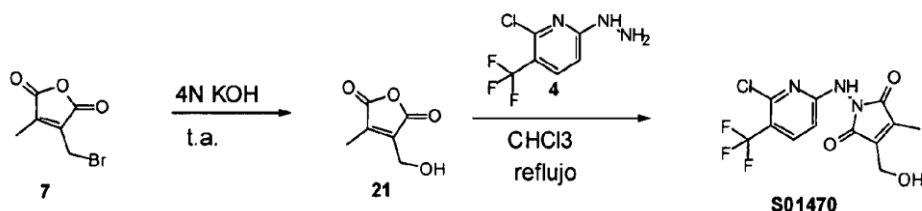
Se añadió NaH (8 mg, 0,12 mmoles) gota a gota a una disolución de hidrazina (35 mg, 0,117 mmoles) en THF (6 ml), a 0°C. La mezcla se agitó durante 30 min., después se añadió MeI (20 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, después se vertió en el NH<sub>4</sub>Cl ac. sat.; se extrajo con CHCl<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, después se cromatógrafió (PE/AE, 5/1) para obtener el producto (3 mg).

Compuestos S01007, S01473

La ruta sintética de los compuestos S01007, S01473 fue similar a la de S00170.

Compuesto S01470

Esquema 11



Producto Intermedio 21

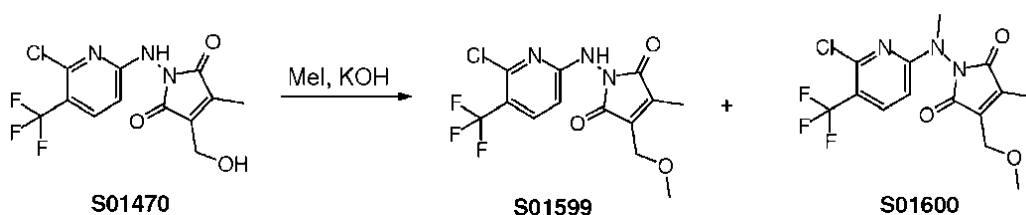
El compuesto 2 (1 g, 4,9 mmoles) se añadió a una disolución enfriada con hielo de KOH ac. 4N (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se acidificó lentamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N (5 ml), después se saturó con NaCl sólido y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica se lavó con salmuera y se secó. La capa orgánica se concentró a vacío, y el concentrado se aplicó a de gel sílice (PE:EA=1:1) para proporcionar 355 mg de producto.

Compuesto S01470

El procedimiento sintético fue similar al procedimiento general.

Compuestos S01599 y S01600

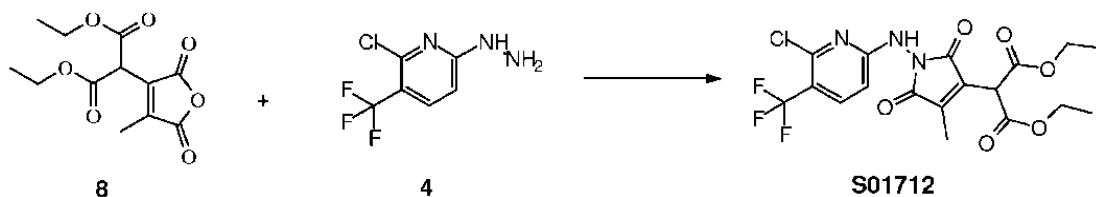
Esquema 12



El material de partida (80 mg, 0,24 mmoles), MeI (40 µl, 0,64 mmoles), y KOH (30 mg, 0,54 mmoles) en DMSO (5 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h, después se diluyeron con EtOAc, se lavaron con agua, con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se purificó mediante TLC prep. para obtener los dos compuestos diana.

Compuesto S01712

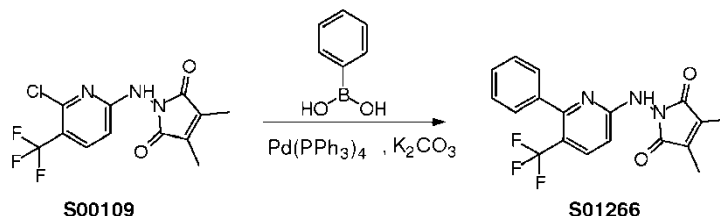
Esquema 13



El procedimiento sintético fue similar al procedimiento general.

Compuesto S01266

5 Esquema 14



10 Se añadió  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  (16 mg) a una mezcla de material de partida (50 mg, 0,14 mmoles), ácido bencenoborónico (19 mg, 0,15 mmoles), carbonato de potasio (59 mg, 0,43 mmoles) en 10 ml de tolueno en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se puso a refluxo durante 16 h, después de lo cual el disolvente se evaporó, y el residuo se purificó mediante TLC preparativa para proporcionar 4 mg de producto.

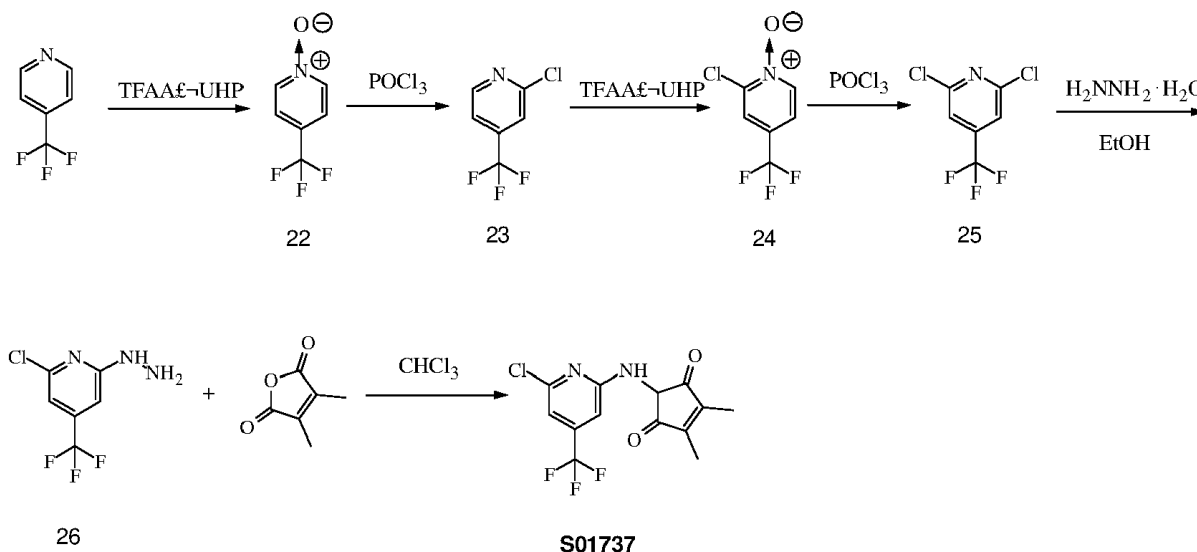
Compuestos S01313, S01457, S01691, S01371, S01393, S01474

15 La ruta sintética de los compuestos S01313, S01457, S01691, S01371, S01393, S01474 fue similar a la de S01266.

Compuesto S01737 (solo para referencia)

Esquema 15

20



Producto intermedio 22

25 La piridina (500 mg, 3,4 mmoles) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y se añadió UHP (700 mg, 7,4 mmoles), que se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ , después se añadió lentamente TFAA (1,43g, 6,8 mmoles) a la mezcla de reacción. Después de que la TLC indicó que el material de partida se había consumido, se trató de la manera habitual para producir 420 mg de compuesto diana.

30 Producto intermedio 23

35 El compuesto 22 (420 mg, 2,57 mmoles) se disolvió en  $\text{POCl}_3$  (3 ml), después se calentó a  $90^\circ\text{C}$  toda la noche. La mezcla de reacción se paralizó con agua cuidadosamente, se extrajo mediante  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se concentró a vacío. Se purificó mediante cromatografía en columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :PE=1:3), después se obtuvieron 300 mg de compuesto diana.



## Producto intermedio 24

La reacción y el procedimiento de tratamiento fueron los mismos que para el producto intermedio 22, y se obtuvieron 170 mg de compuesto diana.

## Producto intermedio 25

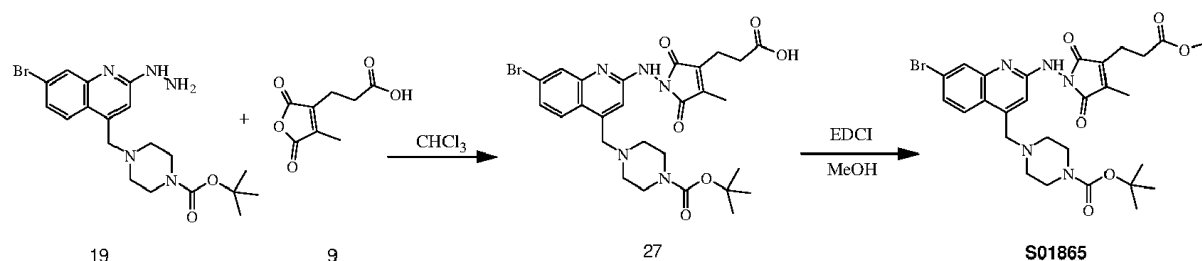
La reacción y el procedimiento de tratamiento fueron los mismos que para el producto intermedio 23, y se obtuvieron 120 mg de compuesto diana.

## Compuesto S01737 (solo para referencia)

El procedimiento sintético del producto intermedio 25 al compuesto diana fue similar al del procedimiento general.

## Compuesto S01865 (solo para referencia)

## Esquema 16



## Producto intermedio 27

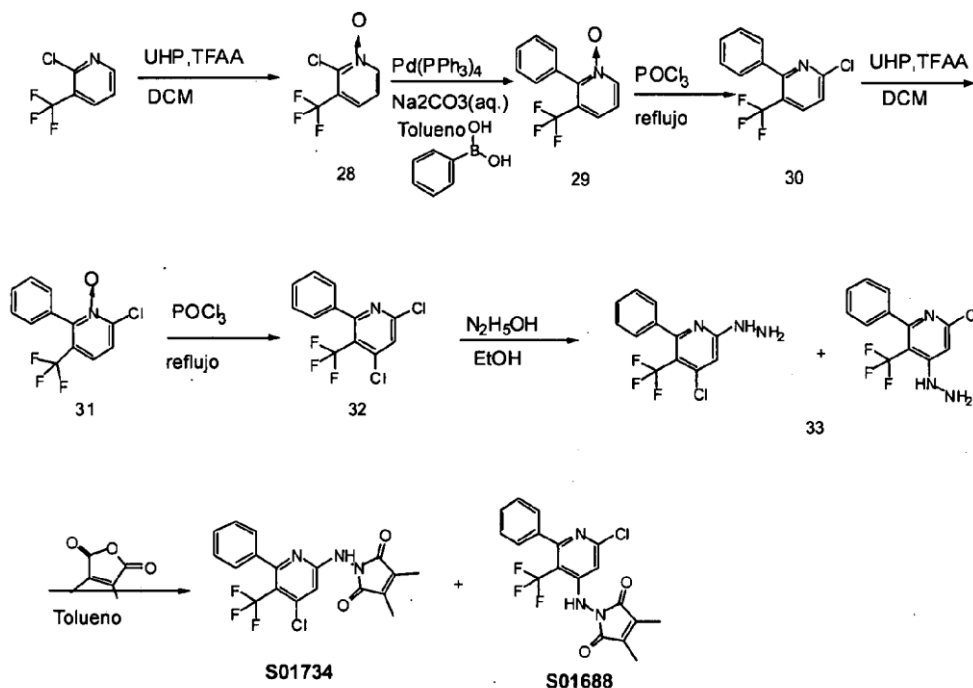
Se disolvieron dos materiales de partida en  $\text{CHCl}_3$  y se pusieron a reflujo toda la noche, después se concentraron y se purificaron mediante cromatografía en columna (EA:PE = 1:1). El producto se obtuvo como un sólido amarillo claro.

## Compuesto S01865

El compuesto 27 se disolvió en MeOH anhidro, se añadió EDCI, después se agitó toda la noche. Se concentró a vacío, se trató de la manera habitual y se purificó mediante TLC prep. para obtener el producto final como un sólido amarillo claro.

Compuestos S01734 (compuesto de la invención) y S01688 (solo para referencia)

Esquema 17



## 5 Producto intermedio 28

A una disolución de material de partida (9,26 g, 0,05 moles), se le añadió UHP (9,9g, 0,105 moles). Con un baño de hielo, se añadió gota a gota TFAA (21 g, 0,100 moles). Después de la adición, la reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 4 h. La reacción se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ac.), y la mezcla se extrajo con DCM 3 veces. La capa orgánica se recogió, se secó y se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (PE:EA = 3:1) para proporcionar el producto puro 8,1 g.

## Producto intermedio 29

Una disolución de compuesto 28 (0,8 g, 4,07 mmoles) y en 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ac. 2N) y 3 ml de tolueno se agitó en una atmósfera de N<sub>2</sub> y a temperatura ambiente. Después se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. La mezcla se agitó a refluxo a una atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 h. Después el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con agua y se extrajo con EA, y la fase orgánica se recogió, se secó y se concentró para purificarlo mediante recristalización para proporcionar 0,75 g de polvo amarillo pálido.

## Producto intermedio 31

Una disolución de compuesto 29 (0,75 g, 3,15 mmoles) en 5 ml de POCl<sub>3</sub>, y la mezcla se agitó a refluxo durante 5 h. Después la mezcla de reacción se vertió en hielo, y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo 3 veces. Después la fase orgánica se recogió, se lavó con disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y después se secó, se concentró para purificarlo mediante cromatografía en columna para producir 800 mg de producto intermedio 30, que se disolvió en 5 ml de DCM y UHP, seguido de adición de TFAA a la mezcla anterior en un baño de hielo. Después, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Después la mezcla de reacción se neutralizó mediante disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y la fase acuosa se extrajo mediante DCM 3 veces. La fase orgánica se recogió, se secó, se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna (PE:EA = 5:1) para proporcionar 350 mg de compuesto 31 puro.

## Producto intermedio 32

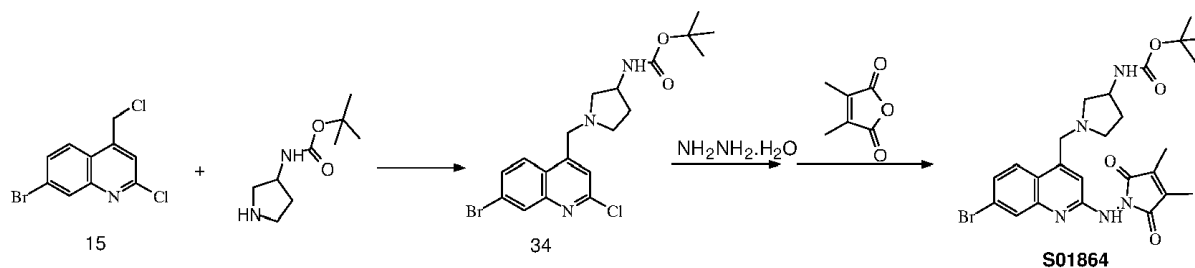
Una disolución de compuesto 31 (350 mg, 1,28 mmoles) en 5 ml POCl<sub>3</sub> se agitó a refluxo durante 4 h. Después la mezcla se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se secó, se concentró y se purificó para proporcionar 180 mg de compuesto 32 puro.

Compuestos S01734 y S01688

El procedimiento sintético del producto intermedio 32 a los compuestos diana fue similar al del procedimiento general.

5 Compuesto S01864 (solo para referencia)

Esquema 18



10 Producto intermedio 34

El material de partida y el producto intermedio 15 se disolvieron en acetonitrilo y se agitaron a temperatura ambiente toda la noche, después se filtraron, y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante TLC preparativa para producir el producto.

15 Compuesto S01864

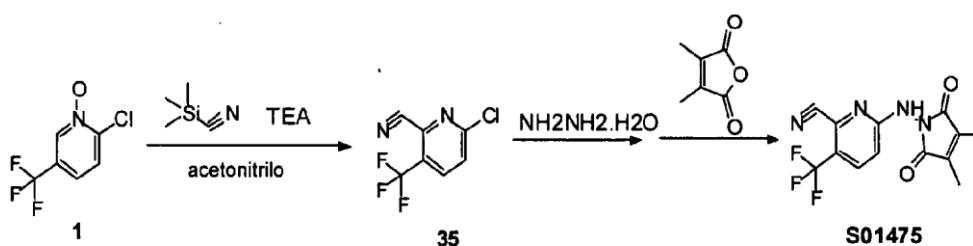
El procedimiento sintético del producto intermedio 34 al compuesto diana es similar al procedimiento general.

20 Compuestos S01268 y S01862 (solo para referencia)

La ruta sintética para los compuestos S01268 y S01862 fue similar a la del compuesto S01864

Compuesto S01475

25 Esquema 19



30 Producto intermedio 35

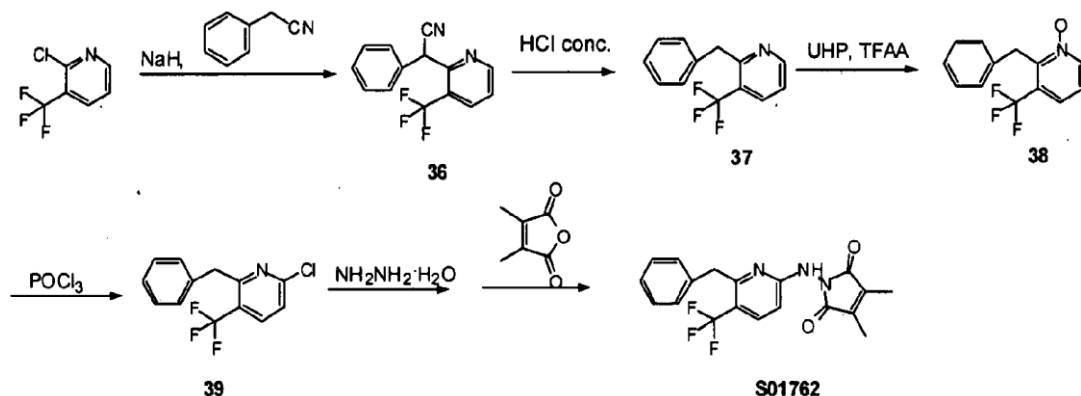
35 Se añadió cianuro de trimetilsililo (7,44 g, 75 mmoles, 10 ml) a una disolución agitada de producto intermedio 35 (5,92 g, 30 mmoles) y TEA (4,55 g, 45 mmoles, 6,3 ml) en 25 ml de acetonitrilo a temperatura ambiente. Después la mezcla se calentó hasta 110°C (temperatura del baño de aceite) durante 12 h, se enfrió hasta la temperatura ambiente, y el disolvente se evaporó. Se añadieron DCM y NaHCO<sub>3</sub> (ac.) saturado, y las capas se separaron. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó. El residuo se lavó con éter y se filtró, después se evaporó para proporcionar el producto bruto como a aceite negro que después se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar el producto como un aceite amarillo. El rendimiento fue 4,4 g (71%).

Compuesto S01475

40 El procedimiento sintético del producto intermedio 35 al Compuesto S01475 fue similar al del procedimiento general.

## Compuesto S01762

## Esquema 20



## 5 Producto intermedio 36

Se añadió hidruro de sodio (0,264 g, 6,6 mmoles, 60%) a una disolución agitada de cianuro de bencilo (0,645 g, 5,5 mmoles) en 10 ml de DMF a temperatura ambiente. Se añadió material de partida (1,0 g, 5,5 mmoles) a la mezcla tras 30 min., y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió salmuera para detener la reacción, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (se eluyó con éter de petróleo:acetato de etilo = 8:1 hasta 5:1) para proporcionar 0,475 g de producto (rendimiento = 33%).

## 15 Producto intermedio 37

El producto intermedio 36 (0,15g, 0,57 mmoles) se mezcló con 5 ml de HCl concentrado y se puso a reflujo toda la noche. Después la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se añadieron 15 ml de agua, el pH se ajustó hasta 8-9 con carbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (10 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó para proporcionar 0,14 g gramos de producto (rendimiento = 100%), que se usó sin purificación adicional para la siguiente etapa.

## 20 Producto intermedio 38

El producto intermedio 37 (0,14 g, 0,57 mmoles) se disolvió en 5 ml de DCM, después se añadió UHP (0,17 g, 1,77 mmoles) y después de eso, se añadió gota a gota TFAA (0,36 g, 1,71 mmoles, 0,24 ml) con enfriamiento en un baño de hielo. Después la mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó toda la noche a la misma temperatura. Se añadieron cinco (5) ml de agua, y la mezcla se neutralizó con carbonato de sodio hasta pH 8-9 y después se extrajo con DCM. La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó para proporcionar 0,14 g del producto bruto (rendimiento = 95%), que se usó sin purificación adicional para la siguiente etapa.

## 30 Producto intermedio 39

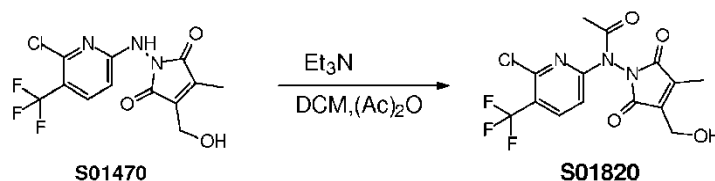
El producto intermedio 38 (0,14 g, 0,55 mmoles) se disolvió en 5 ml de POCl<sub>3</sub>, y la mezcla se calentó hasta 80-90°C durante 2 h. Después la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se vertió en agua con hielo, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat., se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. El residuo se purificó mediante TLC preparativa para producir 0,13 g de producto (rendimiento = 87%).

## Compuesto S01762

El procedimiento sintético del producto intermedio 39 al compuesto S01762 fue similar al del procedimiento general.

Compuesto S01820 (solo para referencia)

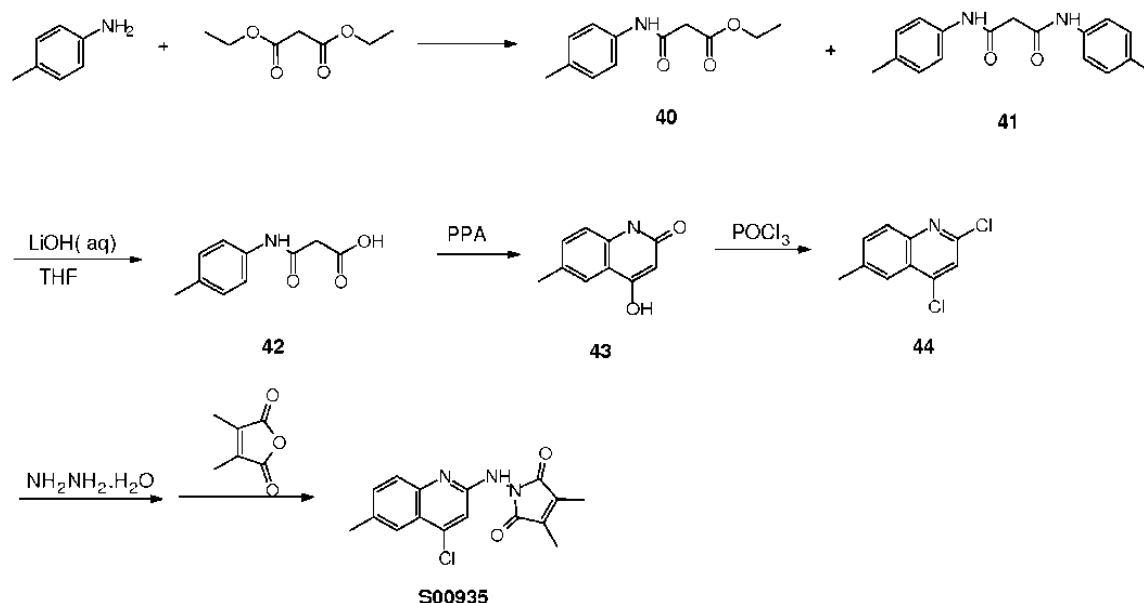
Esquema 21



Una disolución de S01470 en 3 ml de DCM se agitó a temperatura ambiente, y se añadió Et<sub>3</sub>N. Después se añadió Ac<sub>2</sub>O en un baño de hielo. La mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó toda la noche. La reacción se paralizó después y se trató de la manera habitual como se describió anteriormente. El residuo se purificó mediante TLC prep. (PE:EA = 3:1) para proporcionar el compuesto S01820 puro.

Compuesto S00935 (solo para referencia)

Esquema 22



Producto intermedio 40

Se añadió material de partida (9,08 g, 84,4 mmoles) a 19,2 ml de malonato de dietilo, la mezcla se calentó hasta 150°C (temperatura del baño de aceite) durante 6 h, se evaporó, se filtró y se lavó con acetato de etilo para proporcionar 3,7 g de sólido blanco; éste era el producto intermedio 41 (se comprobó mediante LC-MS), el filtrado se evaporó, el residuo se enfrió para producir un segundo lote sólido, se lavó con una disolución de éter de petróleo:acetato de etilo igual a 5:1, se comprobó mediante LC-MS; éste era el producto intermedio 40 (5,42 g).

Producto intermedio 42

A una disolución agitada de producto intermedio 40 (5,42 g, 24,5 mmoles) en THF, se le añadieron 60 ml de LiOH 2N, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El disolvente se evaporó, el residuo se lavó con acetato de etilo, se filtró, y la torta se añadió a 10 ml de HCl concentrado y se agitó durante 30 min., después la torta se filtró y se secó para proporcionar 3,1 g de producto.

Producto intermedio 43

El producto intermedio 42 (3,1g, 16 mmoles) se añadió a 20 ml de PPA, y la mezcla se calentó hasta 150°C durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo con agitación, después se filtró, y la torta se lavó con agua y se secó para proporcionar 2,92 g de producto.

## Producto intermedio 44

- 5 El producto intermedio 43 (0,47 g, 2,7 mmoles) se añadió a 10 ml de POCl<sub>3</sub>, y la mezcla se calentó con reflujo durante 5 h. La mezcla resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se vertió en agua con hielo, después se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó para proporcionar el producto bruto (0,45 g) que se usó sin purificación adicional.

## Compuesto S00935

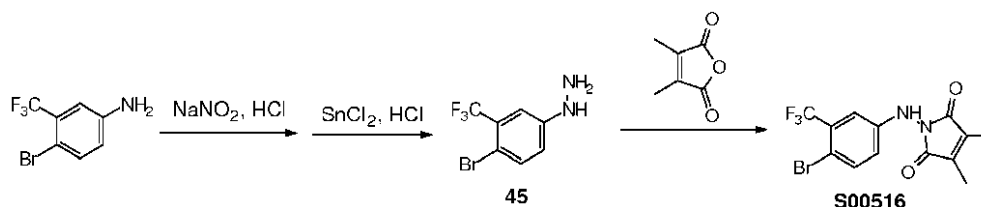
- 10 A partir del producto intermedio 43 al compuesto S00935, el procedimiento sintético fue similar al del procedimiento general.

## Compuestos S00871, S01005, S01078, S01247, y S01311 (solo para referencia)

- 15 La ruta sintética de los compuestos S00871, S01005, S01078, S01247, y S01311 es similar a la del compuesto S00935.

## Compuesto S00516

- 20 Esquema 23

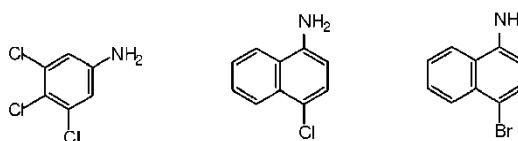


## Producto intermedio 45

- 25 Se añadió material de partida (0,08 moles) a HCl conc. (40 ml). La mezcla se enfrió hasta -5°C mediante hielo y sal con agitación. Después se añadió nitrito de sodio (5,52 g, 0,08 moles) disuelto en agua (20 ml). La agitación se continuó durante 1 h, y se añadió lentamente cloruro estañoso (30 g) en HCl conc. (30 ml) durante un período de dos horas, mientras se mantiene la temperatura por debajo de 0°C. La mezcla se agitó durante otra hora tras la adición y se filtró. El sólido filtrado se trató con hidróxido de sodio acuoso diluido y después se extrajo con éter. La capa etérea se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó, y el residuo se cristalizó en hexano para proporcionar el Compuesto 45.
- 30

## Compuesto S00516

- 35 El procedimiento sintético es similar al procedimiento general.

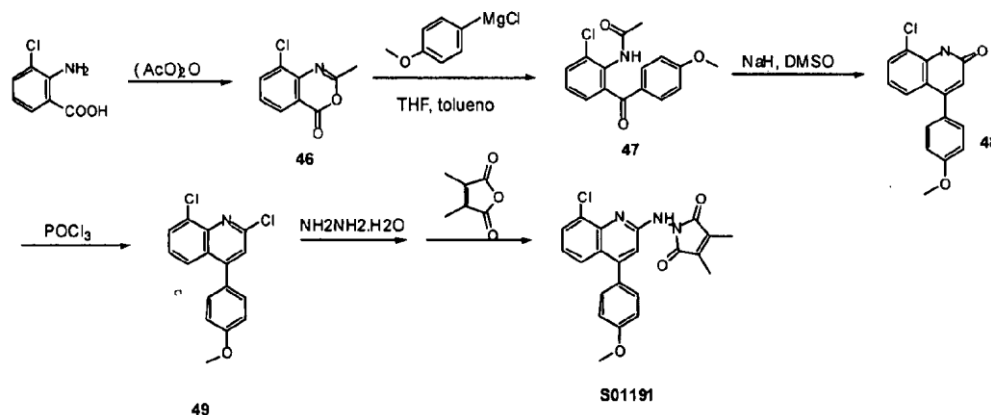


## Compuestos S00738\*, S00832, S00942\* (\* solo para referencia)

- 40 Los materiales de partida están comercialmente disponibles, de manera que la ruta sintética de los compuestos S00738, S00832, S00942 fue similar a la de S00516.

Compuesto S01191 (solo para referencia)

Esquema 24



#### 5 Producto intermedio 46

Una mezcla de ácido 2-amino-3-clorobenzoico (500 mg, 2,91 mmoles) y anhídrido acético (1,2 ml) se calentó con reflujo durante 1 hora, y el anhídrido acético en exceso se eliminó a vacío. El residuo se enfrió y se trató con éter dietílico para proporcionar un precipitado voluminoso, que se separó por filtración, se lavó con éter frío y se secó para proporcionar 550 mg del producto deseado como un sólido amarillo pálido (rendimiento = 97%).

#### Producto intermedio 47

En un matraz de tres bocas, que se había secado en un horno e inundado con N<sub>2</sub>, se añadió una pequeña cantidad de I<sub>2</sub> a una mezcla de magnesio (59 mg, 2,47 mmoles) en 0,5 ml de THF seco. Cuando la mezcla de reacción se volvió incolora, se añadió a la mezcla una disolución de 4-bromoanisol (440 mg, 2,35 mmoles) en 1,5 ml de THF seco. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que el Mg se eliminó.

El reactivo de Grignard del 4-bromoanisol en 2 ml de THF se trató con compuesto 46 (460 mg, 2,35 mmoles) en 4,5 ml de tolueno seco a 0°C durante 1 hora y a 30°C durante otra 1 hora. La disolución se acidificó cuidadosamente con ácido sulfúrico diluido, y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso y agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó para proporcionar un aceite. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 4:1) para proporcionar 450 mg del producto deseado como un sólido marrón pálido (rendimiento = 63%).

#### Producto intermedio 48

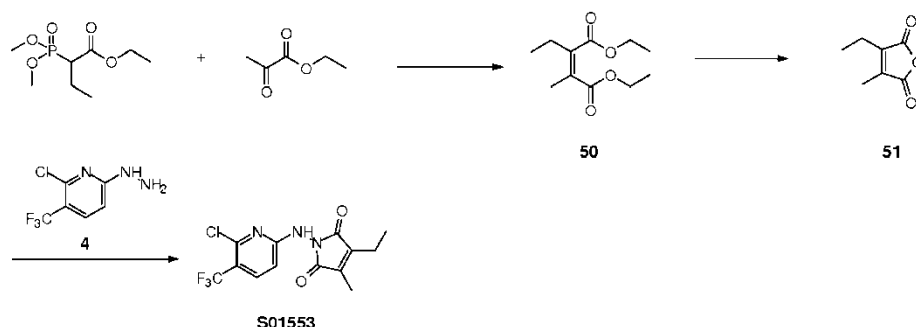
Una mezcla de compuesto 47 (400 mg, 1,32 mmoles), NaH (60% en aceite, 316 mg, 13,20 mmoles) en 1 ml de DMSO se calentó a 60-70°C toda la noche. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo, después se lavó con agua y con salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó hasta sequedad. El residuo se recristalizó en etanol para proporcionar 80 mg del compuesto deseado 48 como un sólido marrón (rendimiento = 21%).

#### Compuesto S01191

El procedimiento sintético del producto intermedio 48 al compuesto diana fue similar al del procedimiento general.

## Compuesto S01553

## Esquema 25



5

## Producto intermedio 50

Una disolución de 2-(dimetoxifosforil)butanonato de etilo (1,0 g, 4,0 mmoles) en 1,2-dimetoxietano (5 ml) se añadió a una suspensión agitada de hidruro de sodio en 1,2-dimetoxietano (10 ml). Cuando cesó la evolución de hidrógeno, se añadió a la disolución piruvato de etilo (480 mg, 4,1 mmoles) en 1,2-dimetoxietano (5 ml). La mezcla se agitó a 50°C toda la noche. Después la disolución se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con agua y con salmuera, y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó *a vacío*, y el residuo se purificó mediante cromatografía para proporcionar el producto. El rendimiento fue 710 mg (87,2%)

## 15 Producto intermedio 51

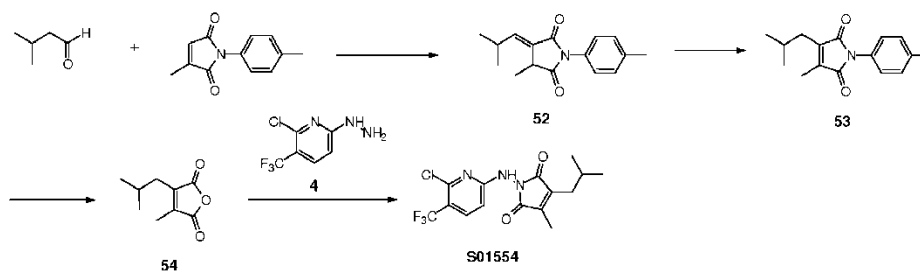
Una disolución de 2-etil-3-metilmaleato de dietilo (75 mg, 0,35 mmoles) en etanol (0,8 ml) se añadió gota a gota a NaOH acuoso (2M, 0,4 ml) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min., después se diluyó con agua (10 ml) y se lavó con éter (5 ml). La capa acuosa se acidificó con HCl ac. al 5%, después se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó *a vacío*, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre una columna de gel sílice. El rendimiento fue 41 mg (83,7%)

## Compuesto S01553

25 El procedimiento sintético del producto intermedio 51 al compuesto S01553 fue similar al del procedimiento general.

## Compuesto S01554

## Esquema 26



30

## Producto intermedio 52

35 Una mezcla de citraconimida (200 mg, 1,0 mmol) y PPh<sub>3</sub> (320 mg, 1,2 mmoles) en AcOH glacial (7 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió isovaleraldehído (160 µl, 1,5 mmoles), y la mezcla de reacción se puso a reflujo con agitación durante 24 horas. El HOAc se separó mediante destilación *a vacío*, el residuo se disolvió en EtOAc (30 ml), y la capa orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O, con salmuera, y se secó sobre NaSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó *a vacío*, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre una columna de gel sílice. Rendimiento: (90 mg, 35,0%)

40

## Producto intermedio 53

A una disolución agitada de 52 (90 mg) en THF (2 ml) se le añadió Et<sub>3</sub>N (0,4 ml). La mezcla de reacción se puso a reflujo durante 48 horas, y después se concentró *a vacío*. El residuo se disolvió en EtOAc, y la capa orgánica se lavó



con agua, con salmuera, y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó *a vacío*, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre una columna de gel sílice. Rendimiento: (85 mg, 94,4%).

Producto intermedio 54

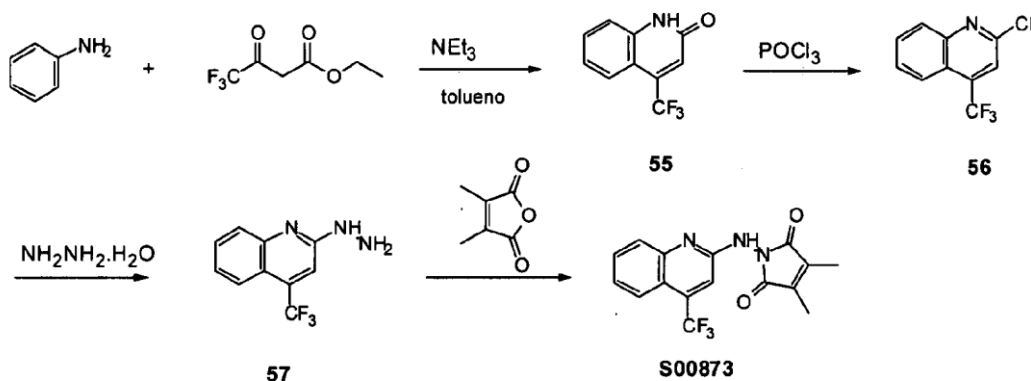
A la disolución de 53 (50 mg, 0,19 mmoles) en THF (0,3 ml) y MeOH (0,6 ml) se le añadió KOH ac. (1 ml, 30%), y la mezcla de reacción se puso a reflujo durante 12 horas con agitación. Después la mezcla de reacción se concentró *a vacío*, el residuo obtenido se acidificó con HCl ac. diluido y se extrajo con EtOAc (20 ml). La capa orgánica se lavó con agua, con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó *a vacío*, y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre una columna de gel sílice. Rendimiento: (26 mg, 81,3%).

Compuesto S01554

El procedimiento sintético del producto intermedio 54 al compuesto S01554 fue similar al del procedimiento general.

Compuesto S00873 (solo para referencia)

Esquema 27



Producto intermedio 55

A una disolución del éster (5,46 mmoles) y trietilamina (101 g, 10,86 mmoles) en tolueno (5 ml) se le añadió una disolución de anilina (6,52 mmoles) en tolueno (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se puso a reflujo hasta que se terminó la reacción. Tras el tratamiento, se obtuvo el compuesto 56, que fue suficientemente puro para usarlo en la siguiente etapa.

Producto intermedio 57

La mezcla de 55 y POCl<sub>3</sub> (5 ml) se puso a reflujo durante 5 h, y después se vertió en el agua con hielo. El extracto etéreo se lavó con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y después se concentró para producir el compuesto 56, que se usó directamente en la siguiente etapa.

La mezcla de 56 e hidrato de hidrazina en 5 ml de etanol se puso a reflujo durante varias horas hasta que el material de partida desapareció. Tras el tratamiento, se obtuvo el compuesto 57.

Compuesto S00873

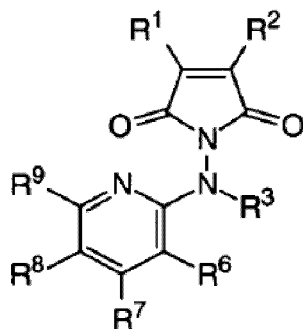
El procedimiento sintético del producto intermedio 57 al compuesto S00873 fue similar al del procedimiento general.

Compuesto S01455 (solo para referencia)

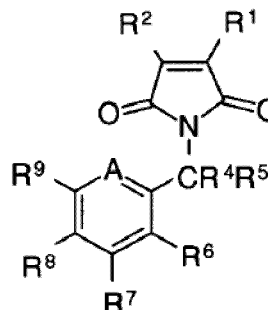
La ruta sintética del compuesto S01455 es similar a la del compuesto S00873.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de estructura (IV) o estructura (VI):



(IV)



(VI)

en el que:

uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es metilo y el otro de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es alquilo, o alquilo sustituido con alcoxi, hidroxi, carboxi, alcocarbonilo, carbamoilo opcionalmente sustituido, o aminocarbonilo cíclico opcionalmente sustituido;

R<sup>3</sup> es H, o alquilo;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo;

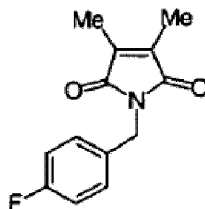
A es N o CH;

R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, y R<sup>9</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, ciano, nitro, alquiltio opcionalmente sustituido, alquilsulfinilo opcionalmente sustituido, alquilsulfonilo opcionalmente sustituido, ariltio opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, carboxilo, alcocarbonilo opcionalmente sustituido, o carbamoilo opcionalmente sustituido; y

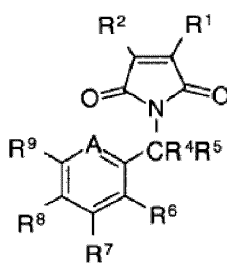
R<sup>8</sup> es halógeno o un grupo alquilo sustituido con uno o más halógenos;

o una sal del mismo;

en el que además el compuesto no presenta la estructura siguiente:



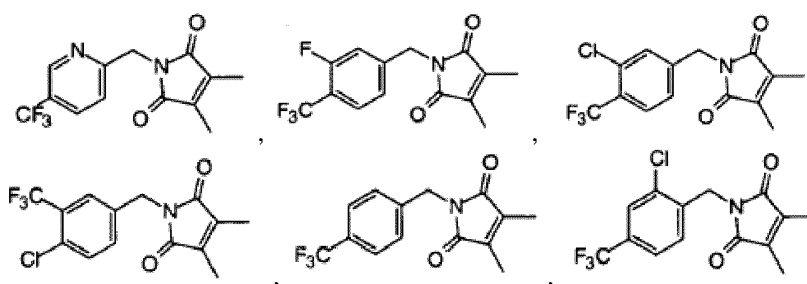
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de estructura (VI):



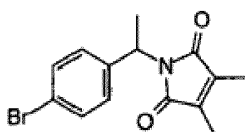
(VI)

o una sal del mismo.

- 5 3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto se selecciona de entre:

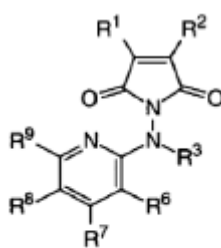


10 , y



, o una sal del mismo.

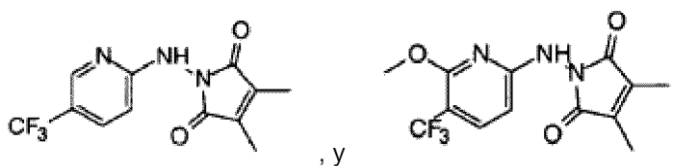
- 15 4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es de estructura (IV):



(IV)

20 o una sal del mismo.

5. Compuesto según la reivindicación 1 o 4, en el que el compuesto se selecciona de entre:

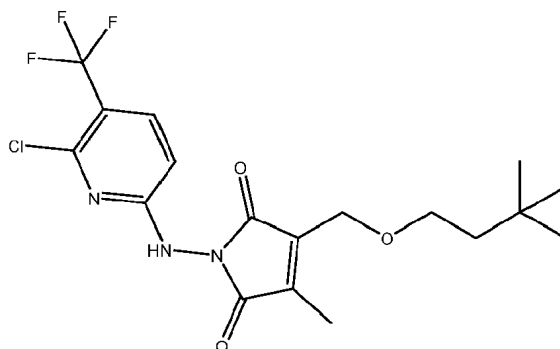


25

o una sal del mismo.

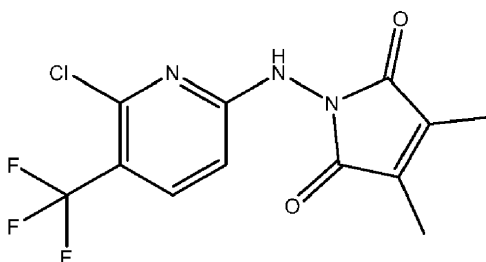
6. Compuesto según la reivindicación 1 o 4, en el que el compuesto es:

- 5 3-[[3,3-dimetilbutoxi]metil]-1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-4-metilazolin-2,5-diona (S03747), o una sal del mismo, que presenta la estructura siguiente:



- 10 7. Compuesto según la reivindicación 1 o 4, en el que el compuesto es:

1-[[6-cloro-5-(trifluorometil)(2-piridil)]amino]-3,4-dimetilazolin-2,5-diona, o una sal del mismo, que presenta la estructura siguiente:



- 15 8. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal del mismo, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal del mismo, o composición farmacéutica según la reivindicación 8 para la utilización en un método para tratar un trastorno de proliferación celular en un sujeto que lo necesita.

- 25 10. Utilización del compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular.

- 30 11. Compuesto o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 9 o la utilización según la reivindicación 10, en el/la que el trastorno de proliferación celular es el cáncer, opcionalmente en el que el cáncer es linfoma, mieloma o leucemia.

- 35 12. Compuesto o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 9 o la utilización según la reivindicación 10, en el/la que el compuesto o la composición es para la administración con por lo menos un tratamiento anticanceroso adicional, en el/la que el tratamiento anticanceroso es opcionalmente un agente que daña el ADN o un tratamiento que daña el ADN.

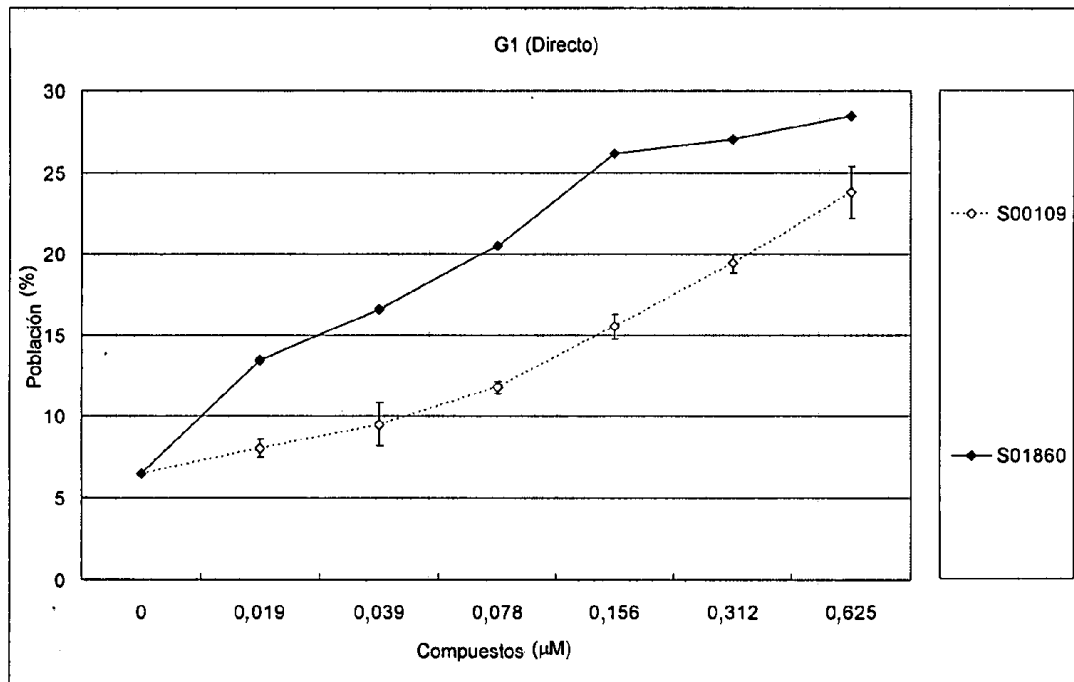
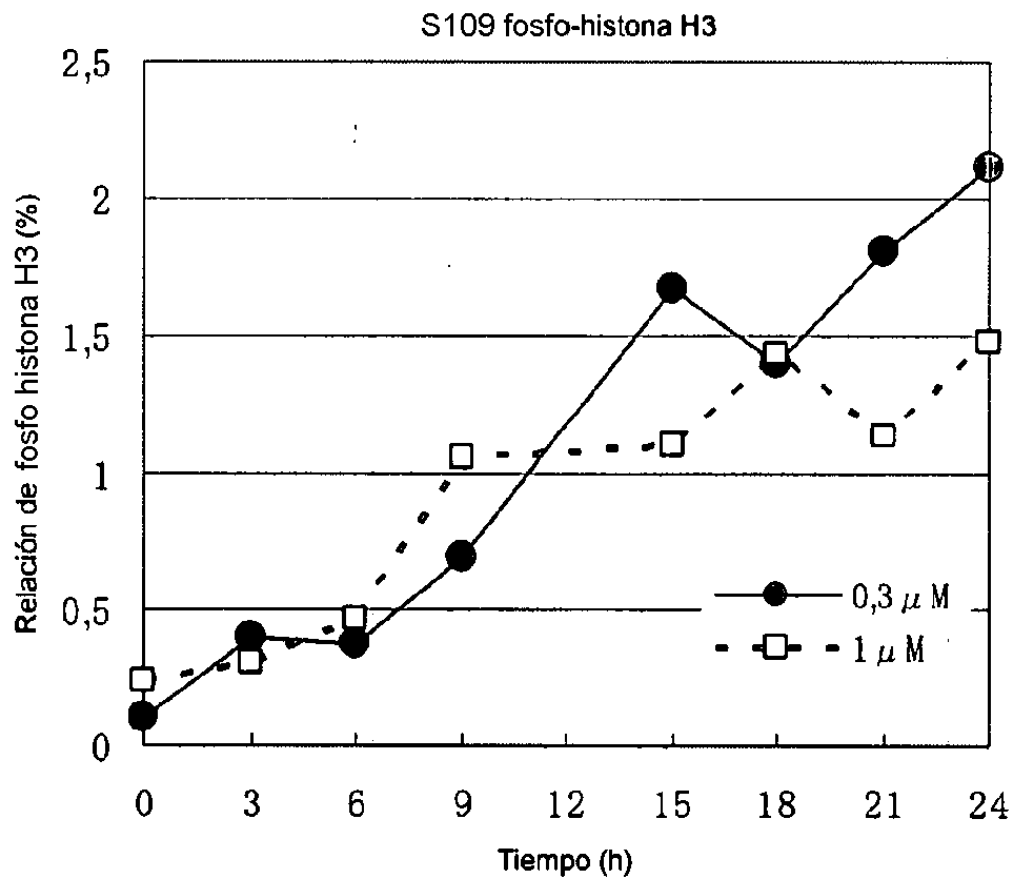
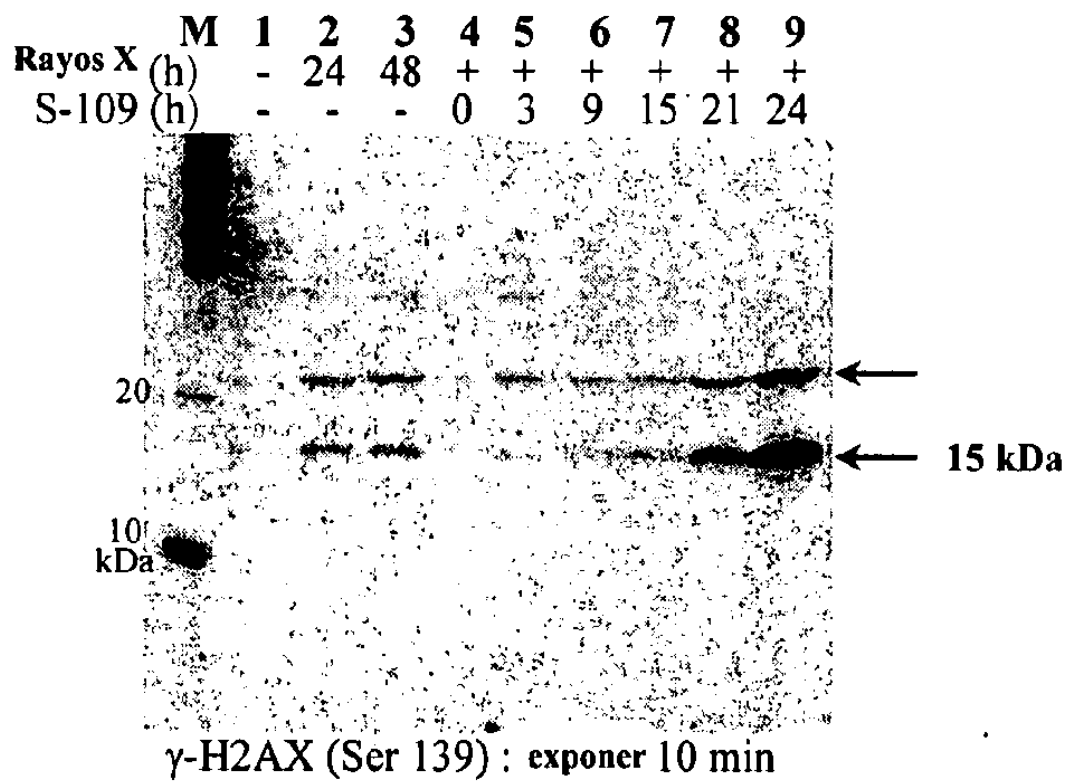


FIGURA 1



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

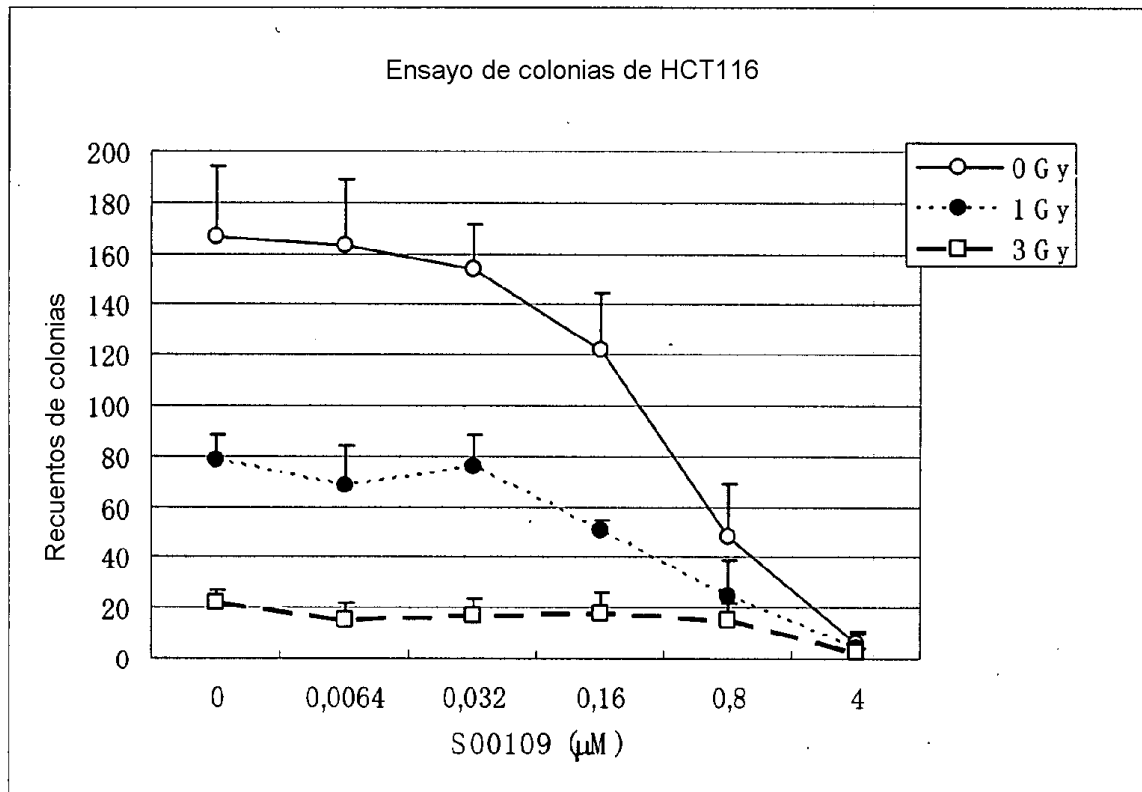
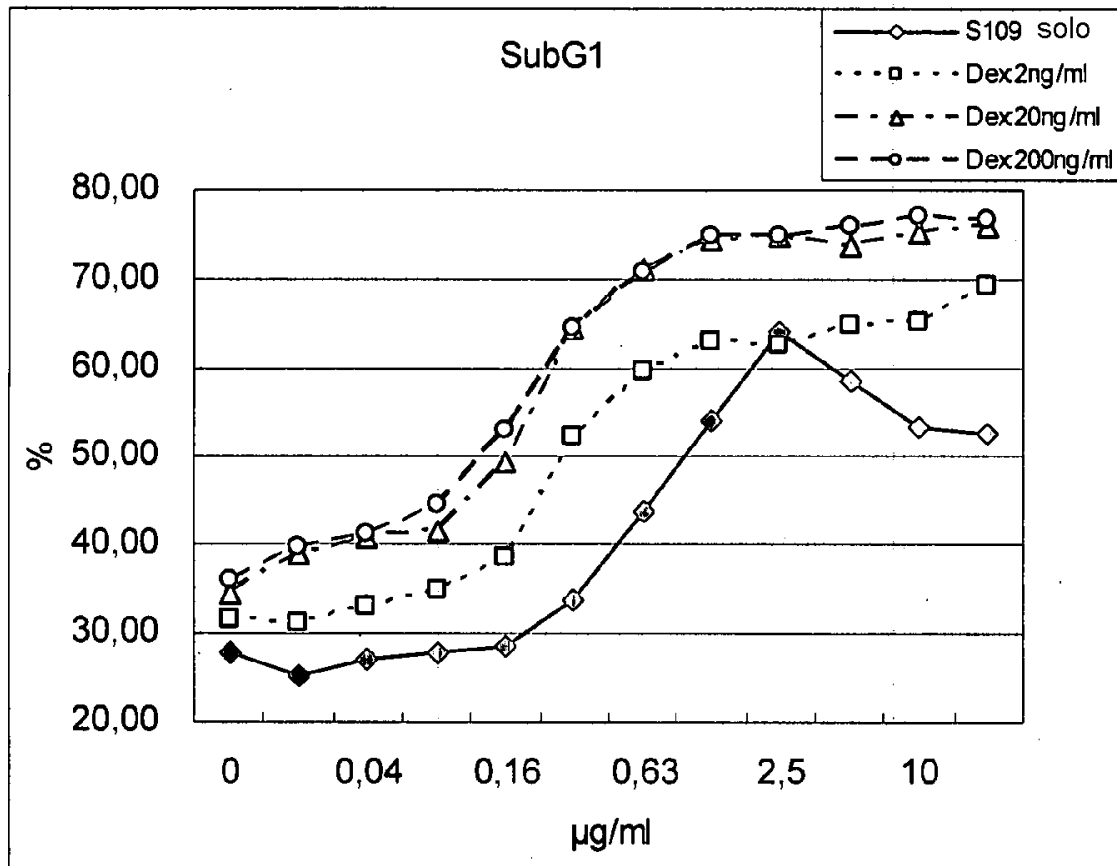
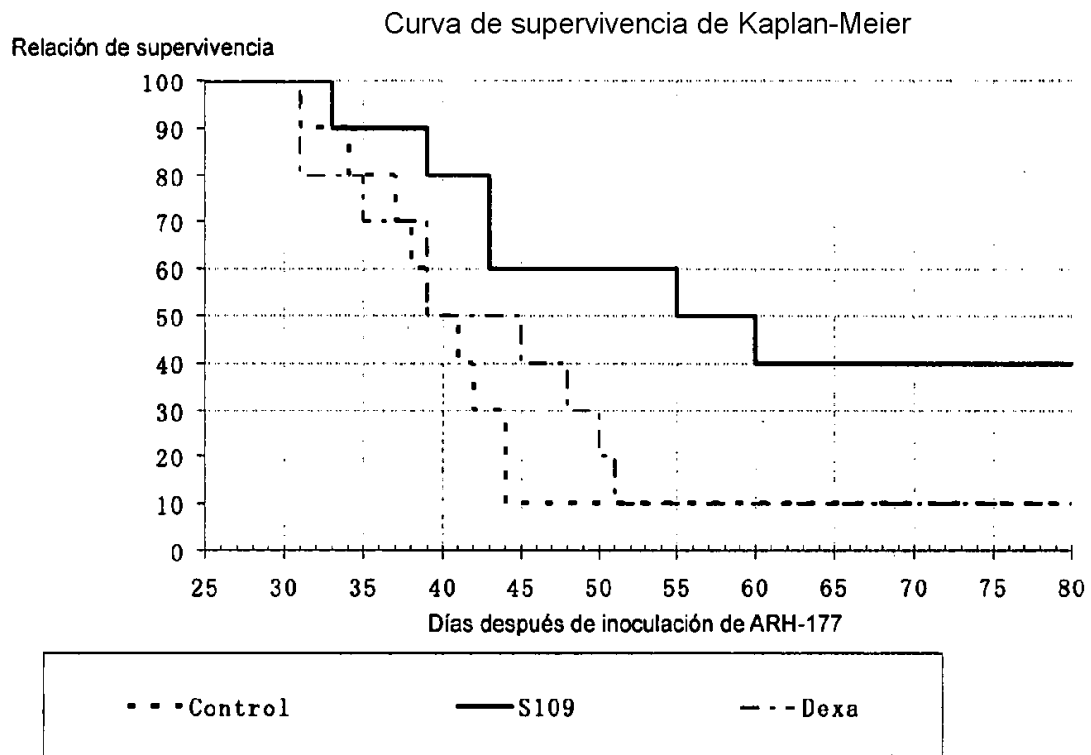


FIGURA 4

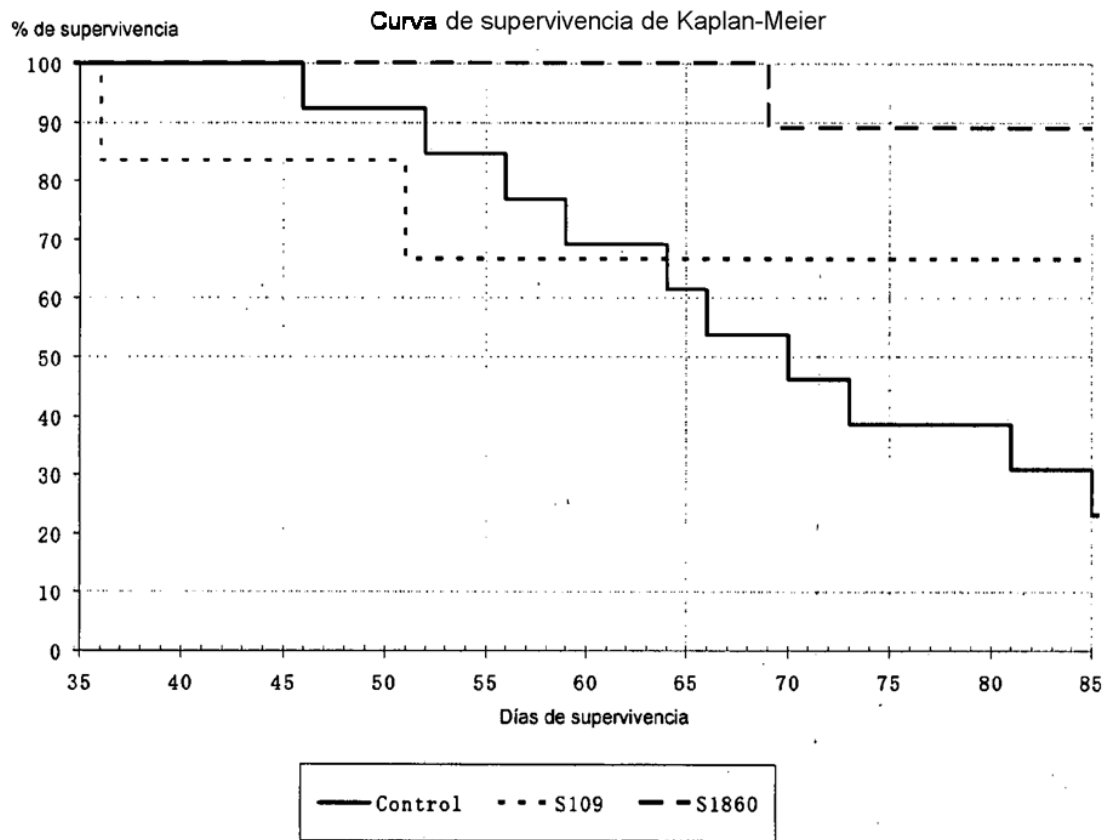




**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

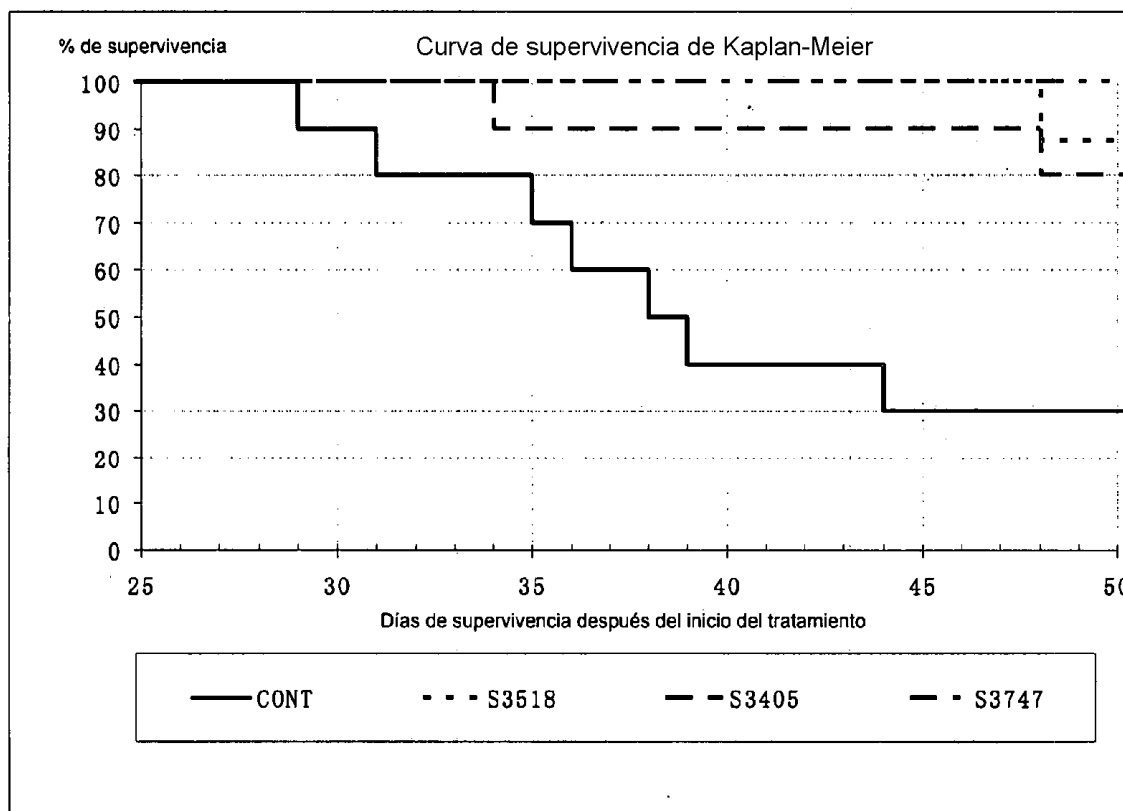


FIGURA 8