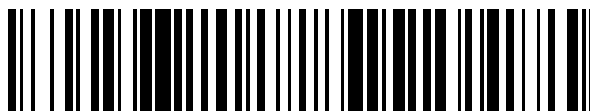


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 090**

51 Int. Cl.:

C07D 401/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014** **PCT/US2014/054987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015** **WO15038644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014** **E 14843412 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 3044218**

54 Título: **Terapéuticos dirigidos a proteínas truncadas de poliposis adenomatosa coli (apc)**

30 Prioridad:

10.09.2013 US 201361875933 P
23.01.2014 US 201461930754 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US

72 Inventor/es:

DEBRABANDER, JEF;
SHAY, JERRY W. y
WANG, WENTIAN

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 811 090 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

Terapéuticos dirigidos a proteínas truncadas de poliposis adenomatosa coli (apc)

5 Referencia cruzada a las aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad para la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 61/875,933 (presentada el 10 de septiembre de 2013) y la Solicitud provisional de los EE. UU. núm. 61/930,754 (presentada el 23 de enero, 2014).

10 Campo de la invención

La invención descrita se refiere al cáncer colorrectal, el gen supresor de los tumores APC, los productos del gen APC truncados producidos por la mutación del gen y los agentes terapéuticos dirigidos a las líneas celulares del cáncer de colon y otras líneas celulares del cáncer humano con los productos de los genes de la APC truncados.

Antecedentes de la invención

20 El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado y la tercera causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer en los Estados Unidos, con un estimado de 141 000 casos de cáncer de colon y recto diagnosticados en 2011. De este modo, 1 de cada 19 estadounidenses será diagnosticado con CCR en su vida con un riesgo general de 5,4 %. Afortunadamente, la escisión quirúrgica de los adenomas no invasivos tempranos es esencialmente curativa. Sin embargo, hay pocas opciones de tratamiento efectivas para los pacientes que padecen formas avanzadas de CCR, y el pronóstico a menudo es pobre. A pesar de una fase de latencia prolongada, se identifican muy pocas lesiones en una etapa en la que puedan extirparse quirúrgicamente (*ver Phelps y otros. Cell Cycle*, 2009; 8:16, 2549-2556).

30 Las mutaciones en el gen supresor tumoral APC humano se relacionan con la poliposis adenomatosa familiar (PAF), una afección hereditaria propensa al cáncer en la que se forman numerosos pólipos en el epitelio del intestino grueso (*ver Kinzler y otros, Science*, 1991; 253: 661-665; Kinzler y Vogelstein, *Cell*, 1996; 87: 159-170; Half y otros, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2009; 4:22). El desarrollo del CCR se inicia por el crecimiento aberrante de los pólipos adenomatosos del epitelio colónico que finalmente evoluciona a carcinomas agresivos (*ver Kinzler y Vogelstein, Cell*, 1996; 87: 159-170). Se ha informado que alrededor del 85 % de los cánceres colorrectales esporádicos albergan mutaciones truncadoras de la APC (*ver Kinzler y Vogelstein, Cell*, 1996; 87: 159-170). El crecimiento de los pólipos se asocia en la mayoría de los casos con alteraciones de ambos alelos del gen de la poliposis adenomatosa coli (APC). Un primer golpe mutacional ocurre aproximadamente en el medio del marco de lectura abierto, generando una molécula APC truncada que carece de la mitad C-terminal. Dichas mutaciones de truncamiento se encuentran en la denominada región de agrupación de mutaciones (MCR) (*ver Schneikert y otros, Human Molecular Genetics*, 2006; 16: 199-209). El segundo golpe mutacional implica la eliminación del segundo alelo o una mutación que conduce a la síntesis de un producto truncado, que casi nunca ocurre después de la MCR (*ver Schneikert y otros, Human Molecular Genetics*, 2006; 16: 199-209). De este modo, las células de cáncer de colon expresan al menos una molécula APC truncada cuya longitud se define por la posición de la MCR y, ocasionalmente, un fragmento adicional pero más corto.

45 El tratamiento del CCR depende principalmente de los agentes quimioterapéuticos que actúan con una especificidad mínima para la base genética subyacente de la enfermedad. Estos agentes quimioterapéuticos con frecuencia interrumpen la función de las células normales al tiempo que interrumpen las células cancerosas debido a la dependencia compartida del objetivo químico. Se necesitan mejores agentes terapéuticos más precisos para mejorar el tratamiento de los pacientes diagnosticados con CCR.

50 Gen de la poliposis adenomatosa coli (APC)

La APC, que no actúa como un supresor tumoral clásico, influye en la señalización de Wnt regulando así la transcripción génica. Los Wnt son una familia de glicoproteínas ricas en cisteína secretadas que se han implicado en la regulación del mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de las células madre durante el desarrollo embrionario. La señalización Wnt canónica aumenta la estabilidad de la β -catenina citoplasmática mediante la inactivación mediada por el receptor de la actividad de la quinasa GSK-3 y promueve la translocación de β -catenina en el núcleo. La vía de señalización Wnt canónica funciona además como un mitógeno de las células madre mediante la estabilización de la β -catenina intracelular y la activación del complejo de transcripción β -catenina/TCF/LEF, lo que resulta en la expresión activada de los genes reguladores del ciclo celular, como Myc, ciclina D1, EphrinB (EPHB) y Msx1, que promueven la proliferación celular (*ver Cayuso y Marti, Journal of Neurobiology*, 2005; 64: 376-387).

65 APC es el regulador negativo de la señalización Wnt. Sin esta regulación negativa, la vía Wnt es más activa y es importante en el cáncer (*ver Polakis, Current Opinion in Genetics & Development*, 2007; 17: 45-51). Los estudios que comparan las células tumorales con mutaciones en ambos alelos APC para correlacionar los niveles de la señalización de Wnt y la gravedad de la enfermedad tanto en los humanos como en los ratones han ayudado a establecer un modelo en el que los efectos de la dosificación de los genes generan una ventana definida de la señalización de Wnt

mejorada, lo que conduce a la formación de los pólipos en el intestino. Las combinaciones de las mutaciones APC 'más leves', asociadas con una mejora más débil de la señalización de Wnt, dan lugar a los tumores en los tejidos extra intestinales. De acuerdo con este modelo, la naturaleza de la mutación de la línea germinal en APC determina el tipo de la mutación somática que ocurre en el segundo alelo. (ver Minde y otros. Molecular Cancer, 2011; 10: 101).

Proteína APC

El producto del gen APC es una proteína de 312 kDa que consta de múltiples dominios, que se unen a varias proteínas, que incluyen la beta-catenina, axina, proteína de unión al terminal C (CtBP), factores de intercambio de los nucleótidos de guanina estimulados por APC (Asefs), Ras GTPasa- proteína de tipo activador (IQGAP1), unión final 1 (EB1) y los microtúbulos. Los estudios que usan los ratones mutantes y células cultivadas demostraron que la APC suprime la señalización Wnt canónica, que es esencial para la tumorigénesis, el desarrollo y la homeostasis de una variedad de tipos de células, incluidas las células epiteliales y linfoides. Otros estudios han sugerido que la proteína APC funciona en varios otros procesos celulares fundamentales. Estos procesos celulares incluyen la adhesión y migración celular, organización de redes de actina y microtúbulos, la formación del huso y la segregación cromosómica. La desregulación de estos procesos causados por las mutaciones en la APC se implica en el inicio y la expansión del cáncer de colon (ver Aoki y Taketo, Journal of Cell Science, 2007; 120: 3327-3335).

La proteína APC funciona como un centro o andamio de la señalización, ya que interactúa físicamente con una serie de proteínas relevantes para la carcinogénesis. La pérdida de la APC influye en la adhesión celular, la migración celular, el citoesqueleto y la segregación cromosómica (ver Aoki y Taketo, Journal of Cell Science, 2007; 120: 3327-3335).

La mayoría de los investigadores creen que las mutaciones de la APC causan una pérdida de cambio de función en el cáncer de colon. Las mutaciones sin sentido producen mutaciones puntuales en la APC, mientras que las mutaciones de truncamiento causan la pérdida de grandes porciones de la proteína APC, que incluyen los dominios reguladores definidos. Se ha informado un número significativo de mutaciones sin sentido de la APC en los tumores que se originan en varios tejidos, y se han relacionado con un peor resultado de la enfermedad en carcinomas uroteliales invasivos (ver Kastritis y otros, International Journal of Cancer, 2009; 124: 103-108), sugiriendo la relevancia funcional de la proteína APC mutada puntual en el desarrollo de los tumores extra intestinales. La base molecular por la cual estas mutaciones interfieren con la función de la APC permanece sin resolver.

La mutación APC que resulta en un cambio de función puede influir en la inestabilidad cromosómica de al menos tres maneras: al disminuir la interacción cinetocoro-microtúbulo, al perder la función del punto de control mitótico y al generar las células poliploides. Por ejemplo, los estudios han demostrado que la APC unida a los microtúbulos aumentó la estabilidad de los microtúbulos *in vivo* e *in vitro*, lo que sugiere un papel de la APC en la estabilidad de los microtúbulos (ver Zumburn y otros, Current Biology, 2001; 11: 44-49). La APC truncada condujo a la inestabilidad cromosómica en las células madre embrionarias de ratón (ver Fodde y otros, Nature Cell Biology, 2001; 3: 433-438), interfirió con la unión de los microtúbulos más extremos y causó un aumento dramático en las anomalías mitóticas (ver Verde y Kaplan, Journal of Cell Biology, 2003; 163: 949-961). Los estudios han demostrado que las células cancerosas con las mutaciones APC tienen una capacidad disminuida para corregir las uniones erróneas de los microtúbulos cinetocóricos, lo que explica la aparición generalizada de la inestabilidad cromosómica en los tumores (ver Bakhom y otros, Current Biology, 2009; 19:1937-1942). Además, se notificó la abrogación de la función del punto de control del huso con la pérdida de la función APC. La inactivación de APC con siRNA indicó que la pérdida de APC causa la pérdida de la función del punto de control del huso mitótico al reducir la asociación entre el cinetocoro y las proteínas del punto de control Bub1 y BubR1. De este modo, la pérdida de la APC reduce la apoptosis e induce poliploidía (ver Kaplan y otros, Nature Cell Biology, 2001; 3: 429-432; Dikovskaya y otros, Journal of Cell Biology, 2007; 176: 183-195; Rusan y Peifer, Journal of Cell Biology, 2008; 181: 719-726). La poliploidía es una fuente importante de aneuploidía ya que puede conducir a la mitosis multipolar (ver Shi y King, Nature, 2005; 437: 1038-1042).

Si bien la pérdida de la función debido a la APC puede ser parcialmente correcta, hay informes que muestran que una gran fracción de los pacientes con cáncer de colon tiene al menos un producto del gen APC que se trunca, y que esto tiene una ganancia de la función. De este modo, las proteínas APC truncadas pueden desempeñar un papel activo en la iniciación y la progresión del cáncer de colon en lugar de ser recesivo; por ejemplo, la APC truncada, pero no la APC de longitud completa, puede activar Asef y promover la migración celular. Un informe reciente divulga que los inhibidores de tankirasa de molécula pequeña, G007-LK y G244-LM, que suprimen el crecimiento tumoral en un modelo animal mutante de APC, son efectivos para bloquear la señalización de Wnt/ β -catenina que se induce por la mutación APC, (Leu T y otros, Cancer Res., 73(10) 2013).

A pesar de que los defectos en la APC ocurren en una alta fracción de los casos de cáncer de colon, actualmente no existen terapéuticos dirigidos a las vulnerabilidades resultantes de estos defectos. La invención descrita proporciona compuestos inhibidores de molécula pequeña que se dirigen selectivamente a la APC truncada en las células epiteliales de colon humano inmortalizadas (HCEC) para tratar el cáncer de colon.

Breve descripción de la invención

De acuerdo con un aspecto, la invención descrita proporciona una serie de compuestos de molécula pequeña que inhiben selectivamente el crecimiento de las células cancerosas humanas que contienen una proteína truncada de poliposis adenomatosa coli (APC).

- 5 De acuerdo con una modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de Fórmula I. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de Fórmula I-a. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de Fórmula I-b. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de Fórmula I-c. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de Fórmula I-d. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en las 43 estructuras descritas en la reivindicación 3. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de la fórmula estructural descrita en la reivindicación 5. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en las 5 estructuras descritas en la reivindicación 7. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es un compuesto de la fórmula estructural descrita en la reivindicación 9. De acuerdo con otra modalidad, el IC₅₀ del compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es de 0,01 nM a 5 µM. De acuerdo con otra modalidad, el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña está en forma de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica del compuesto y un portador farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con otra modalidad, la cantidad terapéutica del compuesto anticancerígeno de molécula pequeña es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación tumoral, inducir la muerte celular o una combinación de estos.

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer colorrectal en un individuo cuyas células epiteliales del colon expresan al menos una proteína APC truncada, que comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de al menos un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde, la cantidad terapéutica es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación tumoral, inducir la muerte celular, o una combinación de estos.

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona una célula epitelial colónica humana (HCEC) inmortalizada que comprende un gen APC de tipo salvaje de longitud completa, en donde, la célula comprende al menos uno de los siguientes: un vector expresado ectópicamente que contiene un homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten (*Krasv¹²*), un ARN de horquilla pequeña contra la proteína tumoral p53 (*shp53*) y un ARN de horquilla pequeña contra la APC (*shAPC*). De acuerdo con una modalidad, el gen APC contiene una mutación somática en el codón 1450. De acuerdo con otra modalidad, el gen APC contiene una mutación somática en el codón 1309. De acuerdo con otra modalidad, la célula expresa una proteína LacZ. De acuerdo con otra modalidad, la célula expresa el homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*Krasv¹²*) y el ARN de horquilla pequeño contra APC (*shAPC*). De acuerdo con otra modalidad, la célula se transduce con la quinasa 4 dependiente de ciclina retroviral (*Cdk4*) y un componente catalítico de la telomerasa humana (*hTERT*).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de una cripta colónica. Las criptas del colon están compuestas por una capa epitelial de células que incluye las células madre sometidas a mitosis, células de absorción columnar, células caliciformes productoras de mucina y células enteroendocrinas. Las células se diferencian y migran a la superficie luminal de la cripta, donde son extruidas hacia la luz del intestino por la muerte celular programada. Se cree que la APC participa en todos estos procesos directa o indirectamente modulando los perfiles de la transcripción dentro de las células epiteliales intestinales (ver Goss y otros, *Journal of Clinical Oncology*, 2000; 18: 1967-1979). La APC influye en la señalización de Wnt a través de la beta-catenina/TCF. La APC de longitud completa influye en el control del ciclo celular al detener las células en G1/S a través de la vía del retinoblastoma (Rb) y localizarlo en los husos mitóticos y centrosomas durante la fase M. La APC influye en la migración celular al estabilizar los microtúbulos y activar la división celular proteína de control 42 (*cdc42*). Por último, la APC de longitud completa influye en la diferenciación celular y la apoptosis.

La Figura 2 ilustra los posibles genes implicados en la progresión del epitelio colónico normal al cáncer de colon. Se cree que la mutación APC es un evento frecuente y temprano en el cáncer colorrectal, ya que las mutaciones APC se detectan en más del 80 % de los tumores colorrectales, y más del 90 % de las mutaciones APC generan codones de parada prematuros que resultan en productos genéticos truncados.

La Figura 3 muestra la estructura de APC de longitud completa y truncada. La APC truncada carece de los dominios de unión para la beta-catenina y los microtúbulos, pero retiene los dominios de unión para Asef, de este modo conduce a la activación de la proliferación, la inducción de la inestabilidad cromosómica y la estimulación de la migración celular. (ver Fodde y otros, *Nat Rev Cancer*, 1:55-67) Las mutaciones A1309 y A1450 están más representadas.

La Figura 4 ilustra que las células epiteliales del colon humano inmortalizadas (HCEC) son diploides normales y pueden diferenciarse. (A) Las pequeñas estructuras multicelulares autoorganizadas muestran evidencia de la villina polarizada y la tinción nuclear general. (B) Las pequeñas estructuras multicelulares autoorganizadas (día

11) muestran evidencia de la proteína de unión estrecha-1 (ZO-1) y la tinción nuclear general. (C) Las pequeñas estructuras multicelulares autoorganizadas (día 11) muestran evidencia de la mucina [MUC]2, la proteína de unión estrecha -1 (ZO-1) y la tinción nuclear general. (D) Muestra que hTERT CDK4 inmortalizó las células epiteliales del colon humano diferenciadas de manera similar a las células intestinales primarias de ratón. Las células hTERT CDK son 100 % LGR-5 positivas. El LGR-5 es un biomarcador aceptado de las células madre del colon. (ver Roig y otros. Gastro, 2010; 138:1012-1021).

La Figura 5 muestra que los truncamientos de la APC confieren propiedades tumorigénicas. Las células epiteliales del colon humano isogénicas (HCEC) usadas fueron: HCEC inmortalizadas con quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) y transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) (1CT); HCEC con las alteraciones genéticas CDK4, hTERT, homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten (*Kras*^{v12}), ARN de horquilla pequeña contra la APC (shAPC), (1CTRA); HCEC con las alteraciones genéticas CDK4, hTERT, *Kras*^{v12}, ARN de horquilla pequeña contra la proteína tumoral p53 (*shp53*), shAPC (1CTRPA); 1CTRPA que expresa LacZ (1CTRPA LacZ); 1CTRPA que tiene una mutación somática en el codón 1450 (1CTRPA 1450); y 1CTRPA que tiene una mutación somática en el codón 1309 (1CTRPA 1309). Mientras que una pérdida del 90 % de la función APC no aumenta las propiedades tumorigénicas, el derivado de la línea celular isogénica que contiene un APC truncado muestra las características de la transformación. Esto indica que la APC truncada proporciona una ganancia de la función que representa un aumento en la progresión del cáncer y puede explicar por qué una gran fracción de pacientes con CRC retiene una proteína APC truncada.

La Figura 6 es un diagrama de flujo que muestra las etapas en la identificación de TASIN-1 (inhibidor selectivo de APC truncada) a través de la detección de alto rendimiento.

La Figura 7 muestra que TASIN-1 es selectivamente tóxico para las líneas de cáncer colorrectal (CRC) con truncamiento de la APC. (b) Validación de la expresión ectópica del truncamiento de APC, inactivación de WT APC y p53 y expresión de *Kras*^{v12} oncogénico por Transferencia Western o un ensayo de digestión de restricción. La línea celular usada en la pantalla principal se resalta en el cuadro rojo. (e) Curva de respuesta a la dosis de TASIN-1 en las células HCT116 y DLD1. La tabla (e) enumera el valor de IC₅₀ para ambas líneas celulares. DLD1 expresa la APC truncada, mientras que HCT116 expresa la APC de tipo salvaje. De este modo, TASIN-1 inhibe que las células DLD1 que expresan las APC truncadas sobrevivan y formen colonias, pero tiene poco o ningún efecto sobre las células HCT116 (f) Fotografías representativas y cuantificación de las células HCT116 y DLD1 cultivadas en agar blando en presencia o ausencia de TASIN-1 durante 7 días. Los datos representan la media ± desviación estándar, n=3. Prueba *t* de Student, ****P* < 0,001.

La Figura 8 ilustra que la expresión ectópica del truncamiento de APC confiere propiedades tumorigénicas. (a) La expresión ectópica del truncamiento de la APC aumentó la tasa de crecimiento en las células 1CTRPA A1309 en comparación con 1CTRPA. Cambio de pliegue en la eficiencia de formación de las colonias de agar blando (b) o la invasión a través de Matrigel® (c) en las células 1CTRPA A1309 en comparación con 1CTRPA. Los datos representan la media ± desviación estándar, n=3. Prueba *t* de Student, **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001.

La Figura 9 ilustra que la inactivación de la APC truncada desensibiliza las células DLD1 a TASIN-1, proporcionando evidencia de que la APC es el objetivo de TASIN-1.

La Figura 10 muestra que se requiere el truncamiento de la APC para los efectos citotóxicos de TASIN-1. (a) Curva de respuesta a la dosis de las células DLD1 que expresan shRNA o shRNA no silenciadores (Nsi) contra la APC. La tabla (a) enumera el valor IC₅₀ para cada línea celular. (b) La curva de la respuesta a la dosis de las células HCT116 y HCT116 p53^{-/-}, un mutante nulo para la proteína tumoral 53 (que es un supresor tumoral conocido), infectado con un vector lentiviral que expresa APC A1309 truncada, se usó para expresar la transacetilasa beta-galactósido (LacA) o el mutante de truncamiento APC A1309. La LacA se expresó ectópicamente en las líneas celulares como un control negativo. Los datos representan las medias ± desviación estándar, n=3. La inactivación y la expresión ectópica se demostraron mediante Transferencia Western. (c) El gráfico de barras izquierdo muestra la fracción superviviente de cada línea celular tratada con DMSO, 2,5 M o 5 µM de TASIN-1 durante 72 horas. En la tabla de la derecha (c) se enumeran los promedios de los valores de IC₅₀ para cada línea celular a partir de triplicados biológicos. Se determinó la significación estadística entre el promedio de los valores de IC₅₀ de las líneas celulares con APC WT y las líneas celulares con APC truncada. Prueba *t* de Student, *****P* < 0, 0001. El estado de la APC en cada línea celular se basa en datos publicados (Chandra, SH, Wacker, I. Appelt, Reino Unido, Behrens, J. & Schneikert, J. A common role for various human truncated adenomatous polyposis coli isoforms in the control of beta-catenin activity and cell proliferation. PloS one 7, e34479 (2012)) y la Base de datos del Proyecto Genoma del Cáncer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP).

La Figura 11 muestra que TASIN-1 es selectivamente tóxico para las células con la APC truncada. TASIN-1 no afecta la viabilidad de las líneas celulares normales (a) y otras células de tipo canceroso (b) con WT APC, pero mata las células DU4457 con la APC truncada. Los datos representan la media ± desviación estándar, n=3. Prueba *t* de Student, ****P* < 0,001.

La Figura 12 ilustra las respuestas de las líneas celulares de cáncer colorrectal con un estado APC variable a TASIN-1. Las líneas celulares epiteliales del colon humano que expresan APC HT-29 truncada, DLD1, SW620, SW480, HCT15, Lovo y Caco-2, y las células que expresan APC, HCT116, HCT116 p53^{-/-}, HCEC, C26Ci, HBEC y BJ de tipo salvaje, se trataron con TASIN-1 y se evaluó la fracción celular sobreviviente. Tenga en cuenta que HCT116, HCT116 p53^{-/-}, HCEC y C26Ci son líneas celulares colónicas, mientras que las líneas celulares HBEC y BJ son líneas celulares epiteliales bronquiales y fibroblastos de prepucio, respectivamente. En ambas condiciones, TASIN-1 a 2 µM y 5 µM, todas las líneas celulares que expresan la APC truncada demostraron sensibilidad a TASIN-1, mientras que las líneas celulares que expresan APC de tipo salvaje no demostraron sensibilidad a TASIN-1. Esto sugiere que las células normales que contienen niveles de la APC de tipo salvaje no deberían verse afectadas.

por TASIN-1.

La Figura 13 muestra que el tratamiento sostenido con dosis bajas de TASIN-1 suprimió el crecimiento independiente del anclaje en las células DLD1.

La Figura 14 muestra que TASIN-1 induce la apoptosis en las células DLD1. Después de 72 horas de incubación de las células HCT116 o DLD1 con DMSO, TASIN-1 2,5 μ M o BARD, los niveles de PARP escindido se analizaron mediante transferencia Western. El DMSO sirvió como control negativo, sin influir en la cantidad de PARP escindido en las líneas celulares. Sin embargo, BARD sirvió como control positivo, facilitando el aumento de PARP escindido en las líneas celulares HCT116 y DLD1. Las células DLD1 tratadas con TASIN-1 exhibieron un aumento en la PARP escindida, mientras que en las mismas condiciones las células HCT116 no lo hicieron. La HCT116 expresa la APC de tipo salvaje, mientras que la DLD1 expresa la APC truncada. Además, la actividad de la caspasa se incrementó en las células DLD1 tratadas con TASIN-1, 2,5 μ M.

La Figura 15 ilustra que TASIN-1 induce la apoptosis dependiente de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) en DLD1 pero no en las células HCT116. La incubación con TASIN-1 induce la escisión de PARP (a), la liberación del citocromo c de las mitocondrias (b) y la activación de la caspasa 3 en las células DLD1 (c). La doxorubicina (DOX) se usó como control positivo para la apoptosis. Se usó la β -actina como control de carga. Los valores en (c) representan el doble de la inducción de la actividad caspasa3/7 normalizada a las células tratadas con el DMSO. RLU: unidad relativa de luciferasa. (d) El tratamiento con TASIN-1 induce la fosforilación de JNK en las células DLD1. (e)-(g) El cotratamiento de TASIN-1 con SP600125 revierte los efectos destructores de TASIN-1 (e), inhibe la fosforilación de JNK, elimina la escisión de PARP inducida por el tratamiento de TASIN-1 (f) y reduce la actividad de la caspasa3/7 (g). Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar, n=3. Prueba *t* de Student, ***P* < 0,01, *** *P* < 0,001.

La Figura 16 muestra que TASIN-1 indujo la liberación del citocromo C en las células DLD1. Cito: citoplasma; mito: mitocondrias. Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que se encuentra en la membrana externa mitocondrial.

La Figura 17 muestra la estabilidad metabólica de TASIN-1 en S9 de ratón y los ensayos de los hepatocitos.

La Figura 18 muestra que TASIN-1 se retiene en el intestino grueso después de absorberse por el espacio peritoneal. LIC: contenido del intestino grueso.

La Figura 19 ilustra el método por el cual la potencia y la selectividad de los compuestos de plomo se caracterizaron *in vivo*.

La Figura 20 muestra que TASIN-1 inhibe el crecimiento tumoral en los xenoinjertos DLD1. El programa de dosificación fue intraperitoneal durante 18 días a 40 mg/kg, administrado dos veces al día. (a) Los tamaños del tumor de los xenoinjertos DLD1 tratados con TASIN-1 (abajo) son más pequeños que los de los ratones control (arriba). Barra de escala, 10 mm. TASIN-1 reduce significativamente la tasa del crecimiento tumoral de DLD1 (b).

La Figura 21 muestra que TASIN-1 inhibe selectivamente el crecimiento tumoral en los xenoinjertos con truncamiento de la APC (c-d) y reduce la tumorigenicidad en un modelo genético de ratón CRC (e-g). TASIN-1 reduce significativamente la tasa del crecimiento tumoral de HT29 (c) pero no los xenoinjertos de HCT116 (d). (c)-(d), los datos representan las medias $\pm$ desviación estándar de 8 tumores. El tratamiento con TASIN-1 reduce significativamente el número de los tumores benignos (pólipos) (e) y disminuye el tamaño del pólipo (f) en *CPC*; ratones *Apc*. En (e), cada punto representa un ratón. La media se indica mediante la línea negra continua. (g) TASIN-1 no inhibió el crecimiento de los ratones. En (f) y (g), los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 8-10 ratones. Se usaron la prueba *t* de Student (c)-(e), (g) y la prueba *t* múltiple ((f), FDR=1 %). **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001.

La Figura 22 muestra que TASIN-1 inhibió el crecimiento tumoral en los xenoinjertos HT29. El programa de dosificación fue intraperitoneal durante 18 días a 40 mg/kg, administrado dos veces al día.

La Figura 23 muestra que TASIN-1 no inhibe el crecimiento tumoral en xenoinjertos de HCT116. El programa de dosificación fue intraperitoneal durante 18 días a 40 mg/kg, administrado dos veces al día. HCT116 tiene APC de tipo salvaje. De este modo, TASIN-1 mantiene la selectividad para APC truncada *in vivo*.

La Figura 24 muestra que TASIN-1 reduce la tumorigénesis en un modelo de ratón CRC genéticamente modificado. (a) TASIN-1 se retiene principalmente en el tejido del intestino grueso después de la inyección intraperitoneal. (b) Fotografías representativas de dos colon de los grupos de control y tratados con TASIN-1. (c) TASIN-1 suprime la expresión del conjunto de genes inflamatorios *in vivo*. Se extrajo el ARN de los lisados tumorales de control y del grupo tratado con TASIN-1, se sintetizó el ADNc y se sometió a análisis de qPCR. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de 5 ratones. Prueba *t* de Student, **P* < 0,05, ***P* < 0,01.

La Figura 25 muestra que TASIN-1 inhibe el tumor en el modelo de ratón de xenoinjerto mediante la inducción de la apoptosis sin toxicidad notable. (a) Pesos corporales antes y después del tratamiento en los ratones control o tratados con TASIN-1. (b) Imágenes representativas de tinción H&E e inmunohistoquímica para la caspasa 3 escindida en TASIN-1 o los xenoinjertos DLD1 tratados con el disolvente. Barra de escala (izquierda), 50 μ M; (derecha), 200 μ M. Los tumores tratados con TASIN-1 mostraron las áreas de las células tumorales apoptóticas (marcadas con un recuadro, abajo a la izquierda) y mostraron la tinción positiva para la caspasa 3 escindida (abajo a la derecha). (c) PARP escindido se detectó en los extractos del control o en las muestra de tumor tratada con TASIN-1 mediante transferencia Western.

La Figura 26 muestra el análisis de la relación estructura-actividad (SAR) para identificar los análogos de TASIN-1. Los análogos se probaron con diferentes quimiotipos. Se han probado 101 análogos y 40 de estos análogos muestran una mayor potencia en las células DLD1 que TASIN-1.

La Figura 27 muestra que los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña PDSA-010, PDSA-011, PDSA-013 y PDSA-014 matan de forma potente y selectiva las células DLD1 y 1CTRPA A1309.

La Figura 28 muestra que el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña PDSA-014, administrada por inyección intraperitoneal a 10 mg/kg dos veces al día, inhibe el crecimiento tumoral en xenoinjertos DLD1.

La Figura 29 muestra que el compuesto anticancerígeno de molécula pequeña PDSA-014, administrado por inyección intraperitoneal a 10mg/kg dos veces al día, no inhibe el crecimiento tumoral en los xenoinjertos de HCT116.

La Figura 30 muestra que TASIN-1, 2,5 μ M induce la muerte celular lenta y reversible.

La Figura 31 muestra que TASIN-1 aumenta el índice mitótico 4 veces sobre las células de control.

La Figura 32 muestra que TASIN-1 altera la congregación cromosómica similar al control positivo PITSTOP2.

La Figura 33 muestra que TASIN-1 altera los husos mitóticos, la alineación cromosómica y la organización de la fibra K durante la mitosis en las células DLD1. (a) El ancho de la placa de la metafase. (b) La relación del ancho del huso/ancho total de las células de la metafase. Pitstop2 es un control positivo para la interrupción del huso. Cada punto representa una célula. La media se indica mediante la línea negra continua. (c) Imágenes representativas de las células sincronizadas con la metafase teñidas para α -tubulina (rojo), HURP (verde) y ADN (DAPI, azul). El gráfico muestra el porcentaje de las células tratadas con TASIN-1 con localización anormal de HURP. Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media de 50 células acumuladas de 3 triplicados biológicos. Prueba t de Student, $**P < 0,001$. (d) El tratamiento con TASIN-1 induce puentes microsómicos y anafásicos rezagados como lo indica la flecha roja. Todas las barras de escala: 10 μ M.

La Figura 34 muestra que TASIN-1 no afecta la actividad de la vía Wnt en las células DLD1. Inmunotinción para la β -catenina activa (a) y la transferencia Western para la β -catenina total (b) en las células DLD1 tratadas con TASIN-1 durante 24 horas. (c) TASIN-1 no afectó la actividad de la vía Wnt mediante el uso del indicador STF. IWR se usó como control positivo (Chen, C. y otros. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. Nature Chemical Biology 5, 100-107 (2009)). Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar, n=3. Prueba t de Student, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$. Todas las barras de escala: 10 μ M.

La Figura 35 muestra que TASIN-1 retrasa la entrada en la fase G1 en células DLD-1 después de la liberación de la sincronización de nocodazol.

Las Figuras 36 (a-z) y (aa) muestran espectros de RMN de compuestos ejemplificados.

Descripción detallada

La invención descrita puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción de las modalidades ilustrativas, tomadas en conjunto con las figuras y los dibujos adjuntos. Debería ser evidente para los expertos en la técnica que las modalidades descritas de la invención descrita proporcionadas en la presente son meramente ejemplares e ilustrativas y no limitantes.

Definiciones:

Varios términos usados a lo largo de esta especificación tendrán las definiciones establecidas en la presente descripción.

El término "gen de la poliposis adenomatosa coli" o "gen APC" o "APC" como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ADN de mamífero que codifica una proteína APC. Un ejemplo de un gen APC humano se encuentra en el cromosoma 5, 5q21-q22, GenBank: M74088.1. Los sinónimos para el gen APC humano incluyen: BTPS2, DP2, DP2.5, DP3, PPP1R46 y la "proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora 46". Un ejemplo de un gen APC de ratón se encuentra en el cromosoma 18 B1, MGI: 88039. Los sinónimos para el gen APC de ratón incluyen: CC2, Min, mAPC, AI0147805, AU020952 y AW124434.

El término "compuestos anticancerígenos", como se usa en la presente, se refiere a los compuestos de molécula pequeña que se dirigen selectivamente e inhiben la actividad biológica de las APC truncadas.

El término "proteína de poliposis adenomatosa coli" o "proteína APC" o "APC" como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de la proteína de mamífero de 2843 aminoácidos. Un ejemplo de una secuencia APC humana es GenBank: AAA03586. Un ejemplo de una secuencia APC de ratón es GenBank: AAB59632.

El término "truncamiento de APC" o "mutante de truncamiento de APC" o "mutación de truncamiento de APC" se refiere a un producto proteico truncado que resulta de una mutación que ocurre dentro del gen APC. Un truncamiento APC puede ser, por ejemplo, pero no se limita, a un producto de 1309 aminoácidos o un producto de 1450 aminoácidos.

El término "administrar" como se usa en la presente, incluye la administración *in vivo*, así como la administración directamente al tejido *ex vivo*. Generalmente, las composiciones pueden administrarse sistémicamente por vía oral, bucal, parenteral, tópica, por inhalación o insuflación (es decir, por la boca o por la nariz), o rectalmente en formulaciones de unidades de dosificación que contienen portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos, adyuvantes y portadores como deseado, o puede administrarse localmente por medios tales como, pero no se limitan a, la inyección, implantación, injerto, aplicación tópica o parenteralmente.

- Los términos "análogo" y "derivado" se usan indistintamente para significar un compuesto producido a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas. Un "derivado" o "análogo" de un compuesto retiene al menos un grado de la función deseada del compuesto de referencia. En consecuencia, un término alternativo para "derivado" puede ser "derivado funcional". Los derivados pueden incluir modificaciones químicas, como la alquilación, la acilación, la carbamilación, la yodación o cualquier modificación que deriva del compuesto. Dichas moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se han derivado para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formales. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres, amidas o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo o O-alquilo. El término "condición", como se usa en la presente, se refiere a una variedad de estados de salud y está destinado a incluir trastornos o enfermedades causadas por cualquier mecanismo subyacente o lesión. Las enfermedades asociadas con la APC incluyen, pero no se limitan, al cáncer de colon.
- El término "enfermedad" o "trastorno", como se usa en la presente, se refiere a un deterioro de la salud o una condición de funcionamiento anormal.
- El término "fármaco" como se usa en la presente, se refiere a un agente terapéutico o cualquier sustancia usada en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de la enfermedad.
- Como se usa en la presente, el término "actividad enzimática" se refiere a la cantidad del sustrato consumido (o producto formado) en un tiempo dado en las condiciones dadas. La actividad enzimática puede denominarse además como el "número de recambio".
- El término "inhibidor", como se usa en la presente, se refiere a reducir o modular la actividad química o biológica de una sustancia o compuesto.
- El término "lesión", como se usa en la presente, se refiere al daño o perjuicio a una estructura o función del cuerpo causada por un agente externo o fuerza, que puede ser física o química.
- El término "síndrome", como se usa en la presente, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de alguna enfermedad o afección.
- El término "agente terapéutico" como se usa en la presente, se refiere a un fármaco, molécula, ácido nucleico, proteína, metabolito, composición u otra sustancia que proporciona un efecto terapéutico. El término "activo" como se usa en la presente, se refiere al ingrediente, componente o constituyente de las composiciones de la invención descrita, responsables del efecto terapéutico pretendido. Los términos "agente terapéutico" y "agente activo" se usan indistintamente en la presente. El agente activo puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse al menos a uno de un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
- El término "modificar", como se usa en la presente, significa cambiar, variar, ajustar, templar, alterar, afectar o regular en cierta medida o proporción en uno o más detalles.
- El término "agente modificador" como se usa en la presente, se refiere a una sustancia, composición, extracto, ingrediente botánico, extracto botánico, constituyente botánico, componente terapéutico, constituyente activo, agente terapéutico, fármaco, metabolito, agente activo, proteína, componente no terapéutico, constituyente no activo, agente no terapéutico o agente no activo que reduce, disminuye en grado o extensión, o modera la forma, síntomas, signos, cualidades, carácter o propiedades de una condición, estado, trastorno, enfermedad, síntoma o síndrome.
- El término "modular" como se usa en la presente, significa regular, alterar, adaptar o ajustar a una determinada medida o proporción.
- El término "parenteral" como se usa en la presente, se refiere a la introducción en el cuerpo mediante una inyección (es decir, administración por inyección), que incluye, por ejemplo, por vía subcutánea (es decir, una inyección debajo de la piel), intramuscularmente (es decir, una inyección en un músculo); intravenosamente (es decir, una inyección en una vena), intratecalmente (es decir, una inyección en el espacio alrededor de la médula espinal o debajo de la membrana aracnoidea del cerebro), inyección intraesternal o técnicas de infusión. Una composición administrada parenteralmente se administra mediante el uso de una aguja, por ejemplo, una aguja quirúrgica. El término "aguja quirúrgica", como se usa en la presente, se refiere a cualquier aguja adaptada para el suministro de las composiciones fluidas (es decir, capaces de fluir) en una estructura anatómica seleccionada. Las preparaciones inyectables, tales como las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de agentes dispersantes o humectantes ejemplares y agentes de suspensión.
- El término "reduce" o "reducir" como se usa en la presente, se refiere a la aparición limitada de un trastorno en los individuos con riesgo de desarrollar el trastorno.

Como se usa en la presente, los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente" se usan indistintamente para referirse a un miembro de una especie animal de origen mamífero, que incluyen los humanos.

El término "síntoma", como se usa en la presente, se refiere a un fenómeno que surge y acompaña a una enfermedad o trastorno particular y sirve como una indicación de ello.

El término "componente terapéutico" como se usa en la presente, se refiere a una dosificación terapéuticamente efectiva (es decir, dosis y frecuencia de administración) que elimina, reduce o previene la progresión de una manifestación de la enfermedad particular en un porcentaje de una población. Un ejemplo de un componente terapéutico comúnmente usado es el ED50, que describe la dosis en una dosis particular que es terapéuticamente efectiva para una manifestación de una enfermedad en particular en el 50 % de una población.

El término "efecto terapéutico" como se usa en la presente, se refiere a una consecuencia del tratamiento, cuyos resultados se consideran deseables y beneficiosos. Un efecto terapéutico puede incluir, directa o indirectamente, el arresto, reducción o eliminación de una manifestación de la enfermedad. Un efecto terapéutico puede incluir, además, directa o indirectamente, la reducción de la detención o la eliminación de la progresión de una manifestación de la enfermedad.

Como se usa en la presente, el término "tópico" se refiere a la administración de una composición en, o inmediatamente debajo, del punto de la aplicación. La frase "aplicación tópica" describe la aplicación en una o más superficies que incluyen las superficies epiteliales. A pesar de que la administración tópica, en contraste con la administración transdérmica, generalmente proporciona un efecto local en lugar de un efecto sistémico, los términos "administración tópica" y "administración transdérmica" como se usan en la presente, a menos que se indique o implique de cualquier otra forma, se usan indistintamente.

Como se usa en la presente, el término "mutación" se refiere a un cambio de la secuencia de ADN dentro de un gen o cromosoma de un organismo que resulta en la creación de un nuevo carácter o rasgo que no se encuentra en el tipo parental, o el proceso por el cual dicho cambio ocurre en un cromosoma, ya sea a través de una alteración en la secuencia de los nucleótidos del ADN que codifica un gen o mediante un cambio en la disposición física de un cromosoma. Tres mecanismos de mutación incluyen la sustitución (intercambio de un par de bases por otro), la adición (la inserción de una o más bases en una secuencia) y la eliminación (pérdida de uno o más pares de bases).

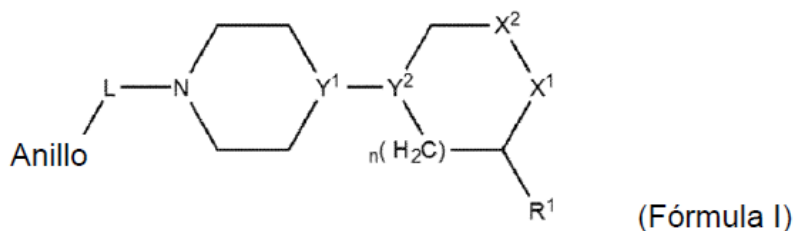
Los términos "mutantes" y "variantes" se usan indistintamente en la presente, para referirse a las secuencias de los nucleótidos con identidad sustancial a una secuencia de los nucleótidos de referencia. Las diferencias en las secuencias pueden ser el resultado de los cambios en la secuencia o la estructura, ya sea naturalmente o por diseño. Pueden surgir cambios naturales durante el curso de la replicación normal o la duplicación en la naturaleza de la secuencia particular del ácido nucleico. Los cambios diseñados pueden diseñarse específicamente e introducirse en la secuencia para fines específicos. Dichos cambios específicos pueden realizarse *in vitro* mediante el uso de una variedad de técnicas.

El término "composición farmacéutica" como se usa en la presente, se refiere a una preparación que comprende un producto farmacéutico, fármaco o ingrediente activo.

Como se usa en la presente, el término "tratar" incluye anular, inhibir, ralentizar o revertir sustancialmente la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos de una afección. El tratamiento adicional se refiere a lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar el desarrollo de los síntomas característicos de los trastornos que se están tratando; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos de los trastornos que se tratan; (d) limitar la recurrencia de los trastornos en los pacientes que han tenido previamente los trastornos; y (e) limitar la recurrencia de los síntomas en los pacientes que anteriormente eran asintomáticos para el trastorno(s). El término "condición", como se usa en la presente, se refiere a una variedad de estados de salud y está destinado a incluir los trastornos o las enfermedades causadas por cualquier mecanismo subyacente o trastorno en el que se expresa una proteína APC truncada. Un sujeto que lo necesita es un paciente que tiene o está en riesgo de tener un trastorno relacionado con la mutación APC.

Compuestos

En la presente se describe un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña de Fórmula I:



en donde:

Y¹ y Y² son cada uno independientemente CH o N;

L es SO₂, CO, CH₂, o CHMe;

X² se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CHR², NR³, O, S;

X¹ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CHR⁴, NR⁵, O, S;

n = 0, 1, 2

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₁₋₄, alquinilo C₁₋₄, CH₂arilo, CH₂heteroarilo

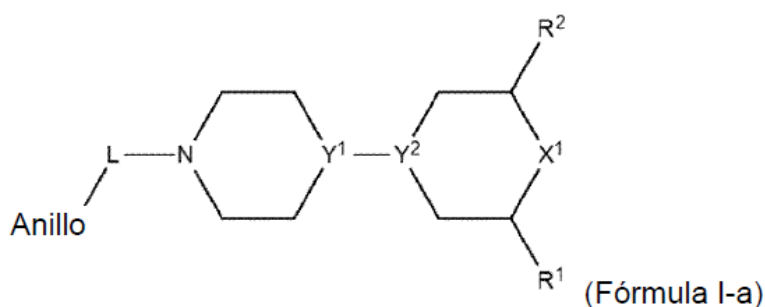
R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₁₋₆, alquinilo, arilo, heteroarilo, CH₂arilo, CH₂heteroarilo;

R³ puede formar un puente de metileno o etileno a uno de los otros átomos del anillo, proporcionando de este modo una estructura de anillo bicíclico; y el anillo conectado a L puede ser arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilarilo fundido, heterociclilarilo fundido, arilheterociclilo fundido, cicloalquilheteroarilo fundido, heterocicilheteroarilo fundido, heteroarilheterociclilo fundido;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

Ejemplos de los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña de fórmula I se encuentran en la Tabla A (SAR). Todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que existan centros estereogénicos.

Se describe un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña de Fórmula Ia:



en donde:

Y¹ y Y² son cada uno independientemente CH o N;

L es SO₂, CO, CH₂, o CHMe;

X¹ se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CHR⁴, NR⁵, O, S;

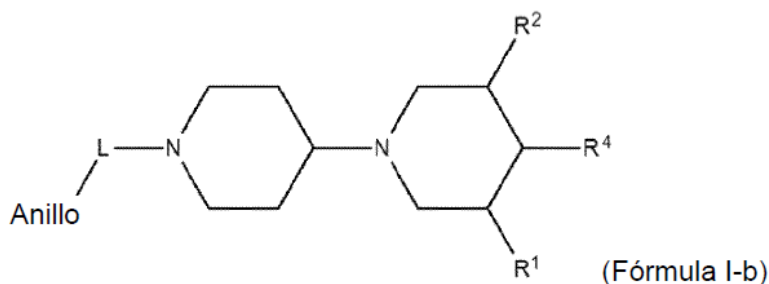
R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me;

R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₁₋₆, alquinilo C₁₋₆, alquenilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, CH₂arilo, CH₂heteroarilo;

el anillo que se conecta a L puede ser arilo, heteroarilo, heterociclilarilo fusionado;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

Se describe un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña de Fórmula I-b:



en donde:

L es SO₂, CO, CH₂, o CHMe

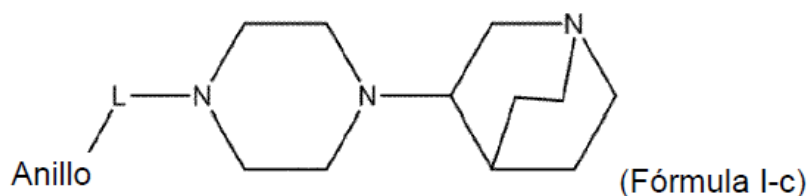
R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆; alquinilo C₁₋₆, arilo, CH₂arilo;

el anillo que se conecta a L puede ser arilo, heteroarilo, heterociclilarilo fusionado;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros esterogénicos presentes.

Un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña se representa por la Fórmula I-c:



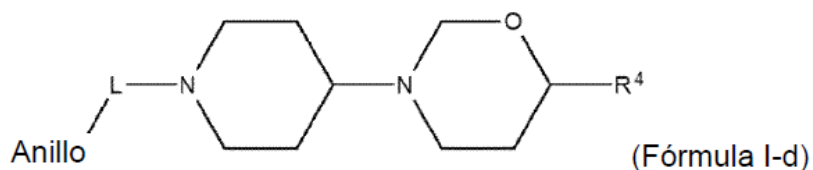
en donde:

L es SO₂, CH₂, o CHMe;

el anillo que se conecta a L puede ser arilo, heteroarilo, heterociclilarilo fusionado;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

Un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña se representa por la Fórmula I-d:



en donde:

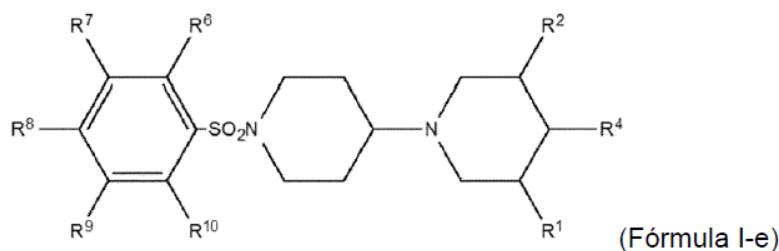
L es SO₂, CH₂, o CHMe;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆; alquinilo C₁₋₆, arilo, CH₂arilo;

el anillo que se conecta a L puede ser arilo, heteroarilo, heterociclilarilo fusionado;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

Un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña se representa por la Fórmula I-e:



en donde:

R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂arilo;

R⁶⁻¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, Me, Et, CF₃, ciclopropilo, isopropilo, terc-butilo, arilo, OMe, OCF₃, OCHF₂, OAril, CN, N₃, CO Arilo, CO₂H, CO₂R, CHO, CONH₂, CONR₂, CONHR. En el contexto de este párrafo, R se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₄, cicloalquilo C₁₋₄, arilo, CH₂Arilo, CH₂Heteroarilo;

de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-e, R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂aryl; R⁶⁻¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, Br, Me, Et, CF₃, ciclopropilo, isopropilo, arilo, OMe, OCF₃, OCHF₂, OArilo;

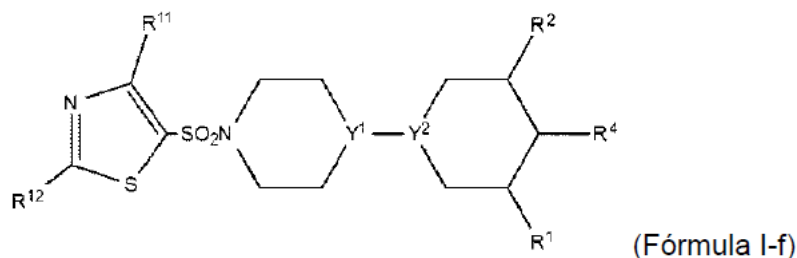
Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-e, R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂aryl; R⁶ es arilo, R⁷⁻¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, CF₃, Me, ciclopropilo, isopropilo, OMe, OCF₃, OCHF₂;

Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-e, R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂arilo; R⁷ es Arilo, R⁶, R⁸, R⁹ y R¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, CF₃, Me, ciclopropilo, isopropilo, OMe, OCF₃, OCHF₂;

Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-e, R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂aryl; R⁸ es Arilo, R⁶, R⁷, R⁹ y R¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, CF₃, Me, ciclopropilo, isopropilo, OMe, OCF₃, OCHF₂;

Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-e, R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂arilo; R⁷ es COArilo, R⁶, R⁸, R⁹ y R¹⁰ se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, CF₃, Me, ciclopropilo, isopropilo, OMe, OCF₃, OCHF₂;

Un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña se representa por la fórmula I-f:



en donde:

Y¹ y Y² son cada uno independientemente CH o N;

R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆; cicloalquilo C₁₋₆, alquienilo C₁₋₆, alquinilo C₁₋₆, CH₂arilo;

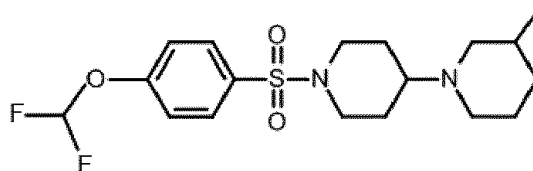
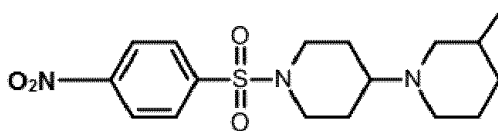
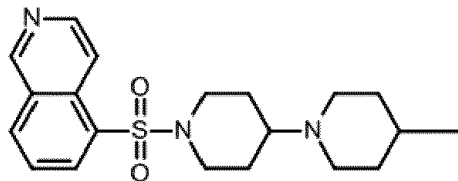
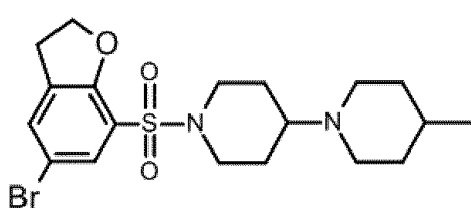
R¹¹ y R¹² se seleccionan cada uno independientemente de H, F, Cl, Br, Me, CF₃, ciclopropilo, arilo, heteroarilo;

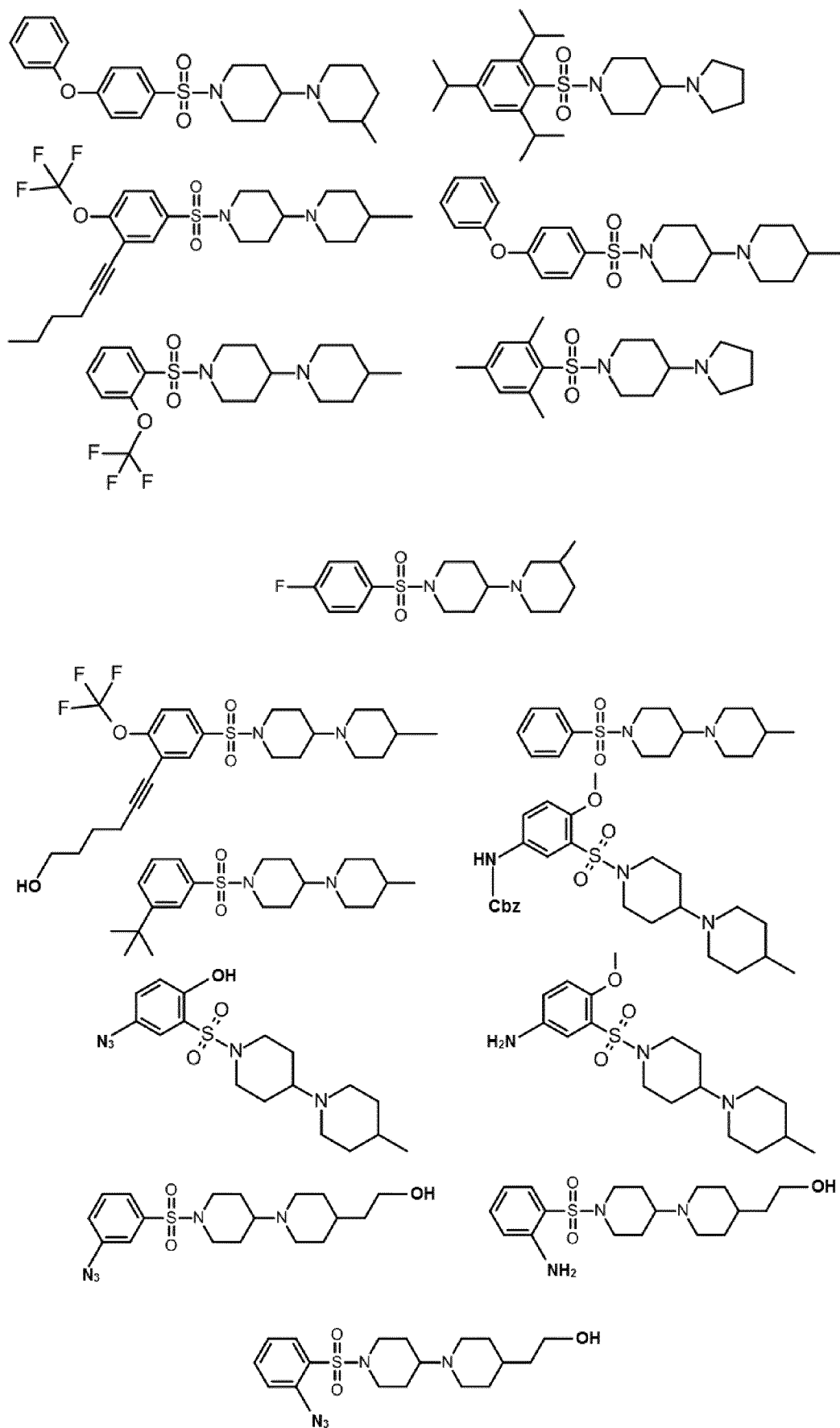
de modo que todos los estereoisómeros posibles, que incluyen los isómeros ópticamente activos, se incluyen siempre que haya centros estereogénicos presentes.

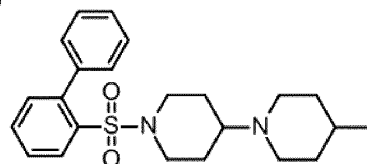
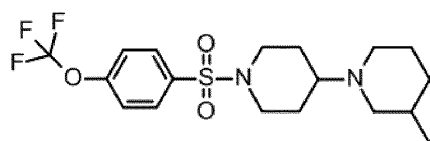
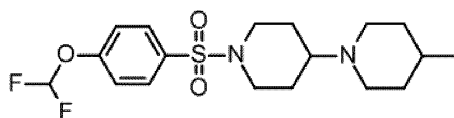
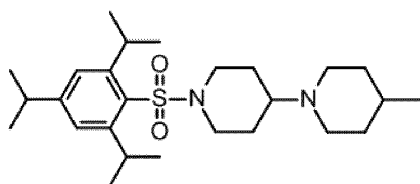
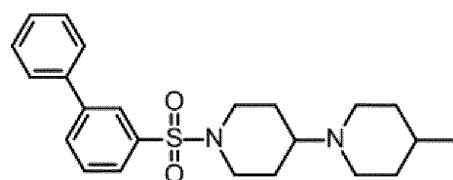
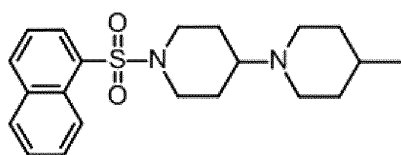
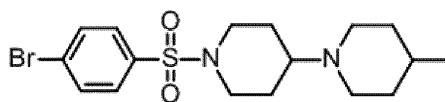
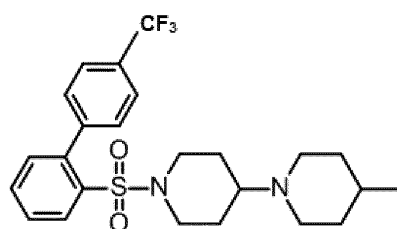
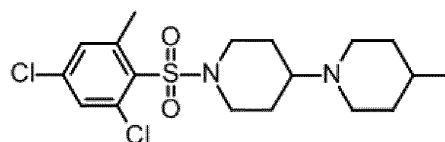
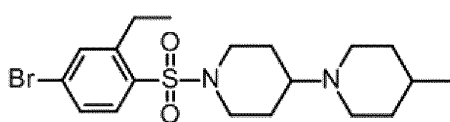
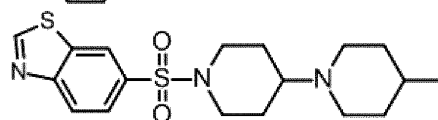
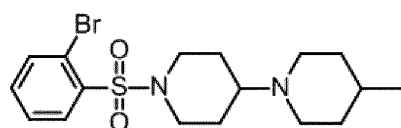
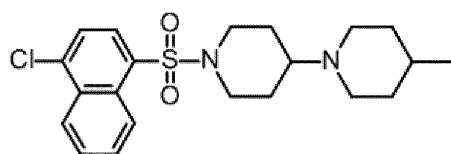
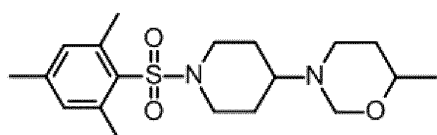
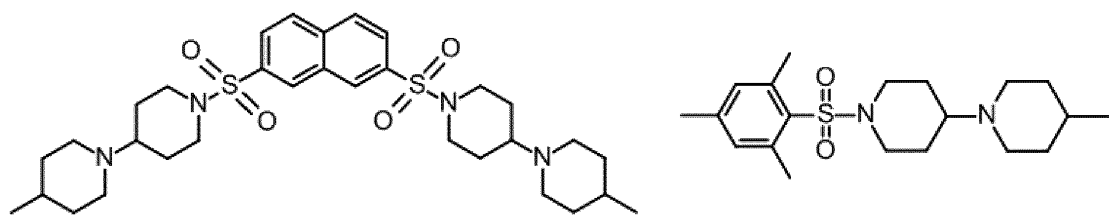
Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se representan por la Fórmula I-f, Y¹ es CH; Y² es N; R¹ y R² son cada uno independientemente H o Me; R⁴ se selecciona de H, Me, propargilo, isopropilo, ciclopropilo, CH₂arilo; R¹¹ es H, Me, CF₃, ciclopropilo, arilo; y R¹² se selecciona de H, F, Cl, CF₃, Arilo;

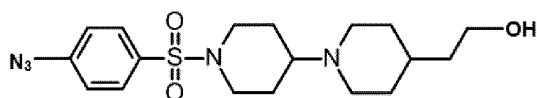
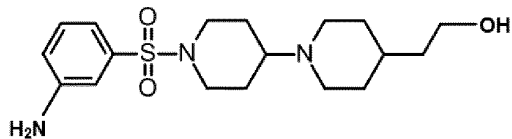
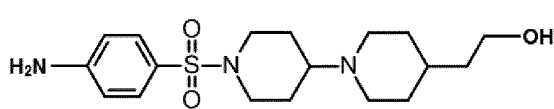
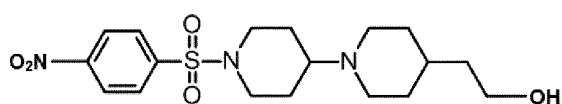
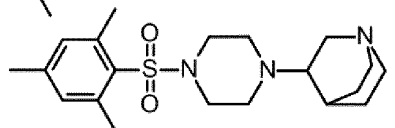
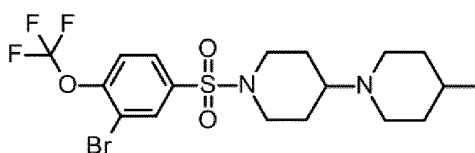
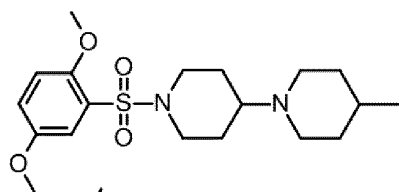
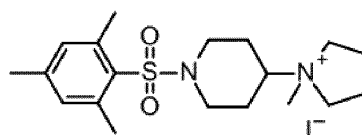
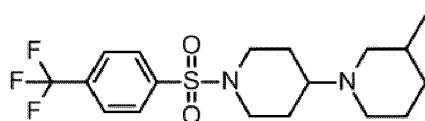
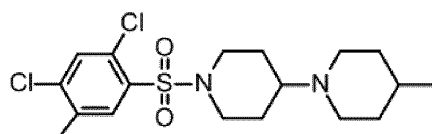
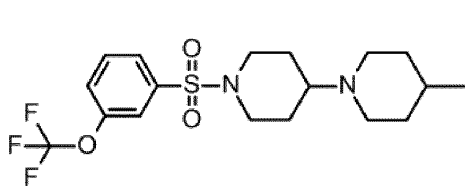
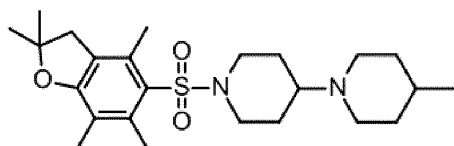
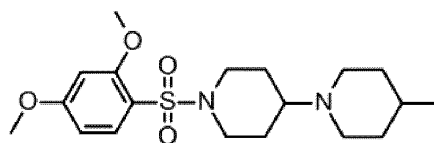
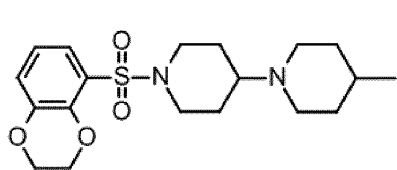
La presente invención se refiere a los compuestos específicos reivindicados en las reivindicaciones 1-6.

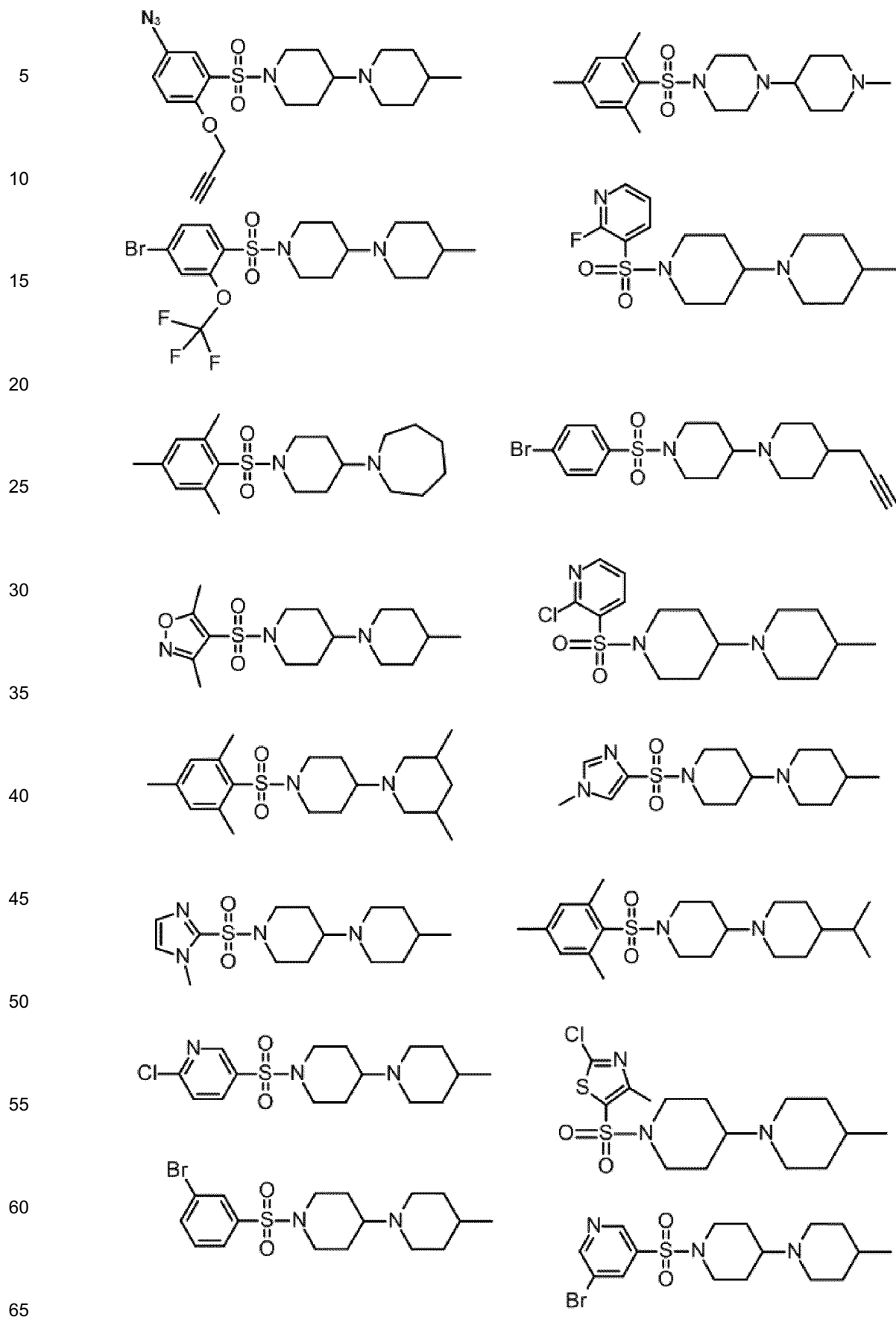
En una modalidad, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

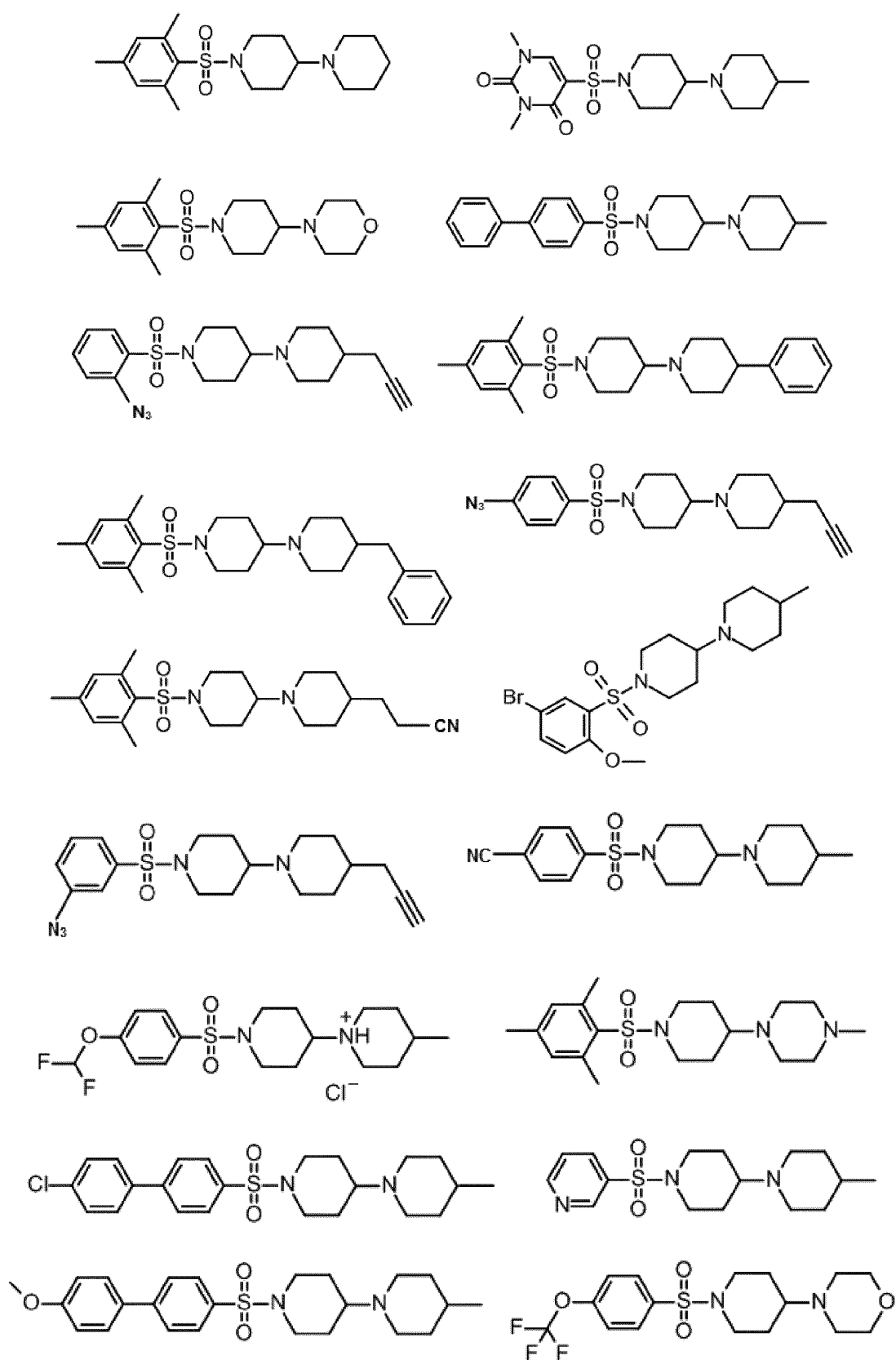


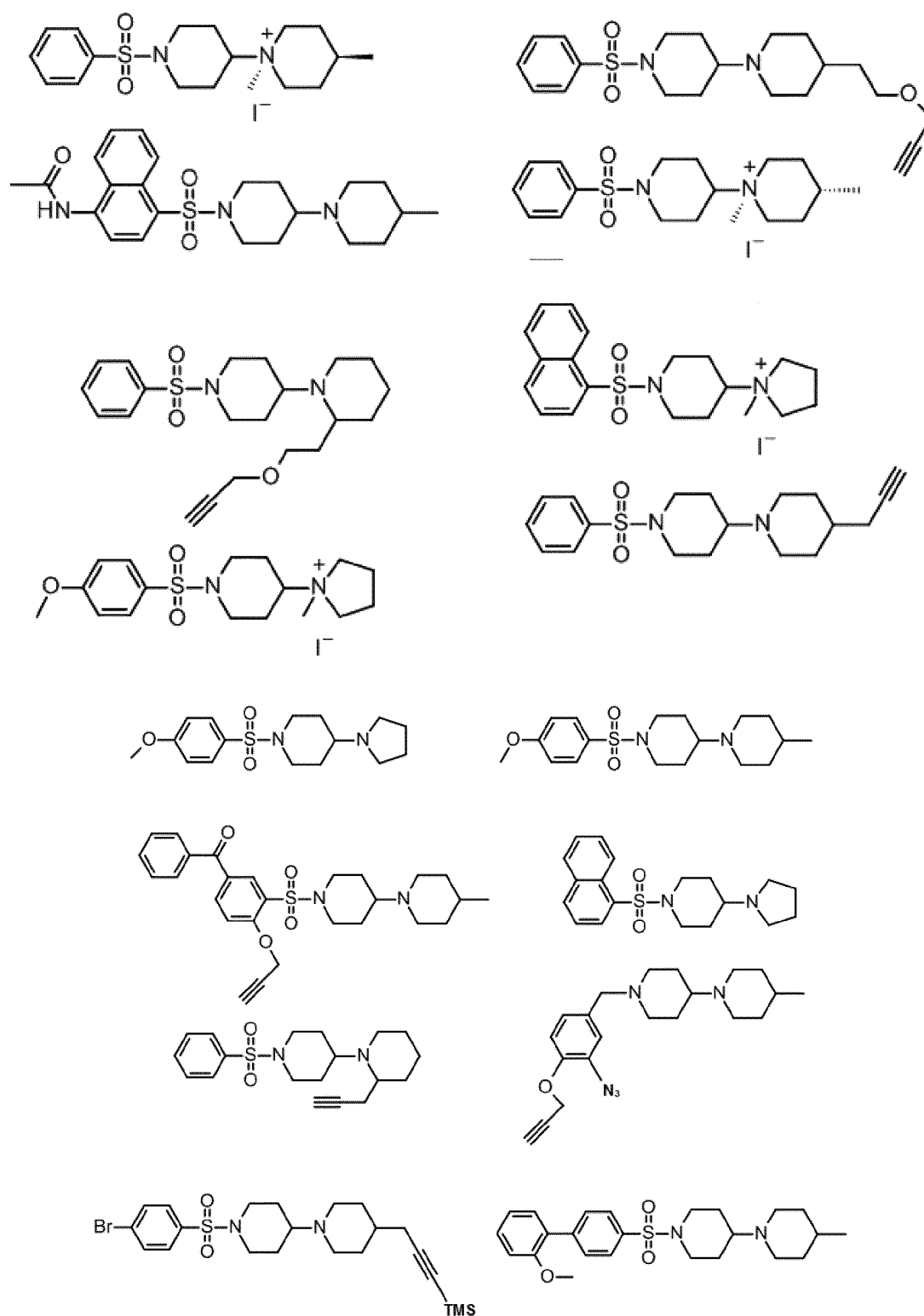


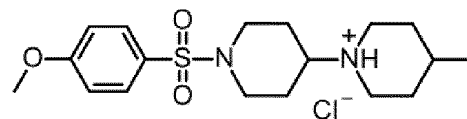
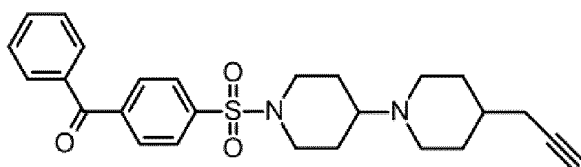
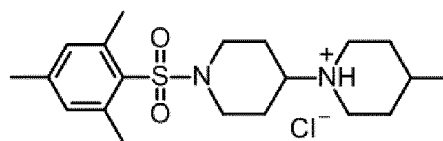
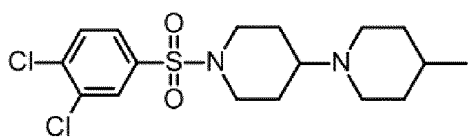
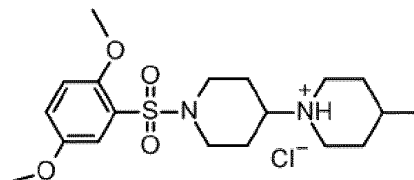
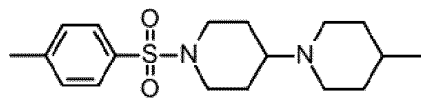
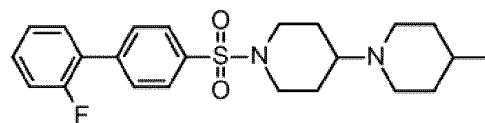
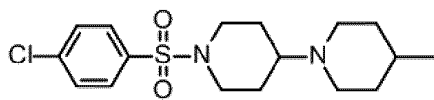






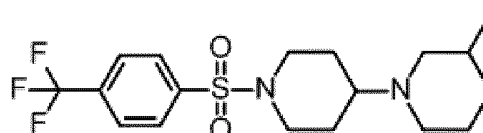
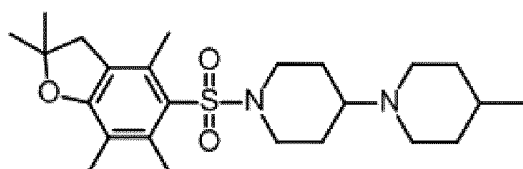
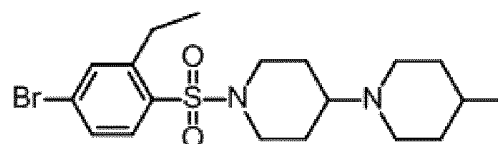
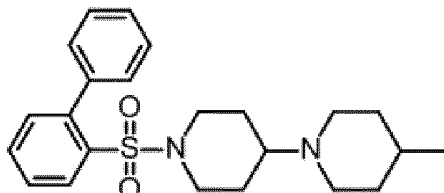
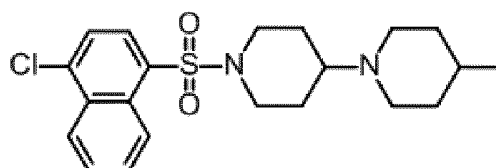
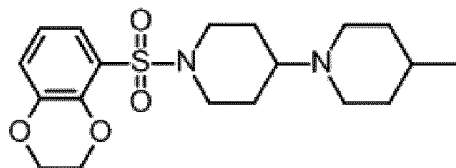
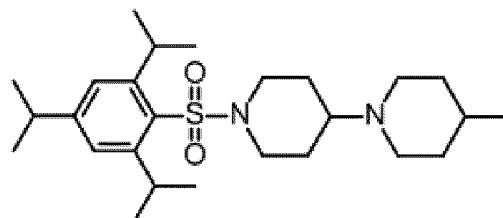
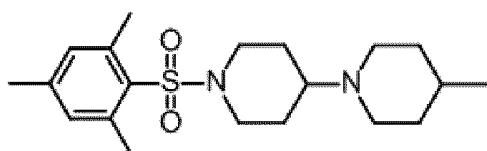


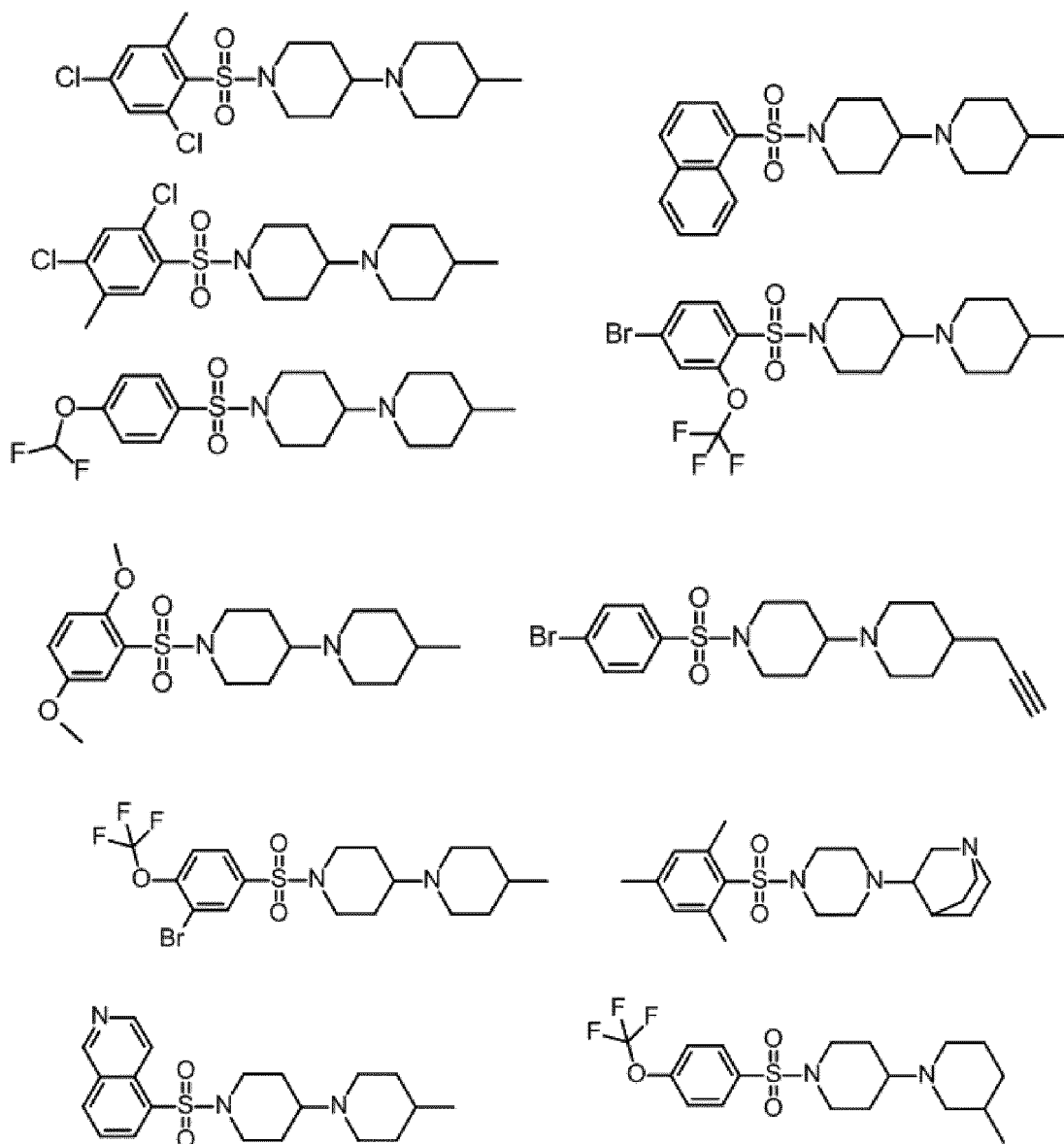


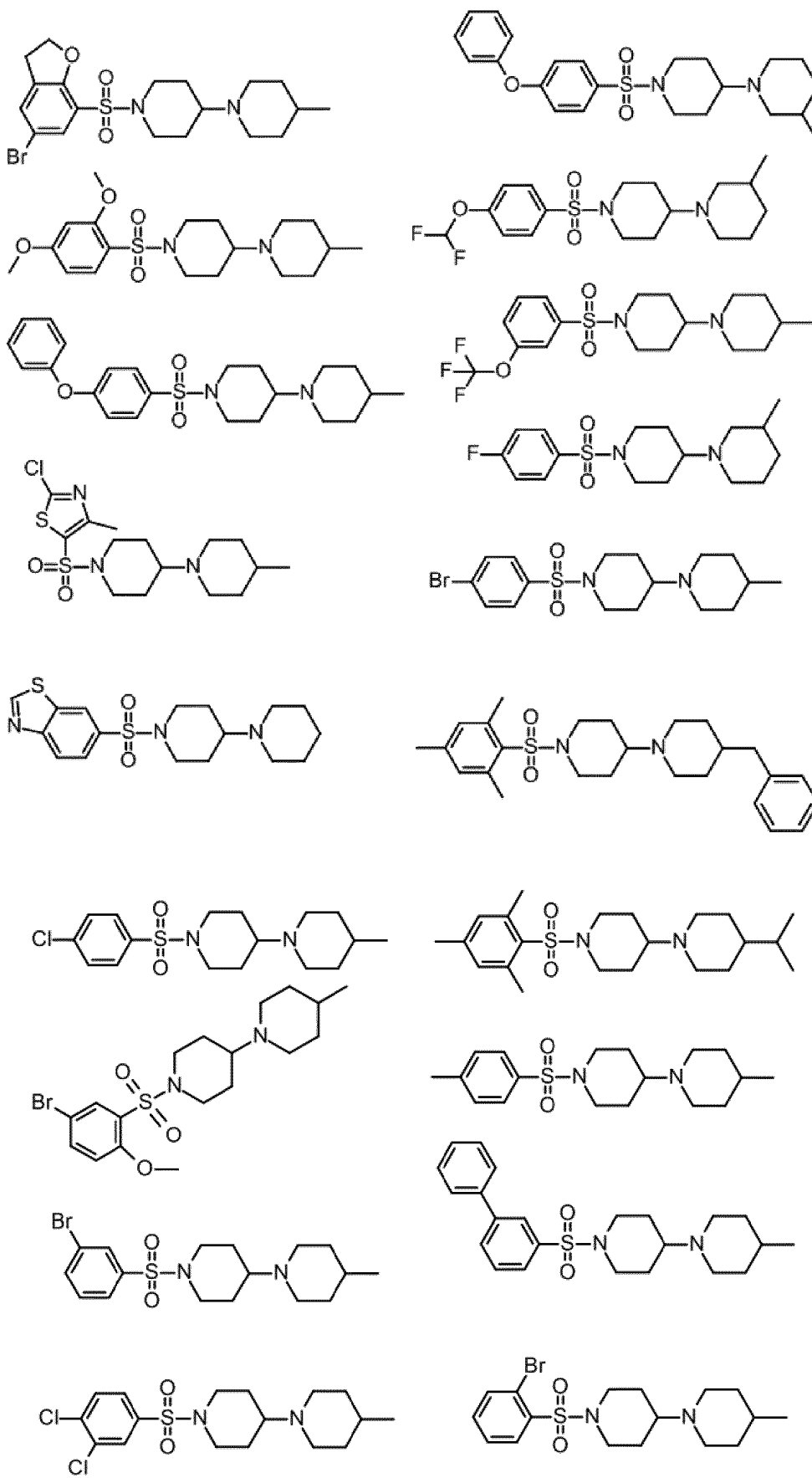


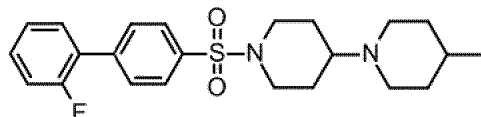
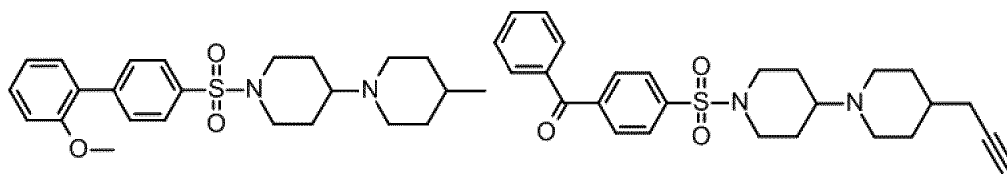
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:







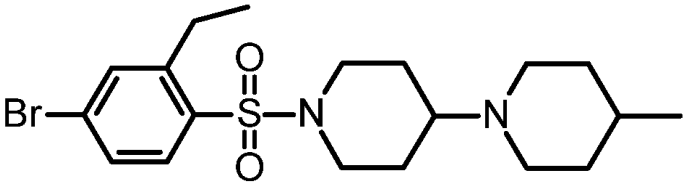
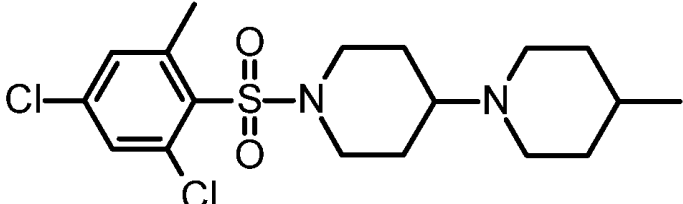
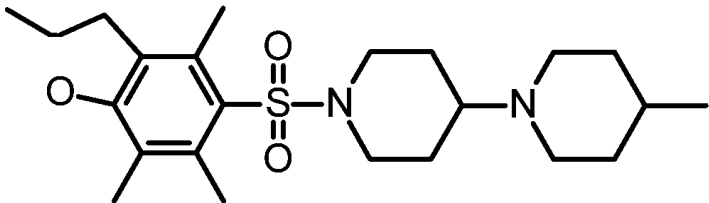
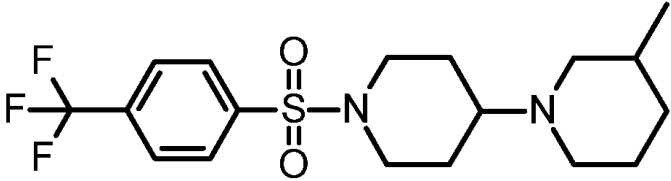
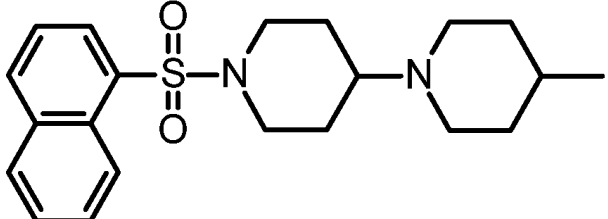
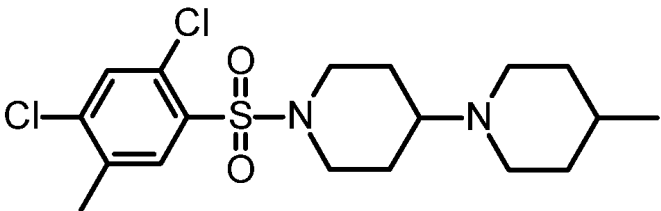
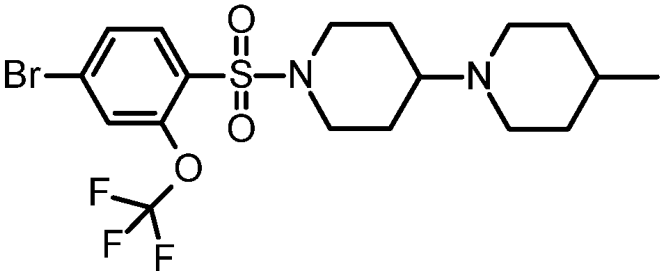


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

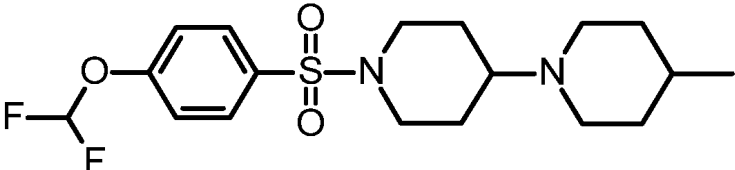
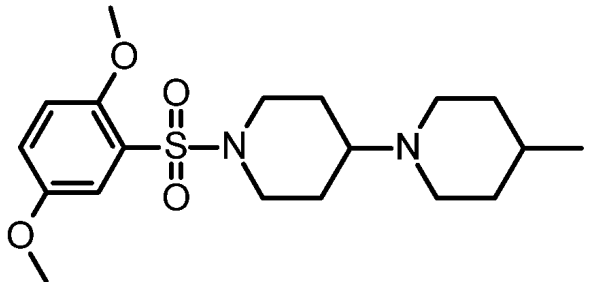
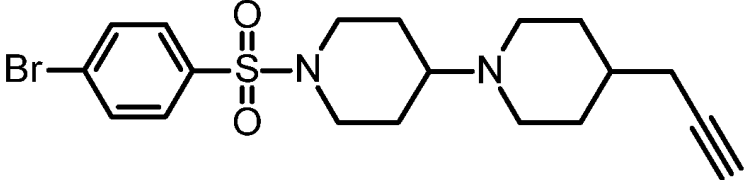
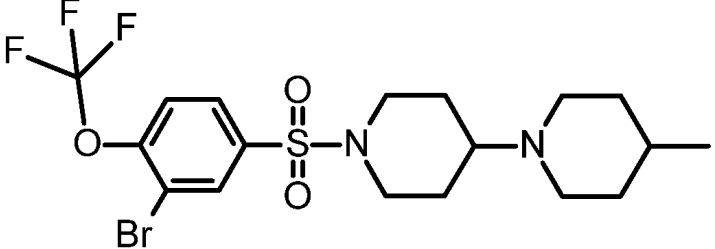
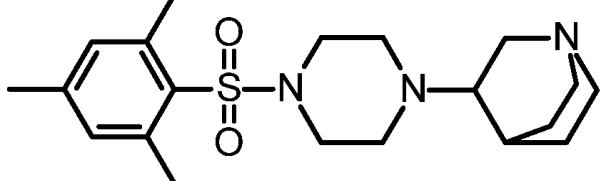
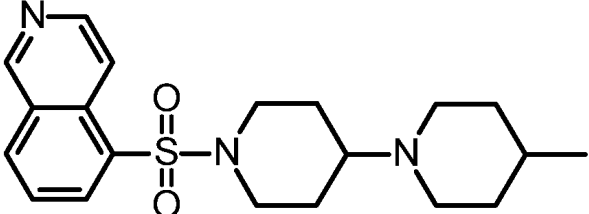
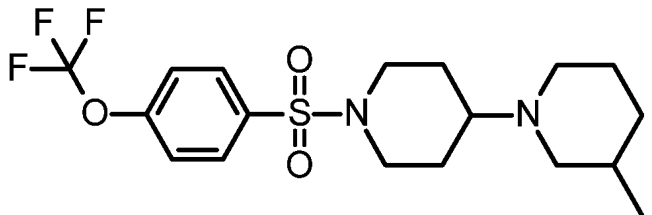
En otra modalidad, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes compuestos en los que el valor IC_{50} del compuesto en la célula DLD-1 es:

Compuesto	$IC_{50}(nM)$
	0,03
	0,7
	10
	0,1
	0,96

Continuación

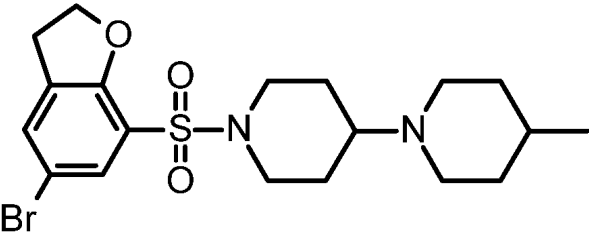
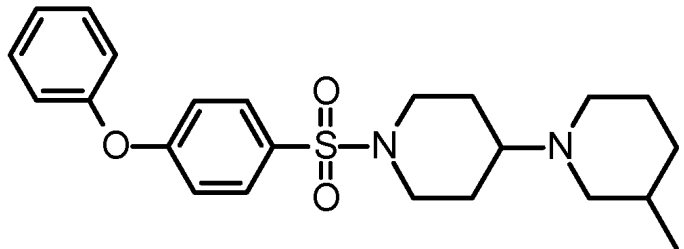
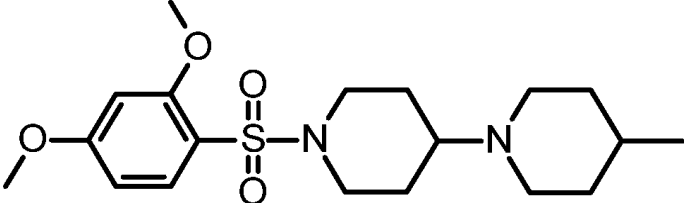
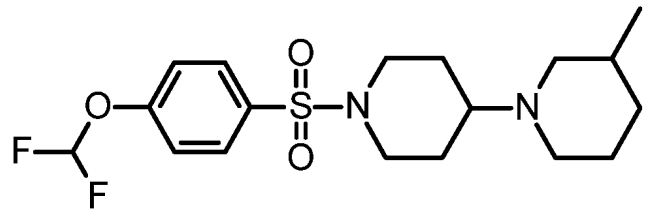
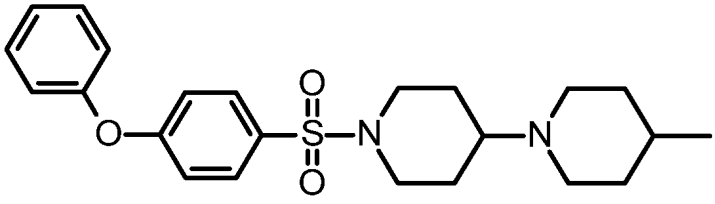
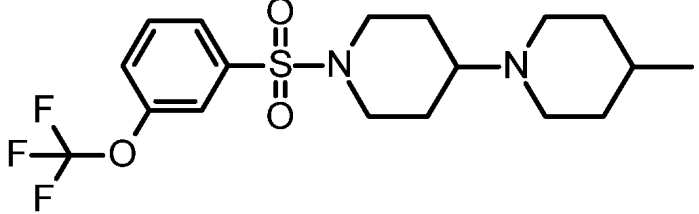
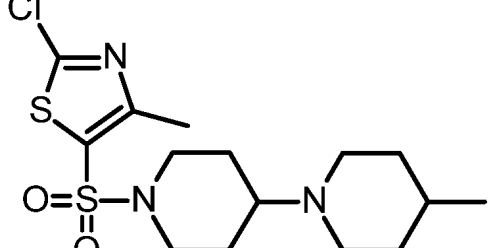
Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	0,6
	0,6
	1,2
	29
	0,65
	2
	5

Continuación

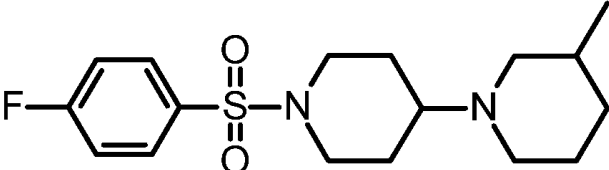
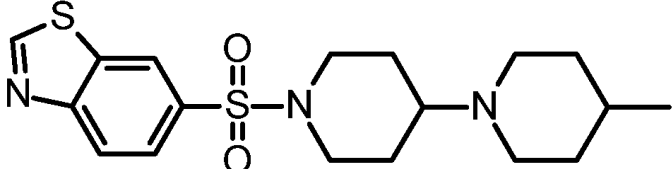
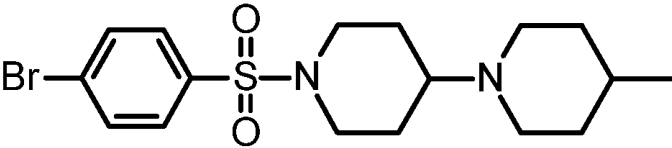
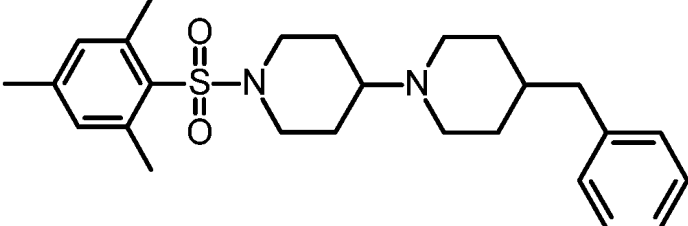
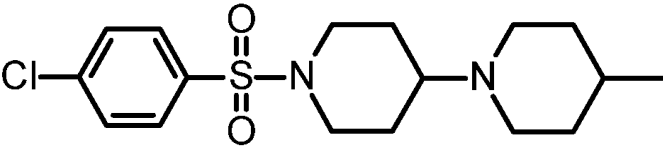
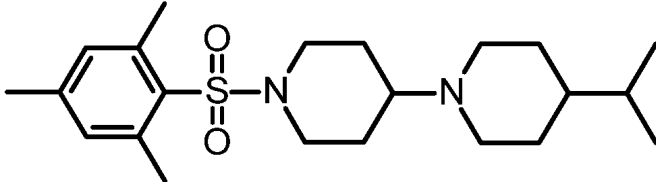
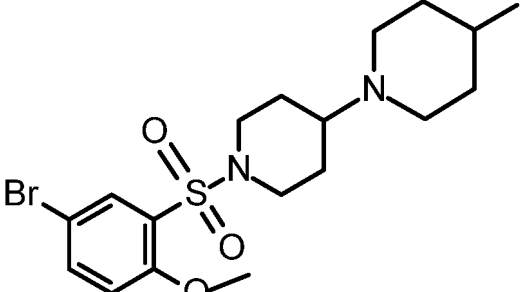
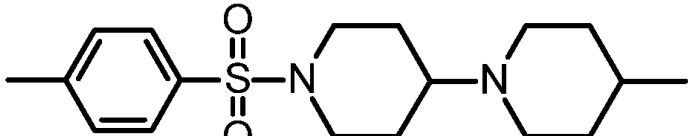
	Compuesto	IC ₅₀ (nM)
5		4,8
10		
15		4,5
20		
25		0,2
30		
35		29
40		
45		0,03
50		225
55		
60		31

65

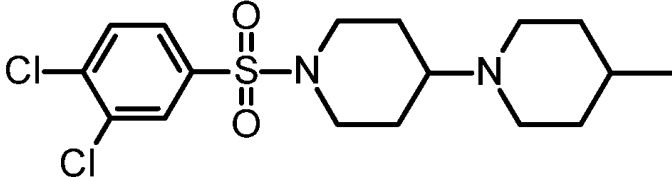
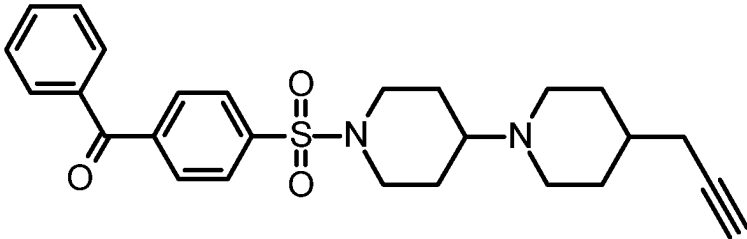
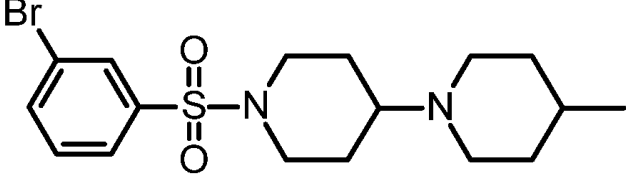
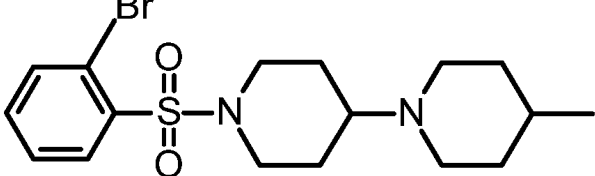
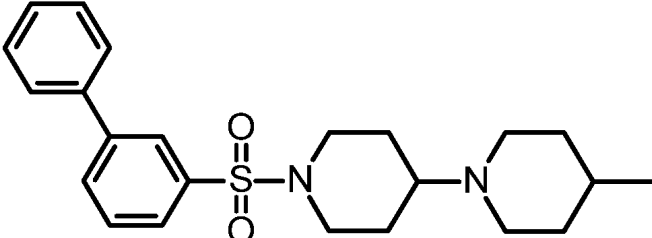
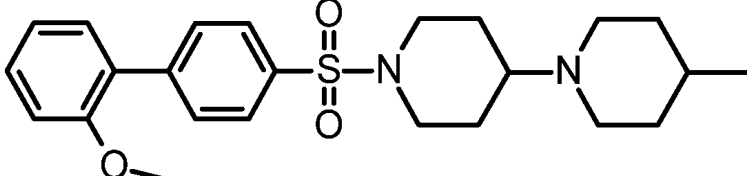
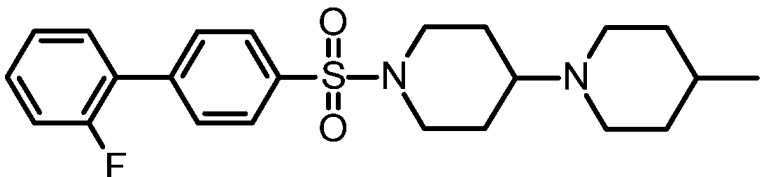
Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	96
	244
	41
	105
	253
	56
	1,6

Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	255
	38
	3,1
	3,5
	2,2
	0,3
	2
	9,1

Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	2,9
	4,8
	3,2
	3
	2
	26
	5

De acuerdo con una modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de los compuestos de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otra modalidad, dicha composición farmacéutica se usa para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación tumoral, inducir la muerte celular o una combinación de estos.

De acuerdo con otra modalidad, la presente invención se refiere a dicha composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer colorrectal en un individuo cuyas células epiteliales del colon expresan al menos una proteína APC truncada.

5 Sustituyentes Químicos y Estereoquímica

El término "alifático", como se usa en la presente, denota una disposición de cadena lineal o ramificada de átomos de carbono constituyentes, que incluyen, pero no se limitan a, parafinas (alcanos), que están saturadas, olefinas (alquenos o alcadienos), que son insaturadas, y acetilenos (alquinos), que contienen un triple enlace. En estructuras complejas, las cadenas pueden ser ramificadas o reticuladas.

El término "inferior", como se usa en la presente, se refiere a un grupo que tiene entre uno y seis carbonos.

Como se usa en la presente, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, o de los números de átomos de carbono especificados (por ejemplo, alquilo C₁₋₆) o cualquier número dentro de este intervalo. Está implícitamente implícito dentro del contexto de esta solicitud que tales grupos alquilo pueden opcionalmente sustituirse con sustituyentes tales como, pero sin limitarse al, halógeno, perfluoroalquilo, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior, cicloalquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, oxo, hidroxilo. Los ejemplos de "alquilo" como se usa en la presente, incluyen, pero no se limitan al, metilo, trifluorometilo, etilo, propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, isobutilo e isopropilo, metoximetilo, metoxietilo, isopropoxibutilo, propiniloetilo y similares.

El término "alqueno", como se usa en la presente, denota una cadena de hidrocarburo monovalente, lineal (no ramificada) o ramificada que tiene uno o más dobles enlaces en los que el doble enlace puede ser no conjugado o conjugado a otro grupo insaturado (por ejemplo, un alqueno poliinsaturado) y puede ser no sustituido o sustituido, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Puede estar opcionalmente sustituido con sustituyentes tales como, pero sin limitarse al, halógeno, perfluoroalquilo, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior, cicloalquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, oxo, hidroxilo. Por ejemplo, y sin limitarse al, alqueno puede ser vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo, 2-etilhexenilo, 2-propil-2-butenilo, 4-(2-metil-3-butenilo)-pentenilo, 6-metoxihexenilo, 2-trifluorometil-3-butenilo, y similares.

Como se usa en la presente, el término "alquino" se refiere a un radical hidrocarbonado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, opcionalmente sustituido con sustituyentes tales como, sin limitarse al, halógeno, perfluoroalquilo, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior, cicloalquilo inferior, alcoxi inferior, cicloalcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, oxo, hidroxilo.

El término "arilo", como se usa en la presente, se refiere a un anillo de benceno o a un sistema de anillo de benceno opcionalmente sustituido fusionado a uno o más anillos de benceno opcionalmente sustituido, permitiendo múltiples grados de sustitución. Los sustituyentes incluyen, pero no se limitan a, ciano, halógeno, perfluoroalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, oxo, hidroxilo, amino opcionalmente sustituido con alquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo o cicloalquilo, aminocarbonilo (-NRC(O)R) opcionalmente sustituido con alquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo o cicloalquilo, carboxi, acilo, aciloxi, alcoxycarbonilo, ariloxi, heteroariloxi, heterociclioxi, aroiloxi, heteroariloxi, heterociclioxi, alquilo o carbamilo opcionalmente sustituido con carbamilo cicloalquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo opcionalmente sustituido con alquilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo. Los ejemplos de arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, 2-naftilo, 1-naftilo, 1-antraceno y similares.

Debe entenderse que siempre que los términos "alquilo" o "arilo" o cualquiera de sus raíces prefijas aparezcan en el nombre de un sustituyente, deben interpretarse como que incluyen las limitaciones dadas anteriormente para alquilo y arilo. Los números designados de los átomos de carbono (*por ejemplo*, C₁₋₁₀) se referirán independientemente al número de átomos de carbono en una porción alquilo, alqueno o alquino o alquilo cíclico o a la porción alquilo de un sustituyente más grande en el que el término "alquilo" aparece como su prefijo raíz.

Como se usa en la presente, "cicloalquilo" (usado indistintamente con "cíclico alifático" en la presente) se refiere a una estructura de anillo monovalente, monocíclico o policíclico no aromático que tiene un total de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo (pero no heteroátomos) que posee opcionalmente uno o más grados de insaturación, opcionalmente sustituidos con sustituyentes tales como, sin limitarse al, halógeno, perfluoroalquilo, cicloalquilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, oxo, hidroxilo. "Cicloalquilo" incluye a modo de ejemplo al ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohehexenilo, adamantanilo, norbornilo, nobornenilo, cicloheptilo o ciclooctilo, y similares.

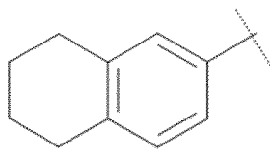
Los términos "heterociclo" y "heterocíclico", como se usan en la presente, se usan indistintamente para referirse a un anillo heterocíclico de tres a doce miembros que posee opcionalmente uno o más grados de insaturación, que contiene una o más sustituciones heteroatómicas seleccionadas de -S-, -SO-, -SO₂-, -O- o -N-, opcionalmente sustituido con sustituyentes, que incluyen, entre otros, nitrógeno, ciano, halógeno, perfluoroalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, alquilsulfenilo inferior, alquilsulfonilo inferior, oxo,

hidroxi, mercapto, amino opcionalmente sustituido con alquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo o cicloalquilo, aminocarbonilo (-NRC(O)R) opcionalmente sustituido por alquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo o cicloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, alcoxicarbonilo, ariloxi, heteroariloxi, heterociclioxi, aroiloxi, heteroaroiloxi, heterocicloiloxi, carbamoilo opcionalmente sustituido con alquilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo, aminosulfonilo
 5 opcionalmente sustituido por alquilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo, sililoxi opcionalmente sustituido por alquilo o arilo, sililo opcionalmente sustituido por alcoxi o alquilo o arilo, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Dicho anillo opcionalmente puede fusionarse con uno o más de otro anillo "heterocíclico". Los ejemplos de "heterocíclico" incluyen, pero no se limitan al, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, 3-pirrolina, pirrolidina, piridina, pirimidina, purina, quinolina, isoquinolina, carbazol, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxano,
 10 piperidina, pirrolidina, morfolina, piperazina y similares.

Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, piridilo, tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo
 azufre oxidado, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, thianaphthale- nyl,
 15 indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo,
 pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo,
 azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-tiadiazinilo-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo,
 isobenzofuranilo, crominilo, xantenilo, fenoxatiinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo,
 20 indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indolilo, purinilo, 4H-quinolicinilo, naftalasinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo,
 cinolinilo, pteridinilo, 4aH- carbazolilo, carbazolilo, beta-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo,
 fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo,
 pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo,
 oxindolilo, benzoxazolinilo, y isatinoilo.

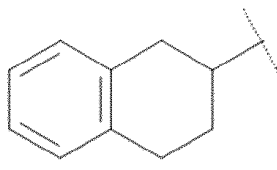
Como se usa en la presente, el término "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático de cinco a siete miembros, o a un
 25 anillo aromático heterocíclico policíclico, que contiene uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno o azufre, donde
 N-óxidos y monóxidos de azufre y dióxidos de azufre son sustituciones heteroaromáticas permitidas, opcionalmente
 sustituidas con sustituyentes que incluyen, pero no se limitan al, nitro, ciano, halógeno, perfluoroalquilo, arilo,
 heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, alquilsulfenilo inferior,
 30 alquilsulfonilo inferior, oxo, hidroxi, mercapto, amino opcionalmente sustituido con alquilo o arilo o heteroarilo o
 heterociclilo o cicloalquilo, aminocarbonilo (-NRC(O)R) opcionalmente sustituido por alquilo o arilo o heteroarilo o
 heterociclilo o cicloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, alcoxicarbonilo, ariloxi, heteroariloxi, heterociclioxi, aroiloxi,
 heteroaroiloxi, heterocicloiloxi, carbamoilo opcionalmente sustituido con alquilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o
 heterociclilo, amino sulfonilo opcionalmente sustituido por alquilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o heterociclilo,
 35 sililoxi opcionalmente sustituido por alquilo o arilo, sililo opcionalmente sustituido por alcoxi o alquilo o arilo,
 permitiéndose múltiples grados de sustitución. Para los sistemas de anillos aromáticos policíclicos, uno o más de los
 anillos pueden contener uno o más heteroátomos. Los ejemplos de "heteroarilo" usados en la presente, son furano,
 tiofeno, pirrol, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, tiazol, oxazol, isoxazol, oxadiazol, tiadiazol, isotiazol, piridina,
 piridazina, pirazina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, quinazolina, bensofuran, benzotiofeno, indol e indazol, y
 similares.

Como se usa en la presente, el término "cicloalquilarilo fusionado" se refiere a un grupo cicloalquilo fusionado a un
 grupo arilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo arilo es el punto de sustitución. Los ejemplos
 de "cicloalquilarilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al, 5-indanilo, 5,6,7,8-tetrahidro-2-
 naftilo,



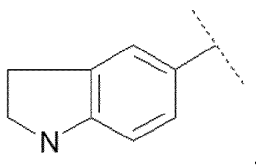
y similares.

Como se usa en la presente, el término "arilcicloalquilo fusionado" se refiere a un grupo arilo fusionado a un grupo
 55 cicloalquilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo cicloalquilo es el punto de sustitución. Los
 ejemplos de "arilcicloalquilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al, 1-indanilo, 2-indanilo, 1-
 (1,2,3,4-tetrahidronaftilo),



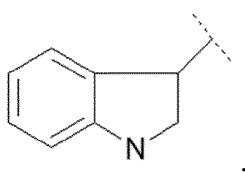
y similares.

Como se usa en la presente, el término "heterociclilarilo fusionado" se refiere a un grupo heterociclilo fusionado a un grupo arilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo arilo es el punto de sustitución. Los ejemplos de "heterociclilarilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al 3,4-metilendioxi-1-fenilo,



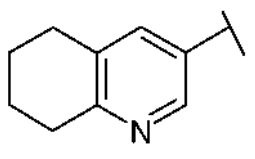
y similares.

Como se usa en la presente, el término "arilheterociclilo fusionado" se refiere a un grupo arilo fusionado a un grupo heterocíclico, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo heterocíclico es el punto de sustitución. Los ejemplos de "arilheterociclilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al 2-(1,3-benzodioxolilo),



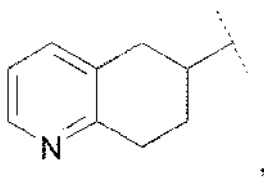
y similares.

Como se usa en la presente, el término "cicloalquilheteroarilo fusionado" se refiere a un grupo cicloalquilo fusionado a un grupo heteroarilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo heteroarilo es el punto de sustitución. Los ejemplos de "cicloalquilheteroarilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al 5-aza-6-indanilo,



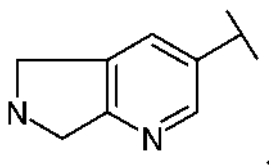
y similares.

Como se usa en la presente, el término "heteroarilcicloalquilo fusionado" se refiere a un grupo heteroarilo fusionado a un grupo cicloalquilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo cicloalquilo es el punto de sustitución. Los ejemplos de "heteroarilcicloalquilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al 5-aza-1-indanilo,



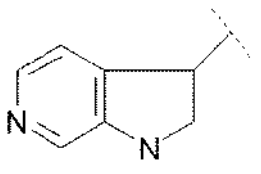
y similares.

Como se usa en la presente, el término "heterocicliheteroarilo fusionado" se refiere a un grupo heterociclilo fusionado a un grupo heteroarilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo heteroarilo es el punto de sustitución. Los ejemplos de "heterocicliheteroarilo fusionado" usados en la presente, incluyen, pero no se limitan al 1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolin-8-ilo,



y similares.

Como se usa en la presente, el término "heteroarilheterociclilo fusionado" se refiere a un grupo heteroarilo fusionado a un grupo heterociclilo, los dos tienen dos átomos en común, y en donde, el grupo heterociclilo es el punto de sustitución. Los ejemplos de "heteroarilheterociclilo fusionado" usados en la presente incluyen, pero no se limitan al -5-aza-2,3-dihidrobenzofuran-2-ilo,



y similares.

Como se usa en la presente, el término "enlace directo", donde parte de una especificación de la variable estructural, se refiere a la unión directa de los sustituyentes que flanquean (precediendo y sucediendo) la variable tomada como un "enlace directo".

Como se usa en la presente, el término "porción unida al O" significa una porción que se une a través de un átomo de oxígeno. De este modo, cuando un grupo R es una porción unida al O, ese R se une a través del oxígeno y, por lo tanto, puede ser un éter, un éster (por ejemplo, -- O--C(O)-alquilo opcionalmente sustituido), un carbonato o un carbamato (por ejemplo, --O--C(O)--NH₂ o --O--C(O)--NH-alquilo opcionalmente sustituido). Del mismo modo, el término "porción unida a S" significa una porción que se une a través de un átomo de azufre. De este modo, cuando un grupo R es una porción unida a S, ese R se une a través de azufre y, por lo tanto, puede ser un tioéter (por ejemplo, --S-alquilo opcionalmente sustituido), un tioéster (--S--C(O)-alquilo opcionalmente sustituido) o un disulfuro (por ejemplo, --S--S-alquilo opcionalmente sustituido). El término "porción unida a N" significa una porción que se une a través de un átomo de nitrógeno. De este modo, cuando un grupo R es una porción de N-ligados, el grupo R se une a través de nitrógeno y uno o más de estos, por lo tanto puede ser un N-ligado amino ácido tal como --NH--CH₂--COOH, un carbamato tal como --NH--C(O)--O-alquilo opcionalmente sustituido, una amina tal como -- NH-alquilo opcionalmente sustituido, una amida tal como --NH-C (O) -alquilo opcionalmente sustituido o --N₃. El término "porción que se une a C" significa una porción que se une a través de un átomo de carbono. Cuando uno o más grupos R se unen a través del carbono, uno o más de estos, de este modo puede ser alquilo opcionalmente sustituido, tal como --CH₂--CH₂--O--CH₃, --C(O)- alquil opcionalmente sustituido, hidroxialquilo, mercaptoalquilo, aminoalquilo o = CH-alquilo opcionalmente sustituido.

El término "alcoxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aO-, donde R_a es alquilo.

El término "alqueniloxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aO-, donde R_a es alquenilo.

El término "alquilinixi" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aO-, donde R_a es alquilino.

El término "alquilsulfanilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaS-, donde el R_a es alquilo.

El término "alquenilsulfanilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaS-, donde R_a es alquenilo.

El término "alquenilsulfanilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaS-, donde R_a es alquilino.

El término "alquilsulfenilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaS(O)-, donde R_a es alquilo.

El término "alquenilsulfenilo" como se usa en la presente, se refiere a grupo RaS(O)-, donde R_a es alquenilo.

El término "alquenilsulfenilo" como se usa en la presente, se refiere a grupo RaS(O)-, en donde R_a es alquilino.

El término "alquilsulfonilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aSO₂-, donde R_a es alquilo.

El término "alquenilsulfonilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aSO₂-, donde R_a es alquenilo.

El término "alquilinsulfonilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo R_aSO₂-, donde R_a es alquilino.

El término "arilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaC(O)-, donde R_a es alquilo, alquenilo, alquilino, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, heteroarilo, o heterociclilo.

El término "arilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo RaC(O)-, donde R_a es arilo.

El término "heteroarilo" tal como se usa en la presente, se refiere al grupo RaC(O)-, donde R_a es heteroarilo.

El término "heterocicloilo", como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aC(O)-$, donde R_a es heterociclilo.

El término "alcoxicarbonilo" como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aOC(O)-$, donde R_a es alquilo.

- 5 El término "aciloxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aC(O)O-$, donde R_a es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

El término "ariloxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aC(O)O-$, donde R_a es arilo.

- 10 El término "heteroariloxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aC(O)O-$, donde R_a es heteroarilo.

El término "heterocicloiloxi" como se usa en la presente, se refiere al grupo $R_aC(O)O-$, donde R_a es heterociclilo.

- 15 El término "sustituido" como se usa en la presente, se refiere a la sustitución con el sustituyente o sustituyentes nombrados, permitiéndose múltiples grados de sustitución a menos que se indique lo contrario.

- 20 Los términos "contener" o "que contiene" como se usa en la presente, pueden referirse a las sustituciones en línea en cualquier posición a lo largo de los sustituyentes alquilo, alquenilo, alquinilo o cicloalquilo definidos anteriormente con uno o más de cualquiera de O, S, SO, SO_2 , N o N-alquilo, que incluyen, por ejemplo, CH_2-O-CH_2 , $-CH_2-SO_2-CH_2$, $-CH_2-NH-CH_3$ y así sucesivamente.

El término "oxo" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $=O$.

- 25 El término "halógeno" o "halo" como se usa en la presente, incluye yodo, bromo, cloro y flúor.

El término "mercapto" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-SH$.

El término "carboxi" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-COOH$.

- 30 El término "ciano" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-CN$.

El término "aminosulfonilo" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-SO_2NH_2$.

- 35 El término "carbamoilo", como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $C(O)NH_2$.

El término "sulfanilo" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-S-$.

El término "sulfenilo" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-S(O)-$.

- 40 El término "sulfonilo" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-S(O)_2-$.

El término "etoxi" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-O-CH_2CH_3$.

- 45 El término "metoxi" como se usa en la presente, se refiere al sustituyente $-O-CH_3$.

Como se usa en la presente, el término "opcionalmente" significa que los eventos descritos posteriormente pueden o no ocurrir, e incluye tanto los eventos que ocurren como los eventos que no ocurren.

- 50 Los compuestos de la fórmula estructural I y las fórmulas la-f pueden contener uno o más centros asimétricos y, de este modo, pueden aparecer como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, mezclas diastereoméricas y diastereómeros individuales. La presente invención pretende comprender todas esas formas isoméricas de los compuestos de la fórmula estructural I y las fórmulas la-f.

- 55 Los compuestos de la fórmula estructural I y las fórmulas la-f pueden separarse en sus diastereoisómeros individuales mediante, por ejemplo, cristalización fraccionada de un disolvente adecuado, por ejemplo metanol o acetato de etilo o una mezcla de estos, o mediante la cromatografía quiral mediante el uso de una fase estacionaria ópticamente activa. La estereoquímica absoluta puede determinarse mediante cristalografía de rayos X de productos cristalinos o intermedios cristalinos que se derivan, si es necesario, con un reactivo que contiene un centro asimétrico de configuración absoluta conocida.

- 60 Como alternativa, cualquier estereoisómero de un compuesto de la fórmula estructural general I y las fórmulas la-f puede obtenerse mediante síntesis estereo específica mediante el uso de los materiales de partida ópticamente puros o los reactivos de la configuración absoluta conocida.

- 65 Si se desea, las mezclas racémicas de los compuestos pueden separarse de modo que los enantiómeros individuales estén aislados. La separación puede llevarse a cabo mediante los métodos bien conocidos en la técnica, como el

acoplamiento de una mezcla racémica de los compuestos a un compuesto enantioméricamente puro para formar una mezcla diastereomérica, seguido de la separación de los diastereómeros individuales por los métodos estándar, como la cristalización fraccionada o la cromatografía. La reacción de acoplamiento es a menudo la formación de sales mediante el uso de un ácido o base enantioméricamente puro. Los derivados diastereoméricos pueden convertirse luego en enantiómeros puros mediante la escisión del residuo quiral añadido. La mezcla racémica de los compuestos puede separarse además directamente por los métodos cromatográficos que utilizan fases estacionarias quirales, los métodos que son bien conocidos en la técnica.

Algunos de los compuestos descritos en la presente, contienen dobles enlaces olefínicos y, a menos que se especifique lo contrario, pretenden incluir los isómeros geométricos E y Z.

Algunos de los compuestos descritos en la presente, pueden existir como tautómeros, que tienen diferentes puntos de unión de hidrógeno acompañados de uno o más cambios de doble enlace. Por ejemplo, una cetona y su forma enol son tautómeros ceto-enol. Los tautómeros individuales, así como sus mezclas, están incluidos en los compuestos de la presente invención.

En los compuestos de Fórmula I genérica y fórmulas la-f, los átomos pueden exhibir sus abundancias isotópicas naturales, o uno o más de los átomos pueden enriquecerse artificialmente en un isótopo particular que tenga el mismo número atómico, pero una masa o número de masa atómica diferente de la masa atómica o número de masa que se encuentra predominantemente en la naturaleza. La presente invención pretende incluir todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos de fórmula I genérica y las fórmulas la-g. Por ejemplo, las diferentes formas isotópicas de hidrógeno (H) incluyen protio (1H) y deuterio (2H). El protio es el isótopo del hidrógeno predominante que se encuentra en la naturaleza. Enriquecer el deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas, como aumentar la vida media in vivo o reducir los requisitos de dosificación, o puede proporcionar un compuesto útil como estándar para la caracterización de las muestras biológicas. Los compuestos enriquecidos isotópicamente dentro de la fórmula I genérica y las fórmulas la-f pueden prepararse sin experimentación indebida por las técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica o por los procesos análogos a los descritos en los Esquemas y Ejemplos en la presente, mediante el uso de los reactivos enriquecidos isotópicamente apropiados y/o intermedios.

Se entenderá que, como se usa en la presente, las referencias a los compuestos de la fórmula estructural I y las fórmulas la-f pretenden incluir además las sales farmacéuticamente aceptables, y también las sales que no son farmacéuticamente aceptables cuando se usan como precursores de los compuestos libres o sus sales farmacéuticamente aceptables o en otras manipulaciones sintéticas.

Composiciones

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña y un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "activo" como se usa en la presente, se refiere a tener actividad o efecto farmacológico o biológico. El término "ingrediente activo" ("AI", "ingrediente farmacéutico activo" o "activo en masa") es la sustancia en un medicamento que es farmacéuticamente activa.

Los términos "formulación" y "composición" se usan indistintamente en la presente, para referirse a un producto de la invención descrita que comprende todos los ingredientes activos e inertes. Los términos "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica" como se usan en la presente, se refieren a una formulación o composición que se emplea para prevenir, reducir en intensidad, curar o tratar de otra manera una afección o enfermedad objetivo.

Como se usa en la presente, el término "aglutinante" se refiere a las sustancias que unen o "aglutinan" polvos y los hacen cohesivos formando gránulos, sirviendo de este modo como el "adhesivo" en la formulación. Los aglutinantes agregan resistencia cohesiva ya disponible en el diluyente o el agente de carga. Los aglutinantes ejemplares incluyen azúcares tales como la sacarosa; almidones derivados de trigo, maíz, arroz y papa; gomas naturales como acacia, gelatina y tragacanto; derivados de algas tales como ácido alginico, alginato de sodio y alginato de calcio y amonio; materiales celulósicos tales como la metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio e hidroxipropilmetilcelulosa; polivinilpirrolidona; e inorgánicos tales como el silicato de aluminio y magnesio. La cantidad del aglutinante en la composición puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 % en peso de la composición, con mayor preferencia de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 % en peso, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 % en peso.

Como se usa en la presente, el término "biodisponibilidad" se refiere a la velocidad y el grado en que el ingrediente activo del fármaco o la porción terapéutica se absorbe en la circulación sistémica desde una forma de dosificación administrada en comparación con un estándar o control.

Como se usa en la presente, el término "cápsula" se refiere a un contenedor especial o recinto hecho de metilcelulosa, alcoholes polivinílicos o gelatinas desnaturalizadas o almidón para almacenar o contener composiciones que comprenden los ingredientes activos. Las cápsulas de cubierta dura están hechas típicamente de mezclas de gelatinas

de piel de cerdo y hueso con una fuerza de gel relativamente alta. La cápsula en sí puede contener pequeñas cantidades de colorantes, agentes opacantes, plastificantes y conservantes.

5 Como se usa en la presente, el término "agentes colorantes" se refiere a los excipientes que proporcionan coloración a la composición o la forma de dosificación. Tales excipientes pueden incluir tintes de calidad alimentaria y tintes de calidad alimentaria adsorbidos en un adsorbente ejemplar tal como la arcilla u el óxido de aluminio. La cantidad del agente colorante puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % en peso de la composición, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 %.

10 Como se usa en la presente, el término "diluyente" se refiere a las sustancias que generalmente constituyen la mayor parte de la composición o la forma de dosificación. Los diluyentes ejemplares incluyen azúcares tales como la lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; almidones derivados del trigo, maíz, arroz y papa; y las celulosas tales como la celulosa microcristalina. La cantidad del diluyente en la composición puede variar de aproximadamente 10 a aproximadamente el 90 % en peso de la composición total, preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 %, con mayor preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 % en peso, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 12 a aproximadamente el 60 %.

20 Como se usa en la presente, el término "desintegrante" se refiere a los materiales añadidos a la composición para ayudarla a separarse (desintegrarse) y liberar los medicamentos. Los desintegrantes ejemplares incluyen almidones; almidones modificados "solubles en agua fría" tales como el carboximetil almidón de sodio; gomas naturales y sintéticas tales como del algarrobo, karaya, guar, tragacanto y agar; derivados de la celulosa tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio; celulosas microcristalinas y celulosas microcristalinas reticuladas tales como croscarmelosa de sodio; alginatos tales como ácido alginico y alginato de sodio; arcillas como las bentonitas; y las mezclas efervescentes. La cantidad de desintegrante en la composición puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 % en peso de la composición, con mayor preferencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 % en peso.

30 Como se usa en la presente, el término "deslizante" se refiere al material que evita el apelmazamiento y mejora las características del flujo de las granulaciones, de modo que el flujo es suave y uniforme. Deslizantes ilustrativos incluyen al dióxido de silicio y el talco. La cantidad del deslizante en la composición puede oscilar de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % en peso de la composición total, en la presente preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 % en peso.

35 Como se usa en la presente, el término "lubricante" se refiere a una sustancia añadida a la forma de dosificación para permitir que la tableta, los gránulos, etc., después de comprimirse, se libere del molde o muera reduciendo la fricción o el desgaste. Los lubricantes ejemplares incluyen estearatos metálicos tales como el estearato de magnesio, estearato de calcio o estearato de potasio; ácido esteárico; ceras de alto punto de fusión; y lubricantes solubles en agua tales como el cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicoles y d'l-leucina. Los lubricantes generalmente se agregan en la última etapa antes de la compresión, ya que deben estar presentes en las superficies de los gránulos y entre ellos y las partes de la prensa de las tabletas. La cantidad del lubricante en la composición puede variar de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 % en peso de la composición, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 %, con mayor preferencia de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,5 % en peso.

45 Como se usa en la presente, el término "gel oral" se refiere a los ingredientes activos dispersos o solubilizados en una matriz semisólida hidrofóbica.

50 Como se usa en la presente, el término "tableta" se refiere a una forma de dosificación sólida comprimida o moldeada que contiene los ingredientes activos con diluyentes adecuados. La tableta puede prepararse por compresión de las mezclas o las granulaciones obtenidas por granulación en húmedo, granulación en seco o por compactación.

55 Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéutica" se refiere a la cantidad de un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en la presente, al elegir entre los diversos compuestos activos y los factores de pesaje como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no causa toxicidad sustancial y, sin embargo, es eficaz para tratar al individuo en particular. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar en dependencia de los factores tales como la enfermedad o la afección a tratar, el compuesto particular descrito, el tamaño del individuo o la gravedad de la enfermedad o la afección. Un experto en la materia puede determinar empíricamente la cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto particular descrito y/u otro agente terapéutico sin necesidad de experimentación excesiva. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con algún criterio médico. Los términos "dosis" y "dosificación" se usan indistintamente en la presente.

65 Para cualquier compuesto descrito en la presente, la cantidad terapéuticamente efectiva puede determinarse inicialmente a partir de los estudios preliminares *in vitro* y/o en los modelos animales. Una dosis terapéuticamente

efectiva puede determinarse además a partir de los datos humanos para los compuestos de la estructura general I y las estructuras la-f. La dosis aplicada puede ajustarse en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para lograr la máxima eficacia en base a los métodos descritos anteriormente y otros métodos que son bien conocidos en la técnica, están dentro de las capacidades del técnico con experiencia.

Las formulaciones de los inhibidores pueden administrarse en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos.

De acuerdo con otra modalidad, las composiciones de la invención descrita pueden incluir además uno o más ingredientes activos compatibles adicionales. "Compatible", como se usa en la presente, significa que los componentes de dicha composición pueden combinarse entre sí de tal manera que no haya interacción que reduzca sustancialmente la eficacia de la composición en condiciones de uso ordinarias. Como se usa en la presente, la frase "ingrediente activo adicional" se refiere a un agente, distinto de los compuestos anticancerígenos de la composición descrita, que ejerce una actividad farmacológica o cualquier otra actividad beneficiosa. Los ejemplos no limitantes de tales agentes terapéuticos adicionales incluyen, sin limitarse al, 5-fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino, capecitabina, leucovorina, irinotecán, capecitabina, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, panitumumab o una combinación de estos.

Portador farmacéuticamente aceptable

El término "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, se refiere a uno o más rellenos sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles que son ejemplares para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término "portador", como se usa en la presente, se refiere a un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. De acuerdo con algunas modalidades, el portador puede ser inerte o puede poseer beneficios farmacéuticos.

Los componentes de las composiciones farmacéuticas pueden mezclarse además de tal manera que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

El portador puede ser líquido o sólido y se selecciona teniendo en cuenta la forma de administración planificada para proporcionar el volumen, la consistencia, etc., deseados, cuando se combina con un componente activo y otros componentes de una composición dada.

Administración

Para usar en terapia, puede administrarse una cantidad terapéutica de un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña a un individuo por cualquier modo. La administración de la composición farmacéutica puede realizarse por cualquier medio conocido por un técnico con experiencia. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral oral, bucal, tópica, por inhalación o insuflación (es decir, por la boca o por la nariz) o rectal.

El término "parenteral" como se usa en la presente, se refiere a la introducción en el cuerpo mediante una inyección (es decir, administración por inyección), que incluye, por ejemplo, por vía subcutánea (es decir, una inyección debajo de la piel), intramuscularmente (es decir, una inyección en un músculo); por vía intravenosa (es decir, una inyección en una vena), intratecalmente (es decir, una inyección en el espacio alrededor de la médula espinal), inyección intraesternal o técnicas de infusión. Una composición administrada parenteralmente de la presente invención se administra mediante el uso de una aguja, por ejemplo, una aguja quirúrgica. El término "aguja quirúrgica", como se usa en la presente, se refiere a cualquier aguja adaptada para el suministro de composiciones fluidas (es decir, capaces de fluir) de la presente invención en una estructura anatómica seleccionada. Las preparaciones inyectables, tales como las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión ejemplares.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de una solución acuosa inyectable estéril o suspensión oleaginosa. Una solución generalmente se considera una mezcla homogénea de dos o más sustancias; con frecuencia, aunque no necesariamente, es un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) se distribuyen uniformemente entre las del disolvente. Una suspensión es una dispersión en la que una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no se asienta rápidamente. El término "dispersión", como se usa en la presente, se refiere a un sistema de dos fases, en el que una fase se distribuye como partículas o gotas en la segunda, o fase continua. En estos sistemas, la fase dispersa se denomina frecuentemente fase discontinua o interna, y la fase continua se denomina fase externa o medio de dispersión. Por ejemplo, en dispersiones gruesas, el tamaño de la partícula es de 0,5 mm. En dispersiones coloidales, el tamaño de la partícula dispersa está en el intervalo de aproximadamente 1 nm a 0,5 mm. La dispersión molecular es una dispersión, en la cual la fase dispersa consiste en moléculas individuales; si las moléculas son menores que el tamaño coloidal, el resultado es una verdadera solución.

Las composiciones de la invención descrita pueden estar además en forma de una emulsión. Una emulsión es un sistema de dos fases preparado mediante la combinación de dos portadores líquidos inmiscibles, uno de los cuales se desembolsa uniformemente a través del otro y consiste en glóbulos que tienen diámetros iguales o mayores que los de las partículas coloidales más grandes. El tamaño del glóbulo es crítico y debe ser tal que el sistema logre la máxima estabilidad. Normalmente, la separación de las dos fases no ocurrirá a menos que se incorpore una tercera sustancia, un agente emulsionante. De este modo, una emulsión básica contiene al menos tres componentes, los dos portadores líquidos inmiscibles y el agente emulsionante, así como el ingrediente activo. La mayoría de las emulsiones incorporan una fase acuosa en una fase no acuosa (o viceversa). Sin embargo, es posible preparar emulsiones que son básicamente no acuosas, por ejemplo, tensioactivos aniónicos y catiónicos del sistema no acuoso de glicerina inmiscible y aceite de oliva. De este modo, las composiciones de la invención pueden estar en forma de una emulsión de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de arachis, o un aceite mineral, por ejemplo, una parafina líquida, o una mezcla de estos. Ejemplos de agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales, por ejemplo, la goma de acacia o goma de tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de los ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán.

De acuerdo con algunas modalidades, la composición puede formularse para la administración parenteral mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en portadores oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los solventes o portadores lipofílicos ejemplares incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato o triglicéridos de etilo, o los liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener además los estabilizadores o agentes ejemplares, que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de las soluciones altamente concentradas. Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un portador ejemplar, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de usarse.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además los ejemplos de los portadores o los excipientes en fase sólida o en gel. Los ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen, pero no se limitan al, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de la celulosa, gelatina y polímeros tales como los polietilenglicoles.

Las formas de preparación farmacéuticas líquidas o sólidas ejemplares son, por ejemplo, microencapsuladas y, si es apropiado, con uno o más excipientes, codificadas, recubiertas con partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, gránulos para la implantación en el tejido, o secados sobre un objeto para ser frotado en el tejido. Dichas composiciones farmacéuticas pueden estar además en forma de gránulos, perlas, polvos, tabletas, tabletas recubiertas, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación los excipientes y los aditivos y/o auxiliares tales como los desintegrantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes o solubilizantes se usan habitualmente como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son ilustrativas para usar en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de los métodos de la administración de los medicamentos, ver Langer 1990 Science 249, 1527-1533.

En dependencia de la estructura, al menos un compuesto anticancerígeno de molécula pequeña de la invención descrita, y opcionalmente al menos un agente activo adicional, puede administrarse per se (puro) o, en dependencia de la estructura del inhibidor, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los inhibidores de la invención descrita pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos orgánicos o inorgánicos, o bases orgánicas o inorgánicas. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de estas. Dichas sales incluyen, entre otras, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Tales sales pueden prepararse además como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entiende aquellas sales que, dentro del alcance del buen juicio médico, son ejemplares para usar en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, P. H. Stahl, y otros, describe las sales farmacéuticamente aceptables en detalle en el "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zurich, Suiza: 2002).

Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos descritos en la invención descrita o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido orgánico ejemplar. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no se limitan al, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforado, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, fosfato, tiocianato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como los haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil sulfatos como dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos; haluros de cadena larga, tales como los cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo, tales como los bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De este modo se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen los ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y los ácidos orgánicos como el ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y el ácido cítrico. Las sales de adición básicas pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos descritos en la invención haciendo reaccionar una porción que contiene ácido carboxílico con una base ejemplar tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los cationes en base a los metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y los cationes de amonio cuaternario y las amina no tóxicos que incluyen al amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de las sales de adición de bases incluyen la etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse además mediante el uso de los procedimientos estándares bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido ejemplar que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. Pueden prepararse además sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio), de ácidos carboxílicos.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar una composición, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de esta ("compuesto activo") con el portador que constituye uno o más agentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el agente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, moldeando el producto en la formulación deseada.

El agente farmacéutico o un éster, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este puede mezclarse con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con los materiales que complementen la acción deseada. Las soluciones o suspensiones usadas para las aplicaciones parenterales, intradérmicas, subcutáneas, intratecales o tópicas pueden incluir, entre otros, los siguientes componentes: un diluyente estéril como el agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones como los acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Administrados por vía intravenosa, los portadores particulares son la solución salina fisiológica o la solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Las composiciones farmacéuticas para la inyección parenteral comprenden soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables y los polvos estériles para la reconstitución en las soluciones o las dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o portadores acuosos y no acuosos ejemplares incluyen el agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas ejemplares de estos, los aceites vegetales (como el aceite de oliva) y los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de la partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de los tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener además los adyuvantes que incluyen los agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, los parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede desearse incluir además los agentes isotónicos, por ejemplo, los azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante el uso de los agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener los agentes de suspensión, como, por ejemplo, los alcoholes isoestearil etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto y las mezclas de estos.

El o los agentes terapéuticos, que incluyen las composiciones de la invención descrita pueden proporcionarse en partículas. El término "partículas" como se usa en la presente, se refiere a las nanopartículas o micropartículas (o en algunos casos más grandes) que pueden contener total o parcialmente la composición u otro u otros agentes terapéuticos como se describe en la presente. Las partículas pueden contener el o los agentes terapéuticos en un núcleo rodeado por un recubrimiento. El o los agentes terapéuticos pueden dispersarse además a través de las partículas. El o los agentes terapéuticos pueden adsorberse además en las partículas. Las partículas pueden ser de cualquier cinética de liberación de orden, que incluyen liberación de orden cero, liberación de primer orden, liberación de segundo orden, liberación retardada, liberación sostenida, liberación inmediata, etc., y cualquier combinación de estas. La partícula puede incluir, además del o de los agentes terapéuticos, cualquiera de esos materiales usados habitualmente en el arte de la farmacia y la medicina, que incluyen, pero no se limitan al, material erosionable, no erosionable, biodegradable o no biodegradable o las combinaciones de estos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la composición en una solución o en un estado semisólido. Las partículas pueden tener prácticamente cualquier forma.

Pueden usarse tanto materiales poliméricos no biodegradables como biodegradables en la fabricación de las partículas para administrar el o los agentes terapéuticos. Dichos polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en base al período de tiempo durante el cual se desea la liberación. Por ejemplo, los polímeros bioadhesivos incluyen hidrogeles bioerosionables de acuerdo con lo descrito por Sawhney y otros, en *Macromolecules* (1993) 26, 581-587. Estos incluyen los ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli (metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli (metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato) y poli(octadecil acrilato).

Los agentes terapéuticos pueden contenerse en los sistemas de liberación controlada. Para prolongar el efecto de un medicamento, a menudo se desea disminuir la absorción del medicamento de la inyección subcutánea, intratecal o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida del material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en el agua. La velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. El término "liberación controlada" se refiere a cualquier formulación que contenga el fármaco en la que se controle la manera y el perfil de liberación del fármaco desde la formulación. Esto se refiere a las formulaciones de liberación inmediata y no inmediata, con las formulaciones de liberación no inmediata que incluyen, entre otras, las formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada. El término "liberación sostenida" (conocida además como "liberación prolongada") se usa en la presente en su sentido convencional para referirse a una formulación del fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período prolongado de tiempo, y que puede dar como resultado sustancialmente niveles sanguíneos constantes de un medicamento durante un período de tiempo prolongado. Como alternativa, la absorción retardada de una forma del fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un portador oleoso. El término "liberación retardada" se usa en la presente, en su sentido convencional, para referirse a una formulación del fármaco en la que hay un retraso del tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco desde allí. La "liberación retardada" puede o no implicar la liberación gradual del fármaco durante un período prolongado de tiempo y, de este modo, puede ser o no "liberación sostenida".

De acuerdo con algunas modalidades, el uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede desearse para el tratamiento de las afecciones crónicas. El término liberación a "largo plazo", como se usa en la presente, significa que el implante se constituye y dispone para administrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 7 días, y preferentemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de un inhibidor descrito en los polímeros biodegradables tales como la polilactida-poliglicólido. En dependencia de la relación del inhibidor al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito se preparan además atrapando el inhibidor de la invención descrita en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en el agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados.

La preparación inyectable estéril puede ser además una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico, parenteralmente aceptable tal como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los portadores y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, la U.S.P. y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente o como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo suave, que incluye los monos o los diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se usan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones para la administración parenteral (que incluyen, entre otras, la subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intratecal e intraarticular) incluyen las soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario previsto; y las suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir los agentes de suspensión y los agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada (liofilizada) que requiere solo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina, agua para inyección, inmediatamente antes de usarse. Las soluciones y las suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito previamente.

Los agentes tamponantes ejemplares incluyen: al ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes ejemplares incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

Para la administración oral en forma de tabletas o cápsulas, el componente activo del fármaco puede combinarse con cualquier portador inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico por vía oral, como la lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (formas líquidas) y similares. Además, cuando se desee o se necesite, pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes adecuados. Los polvos y tabletas pueden estar compuestos de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por ciento de la composición descrita. Los aglutinantes ejemplares incluyen al almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como la acacia, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Entre los lubricantes pueden mencionarse para usar en estas formas de dosificación al ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegrantes incluyen al almidón, metilcelulosa, goma guar y similares. Pueden incluirse los agentes edulcorantes y aromatizantes y conservantes cuando sea apropiado.

Las composiciones de la invención pueden formularse además como jarabes y elixires. Los jarabes y elixires pueden formularse con los agentes edulcorantes, por ejemplo, el glicerol, propilenglicol, sorbitol o la sacarosa. Dichas formulaciones pueden contener además un demulcente, un conservante y los agentes aromatizantes y colorantes. Los demulcentes son agentes protectores empleados principalmente para aliviar la irritación, particularmente las membranas mucosas o los tejidos desgastados. Varias sustancias químicas poseen propiedades demulcentes. Estas sustancias incluyen los alginatos, mucílagos, gomas, dextrinas, almidones, ciertos azúcares y glicoles polihídricos poliméricos. Otros incluyen la acacia, agar, benzoína, carbómero, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, propilenglicol, alginato de sodio, tragacanto, hidrogeles y similares.

Para la administración bucal, las composiciones de la presente invención pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional para esta vía.

Las preparaciones en forma líquida incluyen las soluciones, suspensiones y emulsiones.

Las preparaciones en forma líquida pueden incluir además las soluciones para la administración intranasal.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de un polvo seco dispersable para la administración por inhalación o insuflación (ya sea por la boca o por la nariz). Las composiciones de polvo seco pueden prepararse mediante procesos conocidos en la técnica, tales como la liofilización y el molino por chorro, como se describe en la publicación de la patente internacional núm. WO 91/16038 y como se describe en el documento de los EE.UU. núm. 6,921,527. La composición de la presente invención se coloca dentro de un recipiente de dosificación ejemplar en una cantidad suficiente para proporcionar a un individuo un tratamiento de dosificación unitaria. El recipiente de dosificación es uno que se ajusta dentro de un dispositivo de inhalación ejemplar para permitir la aerosolización de la composición de polvo seco por dispersión en una corriente de gas para formar un aerosol y luego capturar el aerosol producido en una cámara que tiene una boquilla unida para la inhalación posterior de un individuo que necesita el tratamiento. Tal recipiente de dosificación incluye cualquier contenedor que encierra la composición conocida en la técnica, tal como la gelatina o las cápsulas de plástico con una porción extraíble que permite que una corriente de gas (por ejemplo, aire) se dirija al recipiente para dispersar la composición de polvo seco. Dichos contenedores están ejemplificados por los mostrados en el documento de los EE.UU. número 4,227,522; en el documento de los EE.UU. número 4,192,309; y el documento de los EE.UU. número 4,105,027. Los contenedores ejemplares incluyen además los usados junto con el inhalador de polvo de la marca Glaxo's Ventolin® Rotohaler o el

inhalador de polvo de la marca Fison's Spinhaler®. Otro contenedor ejemplar de dosis unitaria que proporciona una barrera superior contra la humedad se forma de un laminado plástico de papel de aluminio. El polvo de base farmacéutica se llena en peso o en volumen dentro de la depresión en la lámina moldeable y se sella herméticamente con un laminado plástico de lámina de recubrimiento. Tal contenedor para usar con un dispositivo de inhalación de polvo se describe en el documento de los EE.UU. núm. 4,778,054 y se usa con Glaxo's Diskhaler® (documento de los EE.UU. número 4,627,432; 4,811,731 y 5,035,237).

Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de supositorios para la administración rectal de la composición. "Rectal" o "rectalmente", como se usa en la presente, se refiere a la introducción en el cuerpo a través del recto donde se produce absorción a través de las paredes del recto. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante ejemplar tal como la manteca de cacao y los polietilenglicoles que son sólidos a temperaturas normales pero líquidos a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco. Cuando se formulan como un supositorio, las composiciones de la invención pueden formularse con aglutinantes y portadores tradicionales, tales como los triglicéridos.

El término "tópico" se refiere a la administración de una composición inventiva en, o inmediatamente debajo, del punto de la aplicación. La frase "aplicación tópica" describe la aplicación en una o más superficies que incluyen las superficies epiteliales. A pesar de que la administración tópica, en contraste con la administración transdérmica, generalmente proporciona un efecto local más que sistémico, como se usa en la presente, a menos que se indique o implique lo contrario, los términos administración tópica y administración transdérmica se usan indistintamente. Para el propósito de esta aplicación, las aplicaciones tópicas deben incluir enjuagues bucales y gárgaras.

La administración tópica puede implicar además el uso de la administración transdérmica tal como parches transdérmicos o los dispositivos de iontoforesis que se preparan de acuerdo con las técnicas y los procedimientos bien conocidos en la técnica. Los términos "sistema de administración transdérmica", parche transdérmico "o" parche "se refieren a un sistema adhesivo colocado en la piel para administrar una dosis liberada por tiempo de un fármaco(s) al pasar de la forma de dosificación a través de la piel para que esté disponible para la distribución a través de la circulación sistémica. Los parches transdérmicos son una tecnología bien aceptada que se usa para administrar una amplia variedad de productos farmacéuticos, que incluyen, entre otros, la escopolamina para el mareo, nitroglicerina para el tratamiento de la angina de pecho, clonidina para la hipertensión, estradiol para indicaciones posmenopáusicas y nicotina para dejar de fumar.

Los parches ejemplares para usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (1) el parche de matriz; (2) el parche de depósito; (3) el parche multilaminado del fármaco en adhesivo; y (4) el parche monolítico del fármaco en adhesivo; TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, páginas 249-297 (Tapash K. Ghosh y otros. Editores, 1997). Estos parches son bien conocidos en la técnica y generalmente están disponibles comercialmente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente, tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A pesar de que cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente pueden usarse además en la práctica o prueba de la invención descrita, ahora se describen los métodos y los materiales preferidos.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo declarado está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños se incluyen además dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos, se incluyen además en la invención.

Debe observarse que, como se usa en la presente, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "y" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado.

Las publicaciones discutidas en la presente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de la presentación de la presente solicitud. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión de que la invención descrita no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar la invención descrita, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención, ni están destinados a representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados

(por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

5 Ejemplo 1

Se han generado líneas de células epiteliales de colon humano (HCEC) immortalizadas mediante el uso de la telomerasa y cdk4 introducidas exógenamente (Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767 (1990)). Estas células son no transformadas, cariotípicamente diploides y tienen características multipotentes. Cuando se colocan en matrigel® en ausencia de una capa de alimentación mesenquimatosas, las células individuales se dividen y forman estructuras de tipo cripta autoorganizadas con un subconjunto de células que exhiben marcadores asociados con el epitelio maduro.

15 Tejidos colónicos

Este estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional en el centro médico de Dallas VA. Se obtuvieron biopsias de colon (20-30 muestras, ~0,5 cm³) de tejido no involucrado con adenomas endoscópicamente visibles de pacientes sometidos a una colonoscopia de detección de rutina después de obtener el consentimiento informado.

20 Medios de crecimiento y sustrato de cultivo de tejidos

Las células se cultivaron en medio basal DMEM, MEM o RPMI (Gibco®, Hyclone, Logan, UT) suplementado con EGF (25 ng/mL) (Peprotech, Inc, Rocky Hill, NJ), hidrocortisona (1 µg/mL), insulina (10 µg/mL), transferrina (2 µg/mL), selenito de sodio (5 nanomolar) (todos de Sigma, St Louis, MO), suero de ternera cósmica al 2 % (Hyclone) y sulfato de gentamicina (50 µg/mL) (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA). Las células se cultivaron en matraces primarios (BD Biosciences, San José, CA) y se cultivaron en oxígeno al 2 %-5 % y dióxido de carbono al 7 %. Las células HCT 116, fibroblastos de piel humana BJ, células Hela y células de fibroblastos de colon humano immortalizadas (C26Ci, población duplicada 150) se mantuvieron en medios DMEM, MEM o RPMI (Gibco®, Hyclone, Logan, UT) suplementados con suero de ternera cósmica al 10 % (Hyclone). Las células C26Ci se trataron con 10 µg/mL de mitomicina c (Sigma) durante 2 horas y se usaron como capas alimentadoras desde el punto de unión inicial de la cripta hasta el primer paso.

Para la detección de PARP escindida y el ensayo de actividad de la caspasa 3, las células se trataron con 2,5 µM de TASIN-1 durante 72 horas en presencia o ausencia de 12,5 µM de SP600125 (Millipore) o 5 µM de doxorrubicina (Sigma) solo durante 6 horas como los controles positivos. Para la sincronización mitótica, las células se sincronizaron en el límite G2/M mediante tratamiento con el inhibidor selectivo de moléculas pequeñas cdk1, RO-3306 (9 µM) durante 18 horas (Kim, Hyun S. y otros. Systematic Identification of Molecular Subtype-Selective Vulnerabilities in Non-Small-Cell Lung cancer. *Cell* 155, 552-566 (2013)).

40 Plásmidos

CDK4, hTERT, pSRZ-shTP53 y pBABE-hyg-KRASV12 se describieron en Vassilev, L.T. (Vassilev, L.T. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell cycle* 5, 2555-2556 (2006)).

45 Aislamiento Celular e Inmortalización

Las biopsias de colon se sumergieron en medios fríos de DMEM, MEM o RPMI (Gibco®, Hyclone, Logan, UT), se llevaron al laboratorio dentro de los 40-60 minutos posteriores a la colonoscopia, se lavaron abundantemente con solución salina tamponada con fosfato que contiene una solución antibiótica/antimicótica (Gemini Bio -Productos), y se cortaron en múltiples piezas pequeñas (~1 mm de tamaño). Después de la digestión enzimática con la collagenasa 150 u/mL (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) y la dispasa 40 µg/mL (Roche, Alemania), las criptas se resuspendieron en medios DMEM, MEM o RPMI (Gibco®, Hyclone, Logan, UT) con suplementos de crecimiento que incluyen el suero al 2 %, y los sembrados en placas de cultivo primario sembradas 48 horas antes con capas alimentadoras de fibroblastos de colon confluentes al 50 %. Durante los primeros 10 días después de la unión, las células se alimentaron cada 3 días, reduciendo el suero en un 1 % cada cambio hasta el 0 % para evitar el crecimiento de las células no deseadas como los fibroblastos. Una vez que se observaron fácilmente pequeños nidos de células epiteliales en expansión, las células se transdujeron con CDK4 retroviral y hTERT como se describió anteriormente. Cuando se observaron numerosos nidos de células de aspecto cuboidal (3-4 semanas después de la siembra inicial de la cripta), las células se volvieron a sembrar en matraces primarios. Las capas alimentadoras no fueron necesarias ni usadas para el cultivo de los tejidos de rutina después del primer pase.

Experimentos de la inactivación de las APC

Los HCEC aislados de las biopsias de colon normales se immortalizaron por infecciones sucesivas de CDK4 y hTERT seguidas de la selección con los antibióticos respectivos-G418 (250 µg/mL) y blastomicina (2,5 µg/mL). Los shARN contra p53 se introdujeron con retrovirus y la eficacia de la inactivación de p53 se verificó mediante análisis de

transferencia Western. Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de colon humano (HCT116, DLD-1, RKO) y las líneas celulares productoras de virus (293FT, Phoenix A) en medio basal suplementado con suero al 10 %. La identidad de todas las líneas celulares se verificó mediante huellas genéticas del ADN. Se transfectaron 1 µg de shRNA junto con 1 µg de plásmidos auxiliares (0,4 µg de pMD2G y 0,6 µg de psPAX2) en las células 293FT con el reactivo Polyjet (SigmaGen). Los sobrenadantes virales se recogieron 48 horas después de la transfección y se eliminaron mediante un filtro de 0,45 µm. Las células se infectaron con los sobrenadantes virales que contenían 4 µg/mL de polibreno (Sigma) a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 1. Las células infectadas con éxito se seleccionaron con 1 µg/mL de puromicina durante 3 días como se describe en: Eskiocak U, Kim SB, Ly P, Roig AI, Biglione S, Komurov K, Cornelius C, Wright WE, White MA, Shay JW. Functional parsing of driver mutations in the colorectal cancer genome reveals numerous suppressors of anchorage-independent growth. *Cancer Res* 2011; 71: 4359-65.

Análisis de transferencia Western

Después de la electroforesis a través del SDS-PAGE al 10 %, las proteínas separadas se transportaron a una membrana de nitrocelulosa (NC) (Pierce, Rockford, EE. UU.). La membrana se incubó con el anticuerpo primario contra poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Millipore, Cell Signaling Technology, Santa Cruz, etc.), citocromo C (Abcam, Cell Signaling Technology, Santa Cruz, etc.), proteína -1 del canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC) (Tecnología de señalización celular, Abcam, Santa Cruz, etc.), fosfo-JNK (Señalización celular), JNK (Señalización celular) o actina (Abcam, Santa Cruz, Señalización celular, etc.) durante la noche a 4 °C. Después del lavado, la membrana se incubó con cada anticuerpo secundario correspondiente antes de visualizarse por quimioluminiscencia. Se usó el GAPDH monoclonal de ratón (Promab, EE. UU., 1:1000) como anticuerpo primario para el control.

Actividad de la Caspasa 3/7

Las células se trataron con el control del portador o 2,5 µM de TASin-1 durante 72 horas y se sometieron al ensayo Caspase-Glo 3/7 en placas de 96 pocillos (Promega). Específicamente, se eliminaron lugares de 96 pocillos que contenían células de una incubadora y se equilibraron a temperatura ambiente. Un reactivo Caspase-Glo reconstituido se equilibró además a temperatura ambiente. Se añadió a cada pocillo un volumen de reactivo Caspase-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular. La mezcla se mezcló suavemente mediante el uso de un agitador de placa a 300-500 rpm durante 30 segundos y después se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 3 horas. La placa se insertó en el Veritas para comenzar el ensayo. Los valores de RLU se midieron mediante Veritas™. (Promega; Método de luminómetro de microplacas Veritas para el ensayo caspase-Glo™ 3/7 de Prometa).

Inmunocitoquímica

Las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % en PBS durante 5 minutos y se incubaron con solución de bloqueo (suero de cabra al 10 % y BSA al 3 % en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1 %) durante 60 min. Las células se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante una hora. Los siguientes anticuerpos se usaron: anti-HURP (Santa Cruz Biotechnology), anti-α-tubulin (Cell Signaling), anti-active β-catenin (EMD Millipore). Después de la incubación con anticuerpos secundarios marcados con Alexa-568 o Alexa-488 (Invitrogen), los portaobjetos se montaron con una solución de Mowiol 4-88 (Calbiochem) (Eskiocak, U. y otros. Functional parsing of driver mutations in the colorectal cancer genome reveals numerous suppressors of anchorage-independent growth. *Cancer Res* 71, 4359-4365 (2011)). Las células se observaron bajo un microscopio de fluorescencia, Axiovert 200M (Carl Zeiss). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (Vectashield, Laboratorios Vector). El ancho de la placa de la metafase, el ancho del huso y el ancho de la celda se determinaron mediante el uso de la herramienta de medición de línea en el software ImageJ.

Ensayo SuperTopFlash

Las células DLD1 se transfectaron transitoriamente con las construcciones de ADN que codifican las proteínas luciferasa de luciérnaga (FL) y luciferasa de Gaussia (GL) impulsadas por un promotor CMV, se incubaron con DMSO o TASIN-1 durante 18 horas y después se analizaron para detectar las actividades GL y FL, respectivamente, 24 horas más tarde. (Longin, A., Souchier, C., Ffrench, M. & Bryon, P.A. Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *J Histochem Cytochem* 41, 1833-1840 (1993).)

Transcripción inversa cuantitativa-PCR (qRT-PCR)

El ARN total se aisló del tejido del ratón mediante el uso del estuche RNeasy Plus Universal Mini (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, se convirtieron 1 µg en ADNc mediante un estuche de síntesis de ADNc de primera cadena (Roche). Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se configuraron por triplicado con Ssofast Master Mix (Biorad) y se ejecutaron en un LightCycler® 480 (Roche). El análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la detección de Kras mutante se realizó por Sato y otros. (Sato, M. y otros. Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) no fue suficiente

para conferir un fenotipo maligno completamente en las células epiteliales bronquiales. Cancer Res 66, 2116-2128 (2006)). Todos los cebadores (Sigma) usados en este estudio se enumeran en la Tabla de datos 3.

Tabla de datos 3. Conjuntos de cebadores qPCR para los genes inflamatorios

Genes	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
Il1rn	TTGTGCCAAGTCTGGAGATG	TTCTCAGAGCGGATGAAGGT
Lpo	TGACCTTGCTCCAGACTGC	TTGACCCAGACCTTGACCTC
Opg	ATGAACAAGTGGCTGTGCTG	TCACACAGGAGCTGATGACC
Slc7a11	TCTGGTCTGCCTGTGGAGTA	CAAAGGACCAAAGACCTCCA
Sox4	AATTGCACCAACTCCTCAGC	TCGATTGCAGTTCACGAGAG
Sox17	TGAAATATGGCCCACTCACA	CTGTCTTCCCTGTCTTGTTG
Tlr1	GGACCTACCCTTGCAAACAA	TATCAGGACCCTCAGCTTGG
Tlr2	GAGCATCCGAATTGCATCA	ACAGCGTTTGCTGAAGAGGA
Tnfrsf1b	GTCTTCGAACTGCAGCTGTG	TACCCAGGTTCCGGTTTGTA
Tnfrsf8	GAGACTCGGGAAGCCAAGAT	GGTGGTCTTGAGTGGTCGAT
Troy	CGCTGCCATTCTCTTCCTAC	TCGATCCTTGAATTCCTGCT

Tabla de datos 2. Secuencia de shRNA contra APC.

shRNA	Secuencia sentido maduro	Secuencia antisentido madura
APC(B7)	TAATGAACACTACAGATAGAA	TTCTATCTGTAGTGTTTCATTA
APC (G3)	CCCAGTTTGTTTCTCAAGAAA	TTTCTTGAGAAACAACTGGG

Análisis farmacocinético in vivo

A los ratones CD-1 hembras se les inyectó IP con 10 mg/kg de TASIN-1, 0,2 mL/ratón formulado como DMSO al 5 %, EL cremophor al 5 % y D₅W al 90 %, pH 7,4. La sangre completa se cosechó. El plasma se procesó a partir de la sangre completa por centrifugación de la sangre tratada con ACD durante 10 minutos a 10 000 rpm en una centrifuga estándar. Se cosecharon los intestinos gruesos con contenido y se eliminaron los contenidos del intestino grueso para análisis adicionales. Todos los tejidos cosechados se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El homogeneizado del contenido de intestino grueso (LIC) se preparó picando el contenido intestinal y homogeneizando en un volumen de 4 veces de PBS. Se mezclaron 100 microlitros de LIC con 200 microlitros de acetonitrilo que contenía 0,15 % de ácido fórmico y 37,5 ng/mL de IS (concentración final de IS = 25 ng/mL). Las muestras se sometieron a vórtice durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron 2x 13 200 rpm en una microcentrifuga estándar. El sobrenadante después se analizó por LC/MS/MS. Los ratones no tratados se usaron para recolectar el tejido para homogeneizados en blanco para hacer los estándares y QC.

Tinción de tejidos

Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina para secciones de parafina

Antes de la tinción, los portaobjetos se hornearon durante al menos veinte minutos a una temperatura mínima de 70 °C para inhibir la separación de las secciones durante el procedimiento de tinción. Las secciones se tiñeron en Hematoxilina de Weigert, solución de trabajo, durante 6 minutos, y se drenaron. Los portaobjetos se deshidrataron en etanol-ácido 70 %, pH 2,5, mediante el uso de dos cambios, tres inmersiones rápidas cada uno. Los portaobjetos se deshidrataron en ácido DI 70 %, pH 2,5, mediante el uso de dos cambios, tres inmersiones rápidas cada uno. Los portaobjetos se lavaron en agua corriente durante 15 minutos y el exceso de agua se drenó de los portaobjetos, y después se tiñeron en solución de eosina-floxina de trabajo durante 2 minutos y se drenaron. Los portaobjetos se deshidrataron en etanol al 95 %, mediante el uso de dos cambios, a 30 segundos cada uno, completamente deshidratados en etanol al 100 %, mediante el uso de tres cambios, tres inmersiones rápidas cada uno, y se aclararon en Histoclear (National Diagnostics; AGTC Bioproducts, etc.), mediante el uso de dos cambios, en un minuto cada uno. Se usó Histoclear reciente y los portaobjetos se cubrieron con un medio de montaje.

Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina para las secciones del tejido congelado

Las secciones se montaron en portaobjetos y se secaron al aire para eliminar la humedad, se tiñeron con Hematoxilina Mayers al 0,1 % filtrada (Sigma; MHS-16) durante 10 minutos, y se enjuagaron en agua fría con ddH₂O durante 5 minutos. Los portaobjetos se sumergieron en Eosina 0,5 % (1,5 g disueltos en 300 mL de EtOH al 95 %) 12 veces, y después en H₂O destilada hasta que la eosina ya no rayada, se sumergieron en EtOH 50 % 10 veces, y después se sumergieron en EtOH 70 % 10 veces, equilibrado en EtOH 95 % durante 30 segundos, equilibrado en EtOH 100 % durante 1 minuto, se sumergieron en xileno varias veces y después se limpió con una toallita y se montó con un cubreobjetos mediante el uso de Cytoseal XYZ (Stephens Scientific; cat # 8312-4).

Método de tinción inmunohistoquímica estándar: método del complejo de biotina avidina (ABC)

Los portaobjetos que contenían secciones desparafinizadas o congeladas se enjuagaron en PBS-Tween 20 durante 2x2 min. Las secciones se incubaron en suero normal de la misma especie que el anticuerpo secundario. Las secciones se incubaron en anticuerpo primario, anti-caspasa 3 (Millipore núm. AB3623; Sigma-Aldrich núm. C8487; etc.), a 1: 100 en diluyente de anticuerpos IHC-Tek™ (Cat # IW-1000 o IW-1001) o caspasa anti-escindida 3 (señalización celular) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche, y se enjuagó en PBS-Tween 20 durante 3x2 minutos. Las secciones se incubaron en solución de bloqueo de peroxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron en PBS-Tween 20 durante 3x2 min, y después se incubaron en anticuerpo secundario biotinilado en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron en PBS-Tween 20 durante 3x2 min, y después se incubaron en solución de ABC-Peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron en PBS-Tween 20 durante 3x2 min, y después se incubaron en solución de sustrato de peroxidasa. Las secciones se enjuagaron en PBS-Tween 20 durante 3x2 min, se contratiñeron con solución de contratinción, se enjuagaron en agua corriente durante 2-5 minutos, se deshidrataron a través de etanol 95 % durante 1 minuto, etanol 100 % durante 2x3min, se aclararon en xileno durante 2x5min y cubreobjetos con medio de montaje. Los portaobjetos de control negativo se procesaron en ausencia del anticuerpo primario. (Ren, Y. y otros. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51, 280-287 (2011); Scholl, F.A. et al. Mek 1/2 MAPK kinases are essential for Mammalian development, homeostasis, and Raf-induced hyperplasia. *Developmental cell* 12, 615-629 (2007)).

Ensayo de formación de colonias de agar suave

Las células DLD1 o HCT116 se sembraron en placas en cultivos de agar de doble capa en platos de 35 mm. La modificación alfa del medio esencial mínimo de Eagle (Flow Laboratories, Invitrogen, Sigma-Aldrich, etc.) suplementado con suero de ternera fetal al 20 % (Sigma-Aldrich, Invitrogen, etc.) se usó para todos los cultivos. Se incorporaron los factores de crecimiento y/o medios condicionados en la capa subyacente a un máximo del 13,2 % del volumen total de cultivo de 1,5 mL por placa. Los cultivos se gasificaron con una mezcla de 5 % de O₂-10 % de CO₂-85 % de N₂ y se incubaron durante 10 a 14 días. Solo se puntuaron las colonias que contenían 50 o más células.

Ensayos de invasión

10⁵ células se privaron de suero durante la noche, se suspendieron en medio basal y se sembraron en placa en Transwell Matrigel® de poro de 8,0 µm (BD Biosciences). Quinientos microlitros de medio que contiene 2 % de suero y suplementos de crecimiento se agregaron al fondo del pozo. Las células no migratorias se rasparon 24 horas después, y las células migratorias se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los experimentos se realizaron por triplicado en transwells para triplicados biológicos y se cuantificaron promediando el número de las células teñidas por campo de visión 4x contando cinco campos por cámara.

Citometría de flujo

Las células HCT116, DLD1, 1CTRPA y 1CTRPA A1309 se expusieron a los análogos anticancerígenos de molécula pequeña PDSA-010, PDSA-011, PDSA-013 o PDSA-014 y se analizaron mediante la citometría de flujo mediante el uso de un Citómetro de flujo EPICS XL Beckman Coulter (Hialeah, FL).

Ensayo de apoptosis liberadora de citocromo C

Los términos "apoptosis" o "muerte celular programada" se refieren a un proceso altamente regulado y activo que contribuye a la homeostasis biológica compuesta por una serie de eventos bioquímicos que conducen a una variedad de cambios morfológicos, que incluyen las ampollas, cambios en la membrana celular, tales como la pérdida de la asimetría de membrana y fijación, contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y la fragmentación de ADN cromosómico, sin dañar el organismo.

La muerte celular apoptótica se induce por muchos factores diferentes e involucra numerosas vías de señalización, algunas dependientes de las proteasas de caspasa (una clase de proteasas cisteína) y otras que son independientes de la caspasa. Puede ser desencadenada por muchos estímulos celulares diferentes, que incluyen los receptores de

la superficie celular, la respuesta mitocondrial al estrés y las células T citotóxicas, lo que resulta en la activación de las vías de señalización apoptótica.

Las caspasas involucradas en la apoptosis transmiten la señal apoptótica en una cascada proteolítica, con caspasas escindiendo y activando otras caspasas que después degradan otros objetivos celulares que conducen a la muerte celular. Las caspasas en el extremo superior de la cascada incluyen la caspasa-8 y la caspasa-9. La caspasa-8 es la caspasa inicial involucrada en la respuesta a los receptores con un dominio de muerte (DD) como Fas.

Los receptores de la familia de receptores de TNF se asocian con la inducción de la apoptosis, así como con la señalización inflamatoria. El receptor Fas (CD95) media la señalización apoptótica mediante el ligando Fas expresado en la superficie de otras células. La interacción Fas-FasL juega un papel importante en el sistema inmune y la falta de este sistema conduce a la autoinmunidad, lo que indica que la apoptosis mediada por Fas elimina los linfocitos autorreactivos. La señalización de Fas se involucra además en la vigilancia inmune para eliminar las células transformadas y las células infectadas por el virus. La unión de Fas a FasL oligomerizado en otra célula activa la señalización apoptótica a través de un dominio citoplasmático denominado dominio de muerte (DD) que interactúa con adaptadores de señalización que incluyen FAF, FADD y DAX para activar la cascada proteolítica de la caspasa. La Caspasa-8 y la caspasa-10 primero se activan para después escindir y activar las caspasas corriente abajo y una variedad de sustratos celulares que conducen a la muerte celular.

Las mitocondrias participan en las vías de señalización apoptótica a través de la liberación de las proteínas mitocondriales en el citoplasma. El citocromo c, una proteína clave en el transporte de electrones, se libera de las mitocondrias en respuesta a las señales apoptóticas, y activa la Apaf-1, una proteasa liberada de las mitocondrias. La Apaf-1 activada activa la caspasa-9 y el resto de la vía de la caspasa. Smac/DIABLO se libera de las mitocondrias e inhibe las proteínas IAP que normalmente interactúan con la caspasa-9 para inhibir la apoptosis. La regulación de la apoptosis mediante las proteínas de la familia Bcl-2 se produce cuando los miembros de la familia forman complejos que ingresan a la membrana mitocondrial, regulando la liberación del citocromo c y otras proteínas. Los receptores de la familia TNF que causan la apoptosis activan directamente la cascada de las caspasas, pero pueden además activar Bid, un miembro de la familia Bcl-2, que activa la apoptosis mediada por las mitocondrias. La Bax, otro miembro de la familia Bcl-2, se activa por esta vía para localizar la membrana mitocondrial y aumentar su permeabilidad, liberando el citocromo c y otras proteínas mitocondriales. Bcl-2 y Bcl-xL previenen la formación de los poros, bloqueando la apoptosis. Al igual que el citocromo c, el AIF (factor inductor de apoptosis) es una proteína que se encuentra en las mitocondrias que se libera de las mitocondrias mediante estímulos apoptóticos. Mientras que el citocromo C se vincula con la señalización apoptótica dependiente de la caspasa, la liberación de AIF estimula la apoptosis independiente de la caspasa, moviéndose hacia el núcleo donde se une al ADN. La unión del ADN por AIF estimula la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, quizás a través del reclutamiento de las nucleasas.

La vía del estrés mitocondrial comienza con la liberación del citocromo c de las mitocondrias, que luego interactúa con Apaf-1, causando la auto escisión y la activación de la caspasa-9. La caspasa-3, -6 y -7 son caspasas corriente abajo que se activan por las proteasas corriente arriba y actúan por sí mismas para escindir objetivos celulares.

Las proteínas Granzyme B y la perforina liberadas por las células T citotóxicas inducen apoptosis en las células objetivos, formando poros transmembrana y desencadenando la apoptosis, tal vez a través de la escisión de las caspasas, a pesar de que se han sugerido mecanismos independientes de la caspasa de la apoptosis mediada por la Granzyme B.

La fragmentación del genoma nuclear por múltiples nucleasas activadas por las vías de señalización apoptótica para crear una escalera nucleosómica es una respuesta celular característica de la apoptosis. Una nucleasa implicada en la apoptosis es el factor de fragmentación del ADN (DFF), una ADNasa activada por la caspasa (CAD). DFF/CAD se activa a través de la escisión de su inhibidor asociado ICAD mediante proteasas caspasas durante la apoptosis. El DFF/CAD interactúa con los componentes de la cromatina, como la topoisomerasa II y la histona H1, para condensar la estructura de la cromatina y quizás reclutar CAD para la cromatina. Otra proteasa activada por la apoptosis es la endonucleasa G (EndoG). La EndoG se codifica en el genoma nuclear pero se localiza en las mitocondrias de las células normales. La EndoG puede desempeñar un papel en la replicación del genoma mitocondrial, así como en la apoptosis. La señalización apoptótica provoca la liberación de EndoG de las mitocondrias. Las vías EndoG y DFF/CAD son independientes, ya que la vía EndoG todavía ocurre en las células que carecen de DFF.

La hipoxia, así como la hipoxia seguida de la reoxigenación pueden desencadenar la liberación del citocromo c y la apoptosis. La glucógeno sintasa quinasa (GSK-3), una serina-treonina quinasa expresada de manera ubicua en la mayoría de los tipos celulares, parece mediar o potenciar la apoptosis debido a muchos estímulos que activan la vía de la muerte celular mitocondrial. Loberg, RD, y otros, J. Biol. Chem 277 (44): 41667-673 (2002). Se ha demostrado que induce la activación de la caspasa 3 y activa el gen supresor de los tumores proapoptótico p53. Se ha sugerido además que GSK-3 promueve la activación y la translocación del miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, Bax, que, tras la agregación y la localización mitocondrial, induce la liberación del citocromo c. Akt es un regulador crítico de GSK-3, y la fosforilación e inactivación del GSK-3 puede mediar algunos de los efectos antiapoptóticos de Akt.

La apoptosis se indujo en las células de la siguiente manera. Las células se recogieron (5×10^7) por centrifugación a 600 xg durante 5 minutos a 4 °C, se lavaron con 10 mL de PBS helado, se centrifugaron a 600 x g durante 5 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender con 1,0 mL de mezcla de tampón de extracción de citosol IX que contenía DTT e inhibidores de la proteasa y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se homogeneizaron en un triturador de tejido Dounce helado sobre hielo. El homogeneizado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió en un tubo nuevo de 1,5 mL y se centrifugó a 10 000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió como una fracción citosólica. El sedimento se resuspendió en una mezcla de tampón de extracción mitocondrial de 0,1 mL que contenía DTT e inhibidores de proteasa, y se vertió durante 10 segundos y se guardó como la fracción mitocondrial. 10 µg de cada una de las fracciones citosólicas y mitocondriales aisladas de las células no inducidas e inducidas se cargaron en una SDS-PAGE al 12 % y se sometieron a electroforesis. Se realizó un procedimiento de transferencia Western estándar y la transferencia se sondeó con anticuerpo de citocromo c (1 µg/mL). (BioVision; Estuche de ensayo de apoptosis liberadora de citocromo C; Catálogo # K257-100)

Ensayo para determinar la absorción de TASIN-1

Se analizaron las muestras del contenido del intestino grueso, plasma e intestino grueso para determinar la retención de TASIN-1. Se tomaron muestras en los siguientes puntos de tiempo: 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 minutos. Se usó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para evaluar la presencia de TASIN-1 en cada una de las muestras.

La etoxicumarina (2 mM en DMSO) se incubó con hepatocitos de ratón macho ICR/CD-1 (lote HIC) y medio HI durante 0-240 minutos. Las reacciones se interrumpieron con 0,2 mL (1:2) de metanol que contenía ácido fórmico al 0,2 % y 100 ng/nL de IS (concentración final IS = 25 ng/mL). Las muestras se agitaron en vórtex durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se centrifugaron sobre una mesa, se centrifugaron por 5 minutos a 13,2 K rpm. El sobrenadante (185 µL) se transfirió a un vial de HPLA (con inserto). Los resultados se analizaron mediante un espectrómetro de masas Qtrap 4000. Los parámetros para usar el Qtrap 4000 fueron: Etoxicoumarina + IS 050412.dam. Los parámetros de la fuente de iones/gas fueron los siguientes: CUR = 45, CAD = bajo, IS = 5500, TEM = 600, GS1 = 60 y GS2 = 60. El tampón A fue: agua + ácido fórmico 0,1 %; El tampón B fue: MeOH + ácido fórmico 0,1 % y la velocidad de flujo fue de 1,5 mL/min. La columna que se usó fue la columna Agilent C18XDB, empaque de 5 micras de tamaño 50 x 4,6 mm, 0-1,5 min A 97 %, gradiente de 1,5-2,0 minutos a B 100 %, 2,0 – 3,0 minutos B 100 %, 3,0 – 3,3 minutos gradiente a A 97 %, gradiente de 3,3-4,5 minutos a A 97 %; IS: n-bencilbenzamida (sigma-alderich, lote # 02914LH, hecho 11/07/11 en MeOH, transición 212,1 a 91,1); transición compuesta 191,0 a 163,1. Cada uno de los compuestos (2 mM en DMSO) se incubó con la fracción murina S9 (lote KWB) y los cofactores de fase I (sistema de regeneración NADPH) durante 0-240 minutos. Las reacciones se interrumpieron con 1 mL (1:1) de metanol que contenía ácido fórmico 0,2 % y 100 ng/mL de IS (concentración final de IS = 50 ng/mL). Las muestras se agitaron en vórtex durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 2400 rpm. El sobrenadante (1 mL) se transfirió después a un tubo eppendorf y se centrifugó en una centrífuga de mesa durante 5 minutos a 13,2 K rpm. El sobrenadante (800 µL) se transfirió a un vial de HPLC (sin inserto). Los resultados se analizaron mediante un espectrómetro de masas Qtrap 4000. Los parámetros para usar el Qtrap 4000 fueron: SW142282 + IS053112.dam. Los parámetros de la fuente de iones/gas fueron los siguientes: CUR = 45, CAD = bajo, IS = 5500, TEM = 600, GS1 = 60, GS2 = 60. El tampón A fue: agua + ácido fórmico 0,1 %; El tampón B fue: MeOH + ácido fórmico 0,1 % y la velocidad de flujo fue de 1,5 mL/min. La columna que se usó fue la columna Agilent C18XDB, empaque de 5 micras de tamaño 50 x 4,6 mm, 0-1,5 min A 97 %, gradiente de 1,5-2,0 minutos a B 100 %, 2,0 – 3,0 minutos B 100 %, 3,0 – 3,3 minutos gradiente a A 97 %, gradiente de 3,3-4,5 minutos a A 97 %; IS: n-bencilbenzamida (sigma-alderich, lote # 02914LH, hecho 11/07/11 en MeOH, transición 212,1 a 91,1); transición compuesta, por ejemplo, 400,1 a 146,0, o, por ejemplo, 354,2 a 171,0.

Experimentos con animales

Se establecieron xenoinjertos subcutáneos (s.c.) en de 5 a 6 semanas de edad, ratones desnudos hembra (NCI) mediante la inoculación de 2×10^6 células de CRC en ambos flancos dorsal de cada ratón. Cuando los tumores crecieron de 2 a 3 mm de diámetro, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con TASIN-1 a una dosis de 40 mg/kg (disuelto en 0,2 mL de solvente que contenía DMSO 10 %, cremóforo 10 %) o solvente solo dos veces al día hasta que los tumores crecieron hasta 15 mm de diámetro en el grupo de control. Los volúmenes tumorales se midieron mediante el uso de calibradores y se calcularon mediante el uso de la fórmula $1 \times w^2 \times 0,5$, donde 1 y w representaban la longitud y el ancho del tumor, respectivamente. Se usó el modelo de ratón con cáncer transgénico colorrectal, ratón *CDX2P-NLS Cre;APC^{+/loxP} (CPC;Apc)* (Kaplan, KB y otros. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature cell biology* 3, 429-432 (2001). *CPC* macho; los ratones *Apc de* ~ 110 días de edad se inyectaron intraperitonealmente con disolvente o 20 mg/kg/inyección de TASIN-1 dos veces por semana durante 90 días. Los pesos se midieron cada 15 días durante el período de tratamiento.

En resumen, los ratones desnudos hembra (NCI) con xenoinjertos establecidos se les inyectó intraperitonealmente TASIN-1 a una dosis de 40 mg/kg (disuelto en 0,2 mL de solvente que contenía DMSO 10 %, cremóforo 10 %) o solvente solo dos veces al día. Para el *CPC*; los experimentos de ratones *Apc*, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con solvente o 20 mg/kg/inyección de TASIN-1 dos veces por semana durante 90 días.

Desarrollo tumoral en ratones

Los ratones se inyectaron con las células HCT116, células DLD1 o HT-29 el día 0 y el día 8, y después se trataron con el portador o el compuesto a una dosis de 10-40 mg/kg, dos veces al día. El crecimiento tumoral se evaluó extirpando y midiendo físicamente el tamaño del tumor. La tasa de crecimiento tumoral se evaluó analizando el tamaño del tumor después de los siguientes puntos de tiempo después de la inoculación con células HCT116, DLD1 o HT-29: 12, 15, 19, 22 y 24 días.

Los análogos se probaron para la inhibición tumoral en los ratones. Se inyectaron las células DLD1 o HCT116 en ratones para desarrollar tumores. En el día 6, cuando el volumen del tumor es de aproximadamente 50 mm³, se inoculó a los ratones con un control o con PDSA-014. El PDSA-014 se administró mediante inyecciones intraperitoneales a ratones dos veces al día a 10 mg/kg. Los tumores se eliminaron los días 9, 12, 15, 18 y 21. Los tumores se midieron para determinar el crecimiento tumoral.

Índice mitótico

Para la determinación del índice mitótico, las células DLD1 se fijaron en metanol 24 horas después del tratamiento con TASIN-1 a una concentración de 2,5 µL o 10 µL o Pitstop2 (abcam, ab120687) a una concentración de 10 µM, el ADN se visualizó mediante tinción Hoechst 33342, y las imágenes de las células se tomaron en un microscopio (Axiovert 200M; Carl Zeiss) mediante el uso de un objetivo LD 40x/NA 0,75/Ph2 Plan-Neofluor. Las células mitóticas se identificaron en el canal UV por su contenido de ADN fusionado.

Se han desarrollado HCEC con TP53, inactivación de APC, mutación KRASV12 (1CTRPA) junto con la expresión ectópica del truncamiento APC 1309 (de aquí en adelante "1CTRPA A1309") (tabla 1) (ver Eskiocak U, Kim SB, Ly P, Roig AI, Biglione S, Komurov K, Cornelius C, Wright WE, White MA, Shay JW. Functional parsing of driver mutations in the colorectal cancer genome reveals numerous suppressors of anchorage-independent growth. Cancer Res 2011;71: 4359-65; Ly, P. Eskiocak, U., Parker, C.R., Harris, K.J., Wright, W.E. and Shay, J.W. RNAi screening of the human colorectal cancer genome identifies multifunctional tumor suppressors regulating epithelial cell invasion. Cell Res. 22:1605-1608, 2012, PubMed PMID: 23044803; Zhang, L., Komurov, K., Wright, W.E. and Shay, J.W. Identification of novel driver tumor suppressors through functional interrogation of putative passenger mutations in colorectal cancer. Int J Cancer. 132(3):732-7, 2013. doi: 10.1002/ijc.27705. Epub 2012 21 de julio. PMID: 22753261) Esta mutación APC está fuertemente seleccionada para los cánceres de colon y se ha demostrado que es más resistente a la escisión de la caspasa que otras formas truncadas de APC. La línea celular 1CTRPA A1309 de HCEC truncada por APC exhibe un aumento en la tasa de crecimiento, mejora del crecimiento del agar blando e invade a través de matrigel® en comparación con HCEC parentales pareados (1CTRPA). Sin embargo, la eliminación de APC wt solo (1CTRPA) no causó que los HCEC ganaran propiedades oncogénicas (datos no publicados).

Estas observaciones respaldaron la idea de que los truncamientos de APC pueden hacer que las células ganen propiedades oncogénicas, como, por ejemplo, la proliferación celular excesiva o mal regulada.

Estas líneas celulares isogénicas con alteraciones genéticas definidas se han utilizado como modelo celular para la identificación de las moléculas pequeñas que se dirigen a las proteínas APC truncadas.

Tabla 1 Resumen de las células epiteliales del colon humano isogénicas (HCEC) usadas en esta pantalla

Líneas celulares	Alteraciones genéticas
1CT	HCEC inmortalizadas con CDK4 y hTERT
1CTRPA	<i>Kras</i> ^{V12} , <i>shTP53</i> , <i>shAPC</i>
1CTRPA A1309	<i>Kras</i> ^{V12} , <i>shTP53</i> , <i>shAPC</i> , mutación APC (aa 1-1309)
C:CDK4, T: hTERT, R: <i>Kras</i> ^{V12} , P: <i>shTP53</i> , A: <i>shAPC</i>	

Las líneas celulares isogénicas se usaron para llevar a cabo una pantalla de alto rendimiento en base a las células diseñada para identificar las moléculas pequeñas y/o las fracciones de los productos naturales del archivo de compuestos de la Universidad de Texas Southwestern (UTSW) que puede inhibir selectivamente el crecimiento celular de HCEC truncados por APC (Figura 6). Esta biblioteca de compuestos abarca ~ 200 000 compuestos sintéticos que representan un gran espacio químico de varios proveedores comerciales, que incluyen 1200 medicamentos comercializados de la Prestwick Chemical Library® y 600 compuestos que se sometieron a pruebas preclínicas de la biblioteca del NIH. Las líneas celulares isogénicas usadas en la pantalla se enumeran en la Tabla 1.

Se realizó una pantalla primaria en 1CTRPA A1309. Para la selección, las células se sembraron como una monocapa a una densidad de 400 células/pocillo en placas de 384 pocillos [en medio de células epiteliales colónicas (CoEpiCM (ScienCell Research Laboratories; Innoprot, etc.)) que están disponibles comercialmente (Invitrogen; BioRad; Corning, etc.). Veinticuatro horas después, se añadieron los compuestos candidatos a una concentración de 2,5 μ M por pocillo y las células se incubaron durante 4 días en condiciones fisiológicas de oxígeno ($\sim$ 3-5% de O_2). Se realizó un ensayo Celltiter-Glo® basado en luminiscencia para medir la viabilidad celular, mediante el uso de los niveles de ATP como lectura. En resumen, se prepararon placas multipocillo de paredes opacas con células de mamífero en medio de cultivo (25 μ l por pocillo, placas de 384 pocillos). Se prepararon pocillos de control que contenían medio sin células para obtener un valor para la luminiscencia de fondo. Los compuestos de prueba se añadieron a los pocillos experimentales y se incubaron de acuerdo con el protocolo de cultivo. La placa y su contenido se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se generó una curva estándar de ATP inmediatamente antes de añadir el reactivo CellTiter-Glo®. Se añadió un volumen de reactivo CellTiter-Glo® igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo (25 μ l de reactivo a 25 μ l de células que contienen medio para una placa de 384 pocillos). Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. Se dejó incubar la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente y se registró la luminiscencia. (por ejemplo, GloMax®, Lumistar, SPECTROstar, PHERAstar FS). La pantalla primaria rindió 6704 eventos positivos (en base a un puntaje z de <-3 , lo que significa que el puntaje z de -3 fue 3 desviaciones estándar por debajo de la media).

Los compuestos que inhibían $> 40\%$ de la proliferación de células epiteliales humanas normales se excluyeron basados en la base de datos del dispositivo de tamizaje y la experiencia previa. Los 5381 compuestos restantes se volvieron a seleccionar contra 1CTRPA A1309 (para validar los resultados del tamizaje primario) y 1CTRPA (para excluir aquellos compuestos que no son específicos de los truncamientos de APC). Para eliminar las posibles propiedades de toxicidad general de estos compuestos, los compuestos también se tamizaron en contra de HCEC diploides normales (1CT). Este contador de tamizaje identificó 126 compuestos que inhiben el crecimiento celular de 1CTRPA A1309 $> 50\%$ más que el de 1CTRPA y 1CT. Se realizó una selección adicional de estos compuestos selectivamente tóxicos contra el mismo panel de HCEC a una serie de concentraciones de dilución 1:3 veces, que van desde 2,5 μ M a 30 nM. Este segundo tamizaje contador rindió 14 compuestos candidatos que mostraron inhibición selectiva de las células 1CTRPA A1309 a concentraciones de 30 nM o 90 nM, pero sin un impacto notable en las células 1CTRPA o 1CT. La estrategia general de detección se muestra en el diagrama de flujo (**Figura 6**).

Estos 14 compuestos se obtuvieron comercialmente después y su IC_{50} se determinó mediante la realización de estudios de respuesta a la dosis con series de dilución de medio log en 12 puntos de concentración en dos líneas de CRC auténticas: HCT116 (wt APC) y DLD1 (APC truncada). Los compuestos anticancerígenos A y B mostraron toxicidad selectiva hacia DLD1 con IC_{50} de 63 nM y 131 nM, respectivamente, como se muestra en la **Figura 7**. Estos dos compuestos sirvieron como compuestos líderes iniciales para el desarrollo del análogo y para estudios adicionales.

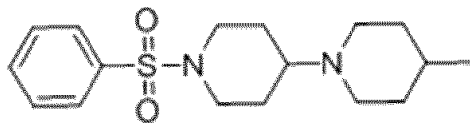
Los compuestos ilustrativos que resultan de estas sustituciones se muestran en la Tabla A.

I. Información general

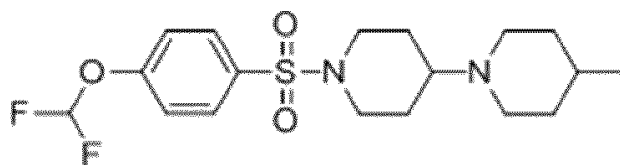
Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron mediante el uso ya sea de espectrómetro Varian Inova-400 MHz o 500 MHz. Las abreviaturas para los acoplamientos de la señal son las siguientes: s, singlete; br, ancho; d, doblete; t, triplete, q, cuarteto y m, multiplete. El punto de fusión de las muestras sólidas se realizó mediante el uso del aparato de punto de fusión Fisher-Johns. La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se realizó en placas precubiertas compradas en E. Merck (TLC sílice 60 PF254, 25 placas de vidrio de 20 x 20 cm). Los cromatogramas se visualizaron bajo la luz UV o mediante la tinción con yoduro o $KMnO_4$. La cromatografía rápida se realizó sobre la base de la descripción de Still y otros (Still, WC y otros J. Org. Chem 1978, 43, 2923-2925) mediante el uso de gel de sílice E. Merck 60 (malla 230-400) o en un sistema Isco Combiflash mediante el uso de una columna Redisep®Rf rápida con un tamaño que varía de 4 gramos a 80 gramos. Todas las reacciones sensibles al aire se llevaron a cabo bajo ambiente de argón. A menos que se indique de cualquier otra forma, todos los reactivos y solventes comunes adquiridos de fuentes comerciales se usaron sin purificación adicional. Toda la cristalería usada para las reacciones sensibles a la humedad se secó al horno durante toda la noche o se secaron al fuego.

II. Procedimiento general para la preparación de sulfonamidas a partir de cloruros de sulfonilo y aminas

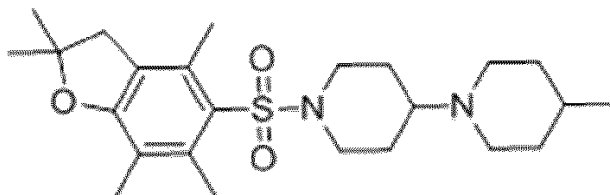
Una mezcla de amina (1,0 mmol), cloruro de sulfonilo (1,1 mmol), N,N-diisopropil etilamina (1,5 mmol), y CH_2Cl_2 (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se vertió después en solución saturada de $NaHCO_3$ (20 mL) y se extrajo mediante CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice con una mezcla de MeOH: CH_2Cl_2 (o MeOH : EtOAc) como eluyente o mediante recristalización en una mezcla de CH_2Cl_2 y hexano para proporcionar las sulfonamidas.



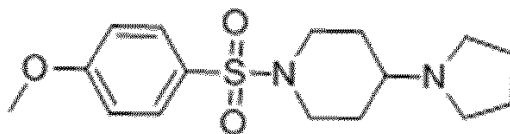
4-metil-1'-(fenilsulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido (92 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-metil- 1,4'-bipiperidina y el cloruro de bencenosulfonilo. pf 154 - 156 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,77 (dd, $J = 8,3$, 1,4 Hz, 2 H), 7,65 - 7,58 (m, 1 H), 7,54 (dd, $J = 8,4$, 7,0 Hz, 2H), 3,87 (d, $J = 11,9$ Hz, 2 H), 2,80 (d, $J = 11,8$ Hz, 2 H), 2,26 (m, 3 H), 2,14 (t, $J = 11,4$ Hz, 2 H), 1,86 (d, $J = 11,7$ Hz, 2 H), 1,72 - 1,59 (m, 4 H), 1,40 - 1,28 (m, 1 H), 1,23 (m, 2 H), 0,91 (d, $J = 6,4$ Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 136,0, 132,7, 129,0, 127,6, 61,3, 49,1, 46,1, 33,9, 30,8, 26,9, 21,7; MS (ESI) m/z 323,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



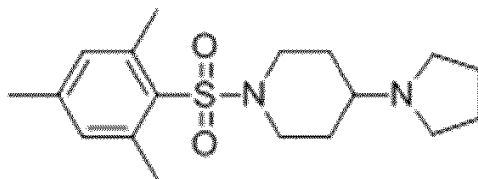
1'-((4-(difluorometoxi)fenil)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido naranja claro (69%) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 4-(difluorometoxi)benceno-1-sulfonilo, pf 132-135 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 7,24 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 6,61 (t, $J = 72,6$ Hz, 1 H), 3,83 (d, $J = 12,1$ Hz, 2 H), 2,77 (d, $J = 11,7$ Hz, 2 H), 2,33 - 2,16 (m, 3 H), 2,11 (td, $J = 11,6$, 2,5 Hz, 2 H), 1,84 (d, $J = 13,2$ Hz, 2 H), 1,64 (m, 4 H), 1,30 (dddt, $J = 13,3$, 9,7, 6,5, 3,5 Hz, 1 H), 1,16 (qd, $J = 12,0$, 3,8 Hz, 2 H), 0,89 (d, $J = 6,5$ Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 154,1 (t, $J = 2,9$ Hz), 132,9, 129,8, 119,3, 115,2 (t, $J = 262,5$ Hz), 61,4, 49,5, 46,1, 34,6, 31,0, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 389,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



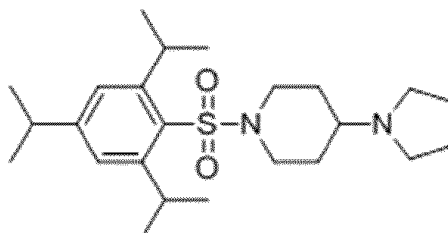
4-metil-1'-((2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)sulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite amarillo pálido (95 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4- metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,63 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,97 (s, 2 H), 2,89 (s, br, 2 H), 2,75 (dt, $J = 12,0$, 4,0 Hz, 2 H), 2,50 (s, 3 H), 2,46 (s, 3 H), 2,41 (s, br, 1 H), 2,14 (s, br, 2 H), 2,10 (s, 3 H), 1,90 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,64 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,51 (m, 2 H), 1,48 (s, 6 H), 1,40 - 1,08 (m, 3 H), 0,87 (d, $J = 4,0$ Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 159,9, 140,8, 135,3, 125,8, 125,0, 117,9, 86,8, 61,9, 49,6, 43,9, 43,1, 34,5, 31,0, 28,6, 27,7, 21,8, 19,2, 17,6, 12,5; MS (ESI) m/z 435,3 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



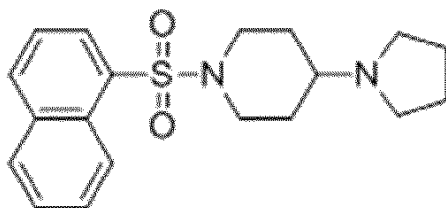
1-((4-metoxifenil)sulfonil)-4-(pirrolidin-1-il)piperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite amarillo pálido (70 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc después 1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción entre el 4-(pirrolidin-1-il) piperidina y el cloruro de 4-metoxibenceno-1-sulfonilo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,68 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 6,97 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 3,86 (s, 3 H), 3,68 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,51 (s, 4 H), 2,36 (dt, $J = 12,0$, 4,0 Hz, 2 H), 1,90 (m, 3 H), 1,75 (s, 4 H), 1,61 (q, $J = 12,0$ Hz, 1H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 162,9, 129,8, 127,8, 114,1, 60,8, 55,6, 51,3, 45,0, 30,4, 23,2; MS (ESI) m/z 325,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



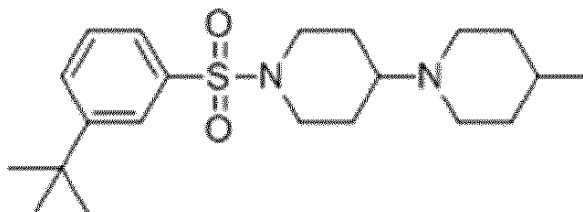
1-(mesitilsulfonyl)-4-(pirrolidin-1-il)piperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite amarillo (59 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre 4-(pirrolidin-1-il)piperidina y cloruro de 2,4,6-trimetilbenceno-1-sulfonylo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,92 (s, 2 H), 3,53 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,80 (td, $J = 12,0$, 2,6 Hz, 2 H), 2,59 (s, 6 H), 2,56 (s, 4 H), 2,28 (s, 3 H), 2,11 (s, br, 1 H), 1,93 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,77 (s, 4 H), 1,50 (m, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,6, 131,9, 131,6, 61,2, 51,4, 42,9, 30,7, 23,2, 22,7, 21,0; MS (ESI) m/z 337,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



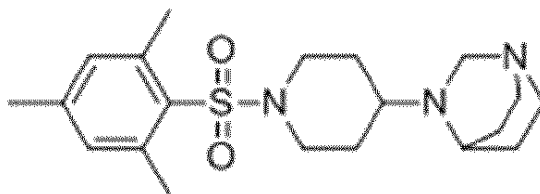
4-(pirrolidin-1-il)-1-((2,4,6-triisopropilfenil)sulfonyl)piperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (> 95 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre 4-(pirrolidin-1-il)piperidina y cloruro de 2,4,6-triisopropilbenceno-1-sulfonylo, pf 118 - 122 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,15 (s, 2 H), 4,16 (m, 2 H), 3,58 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,85 (m, 3 H), 2,62 (s, 4 H), 2,16 (s, br, 1 H), 1,98 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,81 (s, 4 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 153,2, 151,8, 129,7, 123,9, 61,5, 51,4, 42,9, 34,2, 29,3, 24,9, 23,6, 23,2; MS (ESI) m/z 421,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



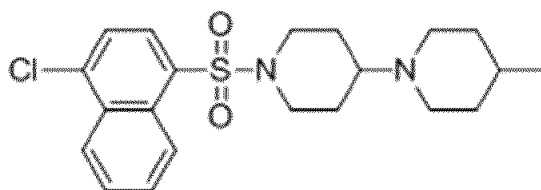
1-(naftalen-1-ilsulfonyl)-4-(pirrolidin-1-il)piperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (67 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-(pirrolidin-1-il)piperidina y el cloruro de naftaleno-1-sulfonylo, pf 151-154 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,70 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 8,20 (dd, $J = 7,3$, 1,4 Hz, 1 H), 8,05 (d, $J = 12,0$ Hz, 1 H), 7,90 (dd, $J = 7,3$, 1,4 Hz, 1 H), 7,58 (m, 3H), 3,81 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,65 (m, 6 H), 2,19 (s, br, 1 H), 1,92 (m, 2 H), 1,79 (s, 4 H), 1,59 (m, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 134,5, 134,3, 132,8, 130,5, 128,9, 128,8, 128,1, 126,9, 125,2, 124,1, 60,8, 51,1, 44,2, 30,0, 23,2; MS (ESI) m/z 345,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



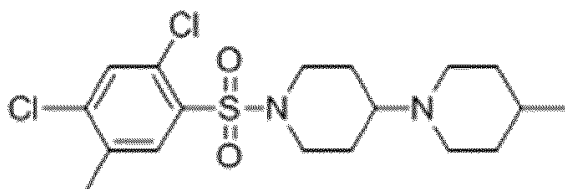
1'-((3-(terc-butil)fenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (90 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-(pirrolidin-1-il)piperidina y el cloruro de 3-(terc-butil)benceno-1-sulfonylo, pf 100-102 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,73 (s, 1 H), 7,57 (m, 2 H), 7,43 (m, 1 H), 3,84 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,78 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 2,22 (td, $J = 12,0$, 2,5 Hz, 3 H), 2,12 (t, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,82 (d, $J = 12,0$ Hz, 2 H), 1,63 (m, 4 H), 1,33 (s, 9 H), 1,28 (m, 1 H), 1,19 (m, 2 H), 0,88 (d, $J = 8,0$ Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 152,5, 135,9, 129,7, 128,7, 124,7, 124,4, 61,5, 49,4, 46,0, 35,0, 34,4, 31,1, 31,0, 27,2, 21,8; MS (ESI) m/z 379,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



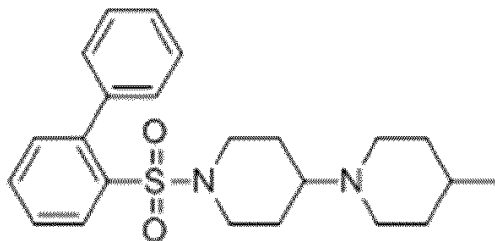
3-(4-(mesitylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinuclidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (42 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre 3-piperazin-1-ilquinuclidina trihidrocloruro de hemihidrato (1,0 mmol) y cloruro de 2,4,6-trimetilbencenosulfonilo (1,1 mmol) en CH_2Cl_2 en presencia de N,N-diisopropil etilamina (1,5 mmol). pf superior a 300 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,96 (s, 2 H), 3,34-3,12 (m, 9 H), 3,04 (dd, J = 12,0, 4,0 Hz, 1 H), 2,60 (s, 6 H), 2,45 (s, 5 H), 2,30 (s, 4 H), 2,05 (m, 2 H), 1,79 (m, 1 H), 1,68 (m, 1 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,8, 140,5, 132,0, 131,0, 59,1, 52,8, 50,3, 46,6, 45,6, 44,1, 23,0, 22,9, 22,1, 20,9, 17,7; MS (ESI) m/z 378,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



1'-((4-cloronaftalen-1-il)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (71 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 4-cloronaftaleno-1-sulfonilo, pf 129-132 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,76 (m, 1H), 8,39 (ddd, J = 6,5, 3,4, 0,7 Hz, 1 H), 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,69 (dd, J = 6,6, 3,3 Hz, 2 H), 7,64 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 3,87 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,75 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,55 (td, J = 12,2, 2,4 Hz, 2 H), 2,23 (t, J = 12,0 Hz, 1 H), 2,06 (t, J = 11,3 Hz, 2 H), 1,81 (d, J = 13,1 Hz, 2 H), 1,55 (m, 4 H), 1,27 (dd, J = 17,6, 9,0 Hz, 1 H), 1,15 (dd, J = 13,4, 9,6 Hz, 2 H), 0,87 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 138,4, 132,3, 131,5, 130,1, 130,0, 128,7, 127,9, 125,7, 125,4, 124,6, 61,5, 49,5, 45,5, 34,5, 31,0, 27,7, 21,8; MS (ESI) m/z 407,1(100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

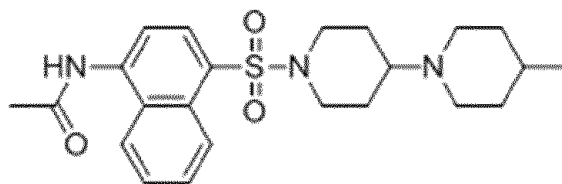


1'-((2,4-dicloro-5-metilfenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (83%) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre EL 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 2,4-dicloro-5-metilbenceno-1-sulfonilo, pf 120-123 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,89 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 3,87 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 2,82 (d, J = 11,2 Hz, 2H), 2,71 (td, J = 12,4, 2,4 Hz, 2H), 2,38 (s, 3 H), 2,34 (m, 1 H), 2,15 (t, J = 11,2 Hz, 2H), 1,83 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 1,59 (m, 4H), 1,31 (m, 1H), 1,06 (t, J = 12,0 Hz, 2H), 0,89 (d, J = 6,0 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 139,3, 135,5, 134,6, 133,6, 132,0, 129,9, 61,7, 49,5, 45,6, 34,5, 31,0, 27,7, 21,8, 19,6; MS (ESI) m/z 405,1(100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

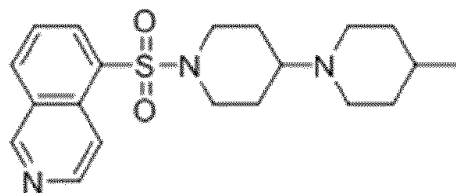


1'-([1,1'-bifenil]-2-ilsulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (> 95 %) mediante cromatografía rápida (MeOH 1: 9 : EtOAc) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de [1,1'-bifenil]-2-sulfonilo, pf 106-109 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,12 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H), 7,56 (td, J = 7,6, 1,6 Hz, 1H), 7,46 (td, J = 7,6, 1,6 Hz, 1 H), 7,39 (m, 5 H), 7,30 (dd, J = 7,6, 1,6 Hz, 1 H), 3,29 (d, J = 12,8, 2 H), 2,71 (d, J = 10,8 Hz, 2 H), 2,22 (td, J = 12,6, 2,5 Hz, 3 H), 2,09 (t, J = 10,4 Hz, 2 H), 1,90 -1 49 (m, 4 H), 1,21 (m, 5 H), 0,88 (d, J = 6,0 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 141,6, 139,7, 137,1, 133,0, 132,2, 130,3, 129,6, 127,7, 127,5, 61,7,

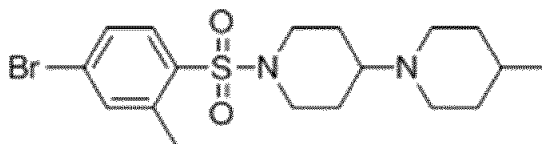
49,3, 44,4, 34,4, 31,0, 27,2, 21,8; MS (ESI) m/z 399,2(100 %, [M+H]⁺).



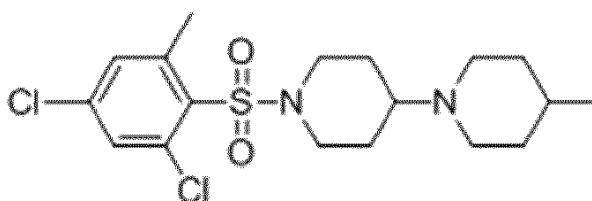
N-(4-((4-metil-1,4'-bipiperidin)-1'-il)sulfonil)naftalen-1-il)acetamida : Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (64 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4-acetamidonaftaleno-1-sulfonilo, pf 113-117 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,51 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,09 (m, 2H), 7,87 (s, 1 H), 7,66 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,48 (m, 2 H), 3,86 (d, J = 9,6 Hz, 2 H), 2,80 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,52 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,36 (t, J = 12,8 Hz, 1 H), 2,31 (s, 3 H), 2,15 (t, J = 11,6 Hz, 3 H), 1,83 (d, J = 13,6 Hz, 2 H), 1,56 (m, 4 H), 1,24 (m, 3 H), 0,88 (d, J = 6,0 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 169,5, 133,3, 133,2, 130,6, 129,5, 129,4, 128,1, 127,7, 124,3, 123,9, 123,4, 61,6, 49,3, 45,3, 33,7, 30,7, 27,2, 24,0, 21,6; MS (ESI) m/z 430,2 (100 % [M+H]⁺).



5-((4-metil-1,4'-bipiperidin)-1'-il)sulfonil)isoquinolina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (51 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de isoquinolina-5-sulfonilo, pf 123 - 126 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,33 (s, 1 H), 8,66 (d, J = 6,0 Hz, 1 H), 8,48 (d, J = 6,0 hz, 1 H), 8,36 (dd, J = 7,6, 1,6 Hz, 1 H), 8,19 (d, J = 6,0 Hz, 1 H), 7,69 (dd, J = 8,2, 7,4 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,74 (d, J = 10,8 Hz, 2 H), 2,51 (td, J = 12,0, 2,4 Hz, 2 H), 2,21 (m, 1 H), 2,06 (m, 2 H), 1,81 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,56 (m, 4 H), 1,27 (m, 1 H), 1,15 (m, 2 H), 0,86 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 153,2, 145,1, 134,0, 133,7, 132,6, 131,9, 129,1, 125,8, 117,7, 61,4, 49,9, 45,6, 34,5, 31,0, 27,7, 21,6; MS (ESI) m/z 374,2(100 %, [M+H]⁺).

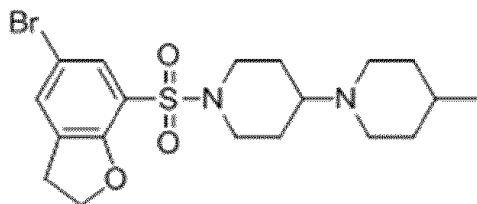


1'-((4-bromo-2-etilfenil)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (92 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4-bromo-2-etilbenceno-1-sulfonilo, pf 87-91 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,50 (d, J = 2,0 Hz, 1 H), 7,42 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1 H), 3,75 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,96 (q, J = 7,6 Hz, 2 H), 2,83 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 2,60 (td, J = 12,4, 2,4 Hz, 2 H), 2,34 (m, 1 H), 2,13 (m, 2 H), 1,84 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 1,57 (m, 4 H), 1,25 (m, 6 H), 0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 145,2, 134,8, 133,9, 131,7, 129,0, 127,8, 61,6, 49,5, 45,1, 34,4, 30,9, 27,7, 25,9, 21,8, 15,4; MS (ESI) m/z 429,1 (100 %, [M+]⁺), 431,1 (100 %, [M+2]⁺).

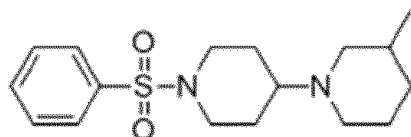


1'-((2,4-dicloro-6-metilfenil)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (93 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 2,4-dicloro-6-metilbenceno-1-sulfonilo, pf 89-91 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,37 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 2,3, 0,9 Hz, 1H), 3,79 (d, J = 12,7 Hz, 2H), 2,93 - 2,73 (m, 4H), 2,67 (s, 3H), 2,45 - 2,27 (m, 1H), 2,14 (td, J = 11,3, 2,5 Hz, 2H), 1,83 (dd, J = 12,3, 3,4 Hz, 2H), 1,57 (dtd, J = 24,4, 11,6, 4,0 Hz, 4H), 1,30 (ddt, J = 12,8, 6,4, 3,7 Hz, 1H), 1,18 (qd, J = 12,0, 3,9 Hz, 2H), 0,89 (d, J = 6,9 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 143,7, 137,7, 135,3,

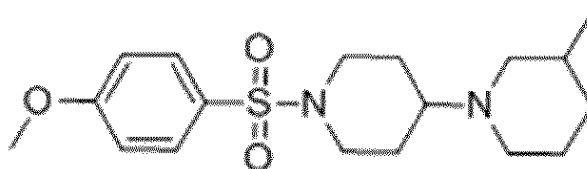
134,2, 131,6, 130,2, 61,7, 49,5, 45,0, 34,6, 31,0, 27,9, 24,0, 21,8; MS (ESI) m/z 405,1(100 %, [M+H]⁺).



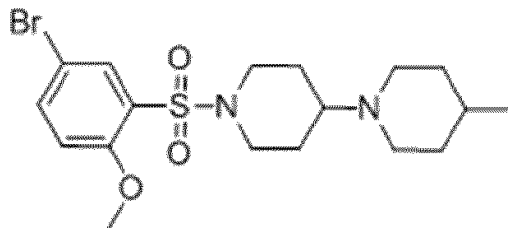
1'-((5-bromo-2,3-dihydrobenzofuran-7-yl)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (86 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 5-bromo-2,3-dihydrobenzofuran-7-sulfonylo, pf 128 - 132 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,62 (s, 1 H), 7,43 (s, 1 H), 4,70 (t, J = 8,9 Hz, 2 H), 3,89 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 3,24 (t, J = 9,0 Hz, 2 H), 2,79 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 2,50 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,27 (tt, J = 11,7, 3,7 Hz, 1 H), 2,12 (t, J = 11,5 Hz, 2 H), 1,82 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 1,60 (m, 4 H), 1,30 (m, 1 H), 1,17 (qd, J = 11,9, 3,7 Hz, 2 H), 0,88 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 156,4, 132,3, 132,2, 130,7, 121,0, 111,8, 73,0, 61,7, 49,5, 46,0, 34,6, 31,0, 29,0, 27,6, 21,9; MS (ESI) m/z 443,1 (90 %, [M+]⁺) 445,1 (100 %, [M+2]⁺).



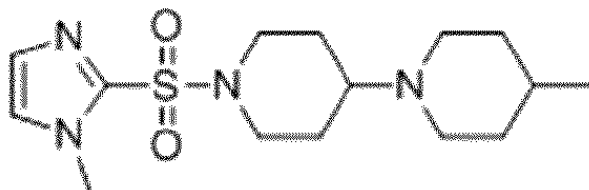
3-metil-1'-(fenilsulfonyl)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (63 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: EtOAc) después de la reacción entre 3-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de bencenosulfonylo, pf 132-135 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 - 7,69 (m, 2 H), 7,62 - 7,55 (m, 1 H), 7,55 - 7,44 (m, 2 H), 3,84 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 2,89 - 2,51 (m, 2 H), 2,36 - 2,09 (m, 3 H), 2,02 (td, J = 11,2, 2,7 Hz, 1 H), 1,88 - 1,76 (m, 2 H), 1,75 - 1,44 (m, 7 H), 0,85 - 0,73 (m, 1 H), 0,81 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 136,3, 132,6, 129,0, 127,6, 61,5, 57,6, 49,5, 46,2, 33,29, 31,5, 27,2, 27,1, 25,9, 19,8; MS (ESI) m/z 323,2 (100 %, [M+H]⁺).



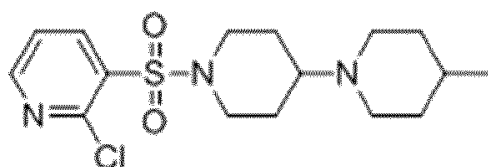
1'-((4-metoxifenil)sulfonyl)-3-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (74 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 3-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 4-metoxibenceno-1-sulfonylo, pf 114-117 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,69 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 3,87 (s, 3 H), 3,82 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,87 - 2,62 (m, 2 H), 2,22 (td, J = 12,0, 2,5 Hz, 3 H), 2,06 (td, J = 11,8, 10,7, 2,9 Hz, 1 H), 1,90 - 1,79 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 1,79 - 1,46 (m, 7 H), 0,88 - 0,75 (m, 1 H), 0,83 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 162,9, 129,8, 127,7, 114,1, 61,6, 57,3, 55,6, 49,4, 46,1, 33,1, 31,2, 27,0, 25,6, 19,8; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M+H]⁺).



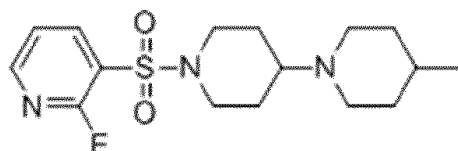
1'-((5-bromo-2-metoxifenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (92 %) mediante cromatografía rápida (1:19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 5-bromo-2-metoxibenceno-1-sulfonylo, pf 98-102 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (d, J = 2,6 Hz, 1 H), 7,59 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1 H), 6,88 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 3,96 - 3,88 (d, J = 13,6 Hz, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 2,84 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 2,64 (td, J = 12,5, 2,5 Hz, 2 H), 2,38 (d, J = 12,2 Hz, 1 H), 2,17 (t, J = 11,7 Hz, 2 H), 1,85 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,60 (m, 4 H), 1,40 - 1,14 (m, 3 H), 0,91 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 155,9, 136,8, 133,8, 128,7, 114,1, 112,3, 61,8, 56,3, 49,5, 45,9, 34,6, 31,0, 28,0, 21,9; MS (ESI) m/z 431,1 (100 %, [M+]⁺), 433,1 (100 %, [M+2]⁺).



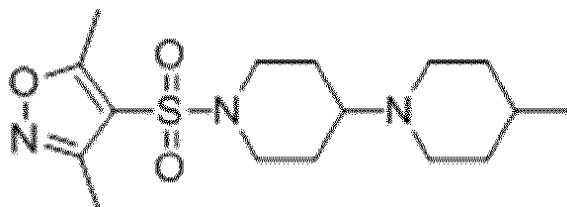
4-metil-1'-((1-metil-1H-imidazol-2-il)sulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (51 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 1-metil-1H-imidazol-2-sulfonilo, pf 153-156 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,03 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,96 (d, J = 12,2 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,05 (t, J = 12,5 Hz, 2H), 2,89 (d, J = 10,8 Hz, 2H), 2,54 (s, 1H), 2,24 (s, 2H), 1,94 (d, J = 12,5 Hz, 2H), 1,81 - 1,58 (m, 4H), 1,31 (s, 3H), 1,06 - 0,79 (d, J = 8,0 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 142,8, 128,2, 124,4, 61,8, 49,4, 46,6, 34,8, 34,1, 30,9, 27,3, 21,7; MS (ESI) m/z 327,2 (100 %, [M+H]⁺).



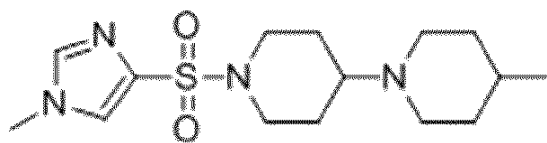
1'-((2-cloropiridin-3-il)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (71 %) mediante cromatografía rápida (1:19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 2-cloropiridina-3-sulfonilo, pf 122-124 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,55 (d, J = 4,9 Hz, 1 H), 8,38 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,40 (dd, J = 7,8, 4,8 Hz, 1 H), 3,92 (d, J = 13,0 Hz, 2 H), 2,83 (t, J = 12,5 Hz, 4 H), 2,38 (t, J = 11,5 Hz, 1H), 2,15 (t, J = 11,0 Hz, 2H), 1,86 (d, J = 12,5 Hz, 2H), 1,72 - 1,53 (m, 4 H), 1,32 (m, 1 H), 1,18 (m, 2 H), 0,90 (d, J = 6,5 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 148,4, 144,5, 136,9, 130,5, 118,5, 57,6, 45,6, 41,9, 30,7, 27,1, 24,0, 17,9; MS (ESI) m/z 358,1 (100 %, [M+H]⁺).



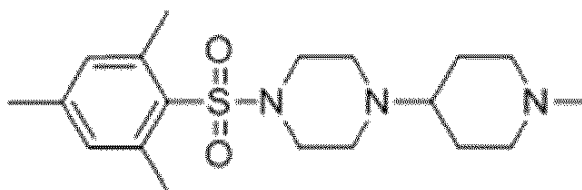
1'-((2-fluoropiridin-3-il)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (> 95 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 2- fluoropiridina-3-sulfonilo, pf 120 - 123 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,41 (d, J = 4,9 Hz, 1 H), 8,29 (dd, J = 9,2, 7,6 Hz, 1 H), 7,37 (dd, J = 7,6, 4,9 Hz, 1 H), 3,96 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 2,81 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 2,67 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,34 (ddd, J = 11,5, 8,0, 3,5 Hz, 1 H), 2,15 (t, J = 10,4 Hz, 2 H), 1,87 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 1,74 - 1,55 (m, 4 H), 1,32 (ddt, J = 10,3, 6,9, 4,1 Hz, 1 H), 1,27 - 1,11 (m, 2 H), 0,91 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 154,75 (d, J = 244,0 Hz), 147,68 (d, J = 14,3 Hz), 138,2, 118,2, 117,9, 57,5, 45,6, 41,9, 30,7, 27,1, 23,8, 17,9; MS (ESI) m/z 342,2 (100 %, [M+H]⁺).



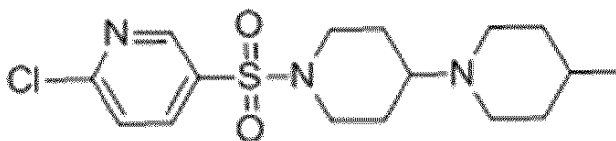
3,5-dimetil-4-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonil)isoxazol: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (28 %) mediante la recristalización en una mezcla de CH₂Cl₂ y hexano después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 3,5-dimetilisoxazol-4-sulfonilo, pf 158 - 161 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,78 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 2,80 (d, J = 11,5 Hz, 2H), 2,61 (s, 3H), 2,50 (t, J = 12,0 Hz, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,27 (tt, J = 11,4, 3,5 Hz, 1H), 2,14 - 2,06 (m, 2H), 1,87 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 1,72 - 1,50 (m, 4H), 1,30 (m, 1H), 1,25 - 1,09 (m, 2H), 0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 173,5, 158,0, 113,7, 61,3, 49,6, 45,4, 34,6, 31,0, 27,5, 21,9, 13,0, 11,4; MS (ESI) m/z 342,2 (100 %, [M+H]⁺).



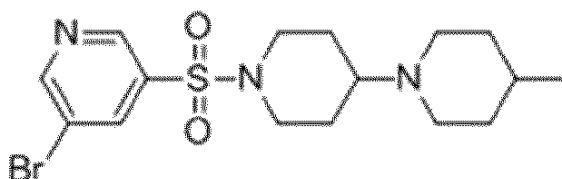
4-metil-1'-((1-metil-1H-imidazol-4-il)sulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (61 %) mediante recristalización en una mezcla de CH_2Cl_2 y hexano después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 1-metil-1H-imidazol-4-sulfonilo. pf 139 - 142 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,48 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 3,90 (d, J = 13,0 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 2,80 (d, J = 9,9 Hz, 2H), 2,57 (t, J = 12,1 Hz, 2H), 2,26 (t, J = 11,5 Hz, 1H), 2,13 (t, J = 10,5 Hz, 2H), 1,83 (d, J = 12,1 Hz, 2H), 1,64 (m, 4H), 1,31 (s, br, 1H), 1,26 - 1,12 (m, 2H), 0,90 (d, J = 6,4 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 139,0, 138,3, 124,4, 61,7, 49,5, 46,3, 34,6, 34,0, 31,1, 27,4, 21,9; MS (ESI) m/z 327,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



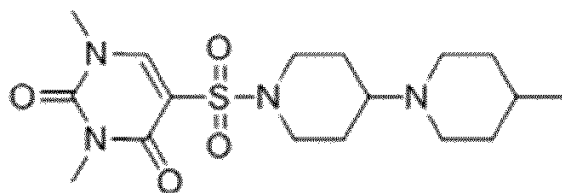
1-(mesitilsulfonil)-4-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina: Este compuesto se obtuvo como un gel incoloro (> 95 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción entre 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina (1,0 mmol) y cloruro de 2,4,6-trimetilbencenosulfonilo (1,1 mmol) en CH_2Cl_2 en presencia de N, N-diisopropil etil-amina (1,5 mmol). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,91 (s, 2 H), 3,23 - 3,04 (m, 4 H), 2,85 (d, J = 12,2 Hz, 2 H), 2,59 (s, 6 H), 2,57 - 2,48 (m, 4 H), 2,26 (s, 3 H), 2,22 (s, 3 H), 2,19 (m, 1 H), 1,89 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 1,69 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 1,51 (qd, J = 12,3, 3,9 Hz, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,4, 131,9, 131,3, 61,4, 55,3, 48,4, 46,1, 44,7, 28,0, 23,0, 21,0; MS (ESI) m/z 366,2 (60 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 414,2 (100 %, $[\text{M}+\text{K}]^+$).



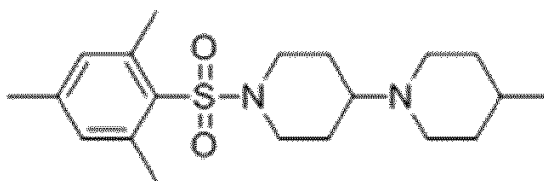
1'-((6-cloropiridin-3-il)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (80 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 6-cloropiridina-3-sulfonilo. pf 178 - 182 °C ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,75 (s, 1H), 7,99 (dd, J = 8,4, 2,3 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,87 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 2,81 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 2,35 (t, J = 12,0 Hz, 2H), 2,25 (t, J = 11,4 Hz, 1H), 2,14 (t, J = 11,3 Hz, 2H), 1,89 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 1,75 - 1,58 (m, 4H), 1,33 (s, br, 1H), 1,21 (m, 2H), 0,91 (d, J = 6,6 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 155,6, 148,6, 137,7, 132,1, 124,7, 61,3, 49,5, 46,0, 34,4, 30,9, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 358,1(100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



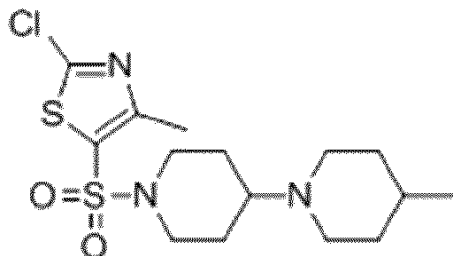
1'-((5-bromopiridin-3-il)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (79 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 5-bromopiridina-3-sulfonilo. pf 171 173 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,81 (s, 2 H), 8,18 (t, J = 2,0 Hz, 1 H), 3,89 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,81 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,39 (td, J = 12,0, 2,5 Hz, 2 H), 2,25 (d, J = 11,9 Hz, 1 H), 2,14 (t, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,90 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 1,78 - 1,57 (m, 4 H), 1,43 - 1,29 (m, 1 H), 1,20 (m, 2 H), 0,91 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 154,4, 146,2, 137,4, 134,5, 121,0, 61,2, 49,5, 46,0, 34,5, 31,0, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 402,1 (100 %, $[\text{M}]^+$), 404,1 (100 %, $[\text{M}+2]^+$).



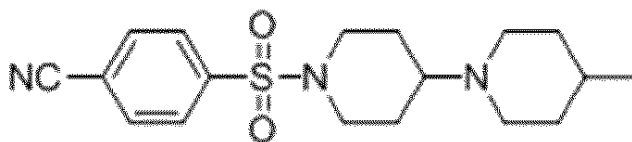
1,3-dimetil-5-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (78 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-sulfonylo. pf 212 - 215 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (s, 1H), 3,94 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 3,50 (s, 3 H), 3,35 (s, 3 H), 2,93 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,85 (t, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,56 (t, J = 11,7 Hz, 1 H), 2,26 (t, J = 11,9 Hz, 2 H), 1,92 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 1,75 - 1,58 (m, 4H), 1,48 - 1,20 (m, 3H), 0,93 (d, J = 6,0 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 158,2, 150,8, 148,1, 112,6, 61,6, 49,2, 46,0, 33,8, 30,7, 28,3, 27,5, 21,7; MS (ESI) m/z 385,2 (100 %, [M+H]⁺).



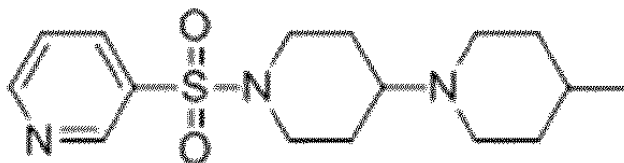
1'-(mesitilsulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido de color amarillo (> 95 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 2,4,6-trimetilbenceno-1-sulfonylo. pf 62 - 65 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,94 (s, 2 H), 3,62 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,85 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,75 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,61 (s, 6 H), 2,34 (t, J = 11,5 Hz, 1 H), 2,29 (s, 3 H), 2,12 (t, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,86 (d, J = 11,1 Hz, 2H), 1,63 (d, J = 13,4 Hz, 2 H), 1,50 (qd, J = 12,3, 4,0 Hz, 2H), 1,39 - 1,27 (s, br, 1 H), 1,27 - 1,13 (m, 2 H), 0,90 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 142,4, 140,4, 131,8, 131,7, 61,8, 49,6, 44,0, 34,6, 31,0, 27,7, 22,8, 21,9, 20,9; MS (ESI) m/z 365,2 (100 %, [M+H]⁺).



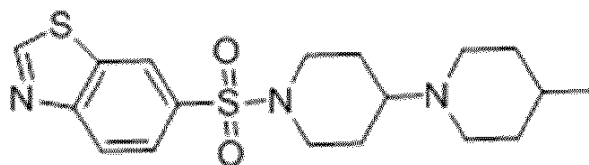
2-cloro-4-metil-5-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)tiazol: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (64 %) mediante cromatografía rápida (1:19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 2-cloro-4-metiltiazol-5-sulfonylo. pf 117 - 119 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,85 (d, J = 13,5 Hz, 2 H), 2,82 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,60 (s, 3 H), 2,53 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,34 (t, J = 11,9 Hz, 1 H), 2,15 (t, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,91 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,65 (m, 4 H), 1,45 - 1,29 (m, 1 H), 1,22 (m, 2 H), 0,89 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 155,4, 154,4, 128,9, 61,3, 49,5, 46,0, 34,3, 30,9, 27,3, 21,8, 16,8; MS (ESI) m/z 378,1 (100 %, [M+H]⁺).



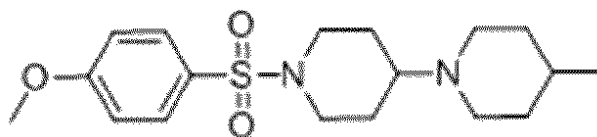
4-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)benzonitrilo: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (86 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4-cianobenceno-1-sulfonylo. pf 184 - 186 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,84 (q, J = 8,5 Hz, 4 H), 3,85 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 2,77 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,31 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,22 (tt, J = 11,6, 3,6 Hz, 1 H), 2,11 (t, J = 12,2 Hz, 2 H), 1,85 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,71 - 1,55 (m, 4 H), 1,31 (m, 1 H), 1,25 - 1,10 (m, 2 H), 0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 140,9, 132,8, 128,1, 117,3, 116,4, 61,2, 49,5, 46,1, 34,6, 31,0, 27,4, 21,8; MS (ESI) m/z 348,2 (100 %, [M+H]⁺).



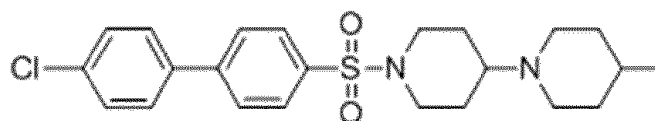
4-metil-1'-(piridin-3-ilsulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (86 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de piridina-3-sulfonilo. pf 144 - 147 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,98 (s, 1 H), 8,82 (d, J = 4,9 Hz, 1 H), 8,04 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,49 (dd, J = 8,0, 4,9 Hz, 1 H), 3,88 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,78 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 2,32 (td, J = 12,0, 2,4 Hz, 2 H), 2,22 (tt, J = 11,6, 3,6 Hz, 1H), 2,12 (t, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,86 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 1,75 - 1,55 (m, 4 H), 1,31 (m, 1 H), 1,17 (qd, J = 12,0, 3,7 Hz, 2 H), 0,89 (d, J = 6,5 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 153,3, 148,4, 135,2, 133,1, 123,7, 61,3, 49,5, 46,0, 34,5, 31,0, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 324,2 (100 %, [M+H]⁺).



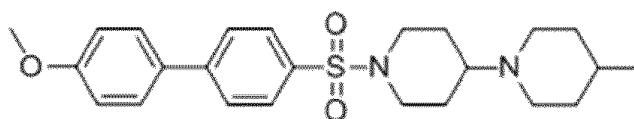
6-((4-metil-1,4'-bipiperidin-1'-il)sulfonil)benzo[d]tiazol: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (93 %) mediante cromatografía rápida (MeOH 1: 19 : CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de benzo[d]tiazol-6-sulfonilo. pf 197 - 199 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,19 (s, 1 H), 8,41 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 8,24 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 7,86 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1 H), 3,89 (d, J = 12,3, 2 H), 2,75 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 2,45 - 2,02 (m, 5 H), 1,84 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 1,76 - 1,51 (m, 4 H), 1,44 - 1,05 (m, 3 H), 0,87 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 157,8, 155,5, 134,3, 133,5, 125,2, 124,1, 122,4, 61,4, 49,4, 46,2, 34,4, 30,9, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 380,1 (100 %, [M+H]⁺).



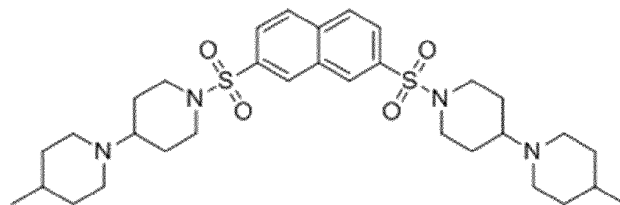
1'-((4-metoxifenil)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (94 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 4-metoxibenceno-1-sulfonilo. pf 109 - 112 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,83 - 3,74 (d, J = 12,0 Hz, 2H), 2,76 (d, J = 11,7 Hz, 2H), 2,28 - 2,04 (m, 5H), 1,88 - 1,75 (d, J = 12,9 Hz, 2H), 1,72 - 1,54 (m, 4H), 1,28 (m, 1H), 1,23 - 1,08 (m, 2H), 0,87 (d, J = 6,3 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 162,9, 129,8, 127,6, 114,1, 61,5, 55,6, 49,5, 46,2, 34,6, 31,0, 27,3, 21,9; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M+H]⁺).



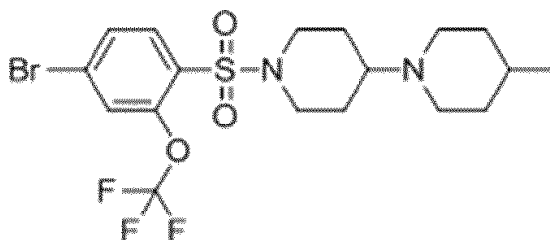
1'-((4'-cloro-[1,1'-bifenil]-4-il)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (87 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4'-cloro-[1,1'-bifenil]-4-sulfonilo. pf 205 - 207 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 - 7,75 (m, 2 H), 7,67 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,51 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,43 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 3,87 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,76 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 2,41 - 2,02 (m, 5 H), 1,83 (dd, J = 12,3, 3,6 Hz, 2 H), 1,70 - 1,46 (m, 4 H), 1,37 - 1,05 (m, 3 H), 0,87 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 144,2, 137,7, 135,1, 134,7, 129,2, 128,5, 128,3, 127,4, 61,4, 49,5, 46,2, 34,6, 31,0, 27,3, 21,8; MS (ESI) m/z 433,2 (100 %, [M+H]⁺).



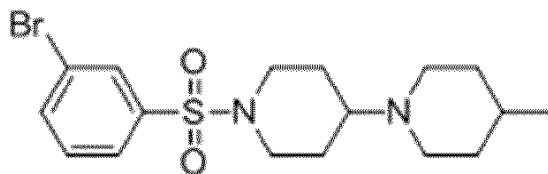
1'-((4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (92 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-sulfonyl. pf 195 -198 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,85 - 7,72 (m, 2 H), 7,66 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,53 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 7,04 - 6,88 (m, 2 H), 3,88 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 2,76 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,40 - 1,95 (m, 5 H), 1,83 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 1,71 - 1,48 (m, 4 H), 1,29 (m, 1 H), 1,23 - 1,04 (m, 2 H), 0,87 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 160,0, 145,1, 133,9, 131,6, 128,4, 128,2, 126,9, 114,5, 61,5, 55,4, 49,5, 46,2, 34,6, 31,0, 27,4, 21,9; MS (ESI) m/z 429,2 (100 %, [M+H]⁺).



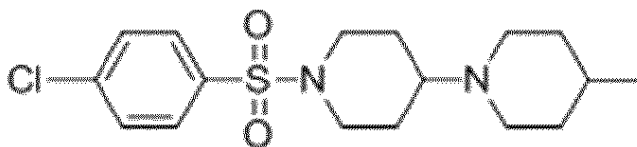
2,7-bis((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1-il)sulfonyl)naftaleno: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (92 %) mediante cromatografía rápida (MeOH 1: 19: CH₂Cl₂) después de la reacción del 4-metil-1,4'-bipiperidina (0,39 mmol) con el dicloruro de naftaleno-2,7-disulfonyl (0,15 mmol) en CH₂Cl₂ (2,5 ml) en presencia de N, N-diisopropil etilamina (0,52 mmol). pf 265 - 268 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,42 (s, 2 H), 8,04 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 7,89 (dd, J = 8,6, 1,7 Hz, 2 H), 3,92 (d, J = 12,3 Hz, 4 H), 2,75 (d, J = 11,7 Hz, 4 H), 2,32 (td, J = 12,1, 2,4 Hz, 4 H), 2,25 - 1,99 (m, 6 H), 1,84 (d, J = 11,5 Hz, 4 H), 1,72 - 1,51 (m, 8 H), 1,37 - 1,21 (m, 2 H), 1,21 - 1,07 (m, 4 H), 0,86 (d, J = 6,3 Hz, 6 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 136,0, 135,5, 131,3, 129,7, 129,2, 125,8, 61,4, 49,5, 46,2, 34,5, 31,0, 27,4, 21,8; MS (ESI) m/z 617,3 (100 %, [M+H]⁺).



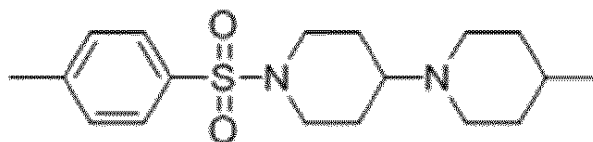
1'-((4-bromo-2-(trifluorometoxi)fenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido amarillo (67 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 4-bromo-2-(trifluorometoxi)benceno-1-sulfonyl. pf 108 - 110 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,83 (d, J = 8,9 Hz, 1 H), 7,58 - 7,45 (m, 2 H), 3,85 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,78 (dt, J = 11,9, 3,3 Hz, 2 H), 2,59 (td, J = 12,5, 2,5 Hz, 2 H), 2,29 (tt, J = 11,5, 3,6 Hz, 1 H), 2,11 (td, J = 11,5, 2,4 Hz, 2 H), 1,82 (dt, J = 12,7, 2,7 Hz, 2 H), 1,69 - 1,45 (m, 4 H), 1,40 - 1,24 (m, 1 H), 1,23 - 1,05 (m, 2 H), 0,88 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 146,2, 132,7, 130,1, 129,8, 127,9, 123,90, 121,3, 61,5, 49,5, 45,7, 34,59, 31,0, 27,8, 21,8; MS (ESI) m/z 485,1 (100 %, [M+H]⁺).



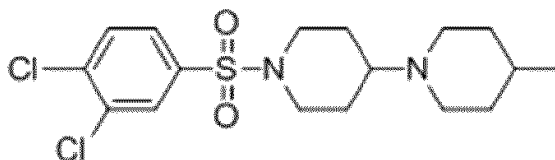
1'-((3-bromofenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido blanco (65 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 3-bromobenceno-1-sulfonyl. pf 125 - 126 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,85 (s, 1 H), 7,66 (dd, J = 13,3, 7,9 Hz, 2 H), 7,37 (t, J = 7,9 Hz, 1 H), 3,80 (d, J = 11,7 Hz, 2 H), 2,74 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,16 (dt, J = 73,4, 11,4 Hz, 5 H), 1,81 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,60 (td, J = 12,4, 8,1 Hz, 4 H), 1,27 (dt, J = 11,0, 5,9 Hz, 1 H), 1,20 - 1,02 (m, 2 H), 0,85 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 138,2, 135,7, 130,5, 130,3, 126,1, 123,1, 61,3, 49,5, 46,1, 34,6, 31,0, 27,4, 21,9; MS (ESI) m/z 401,1 (100 %, [M+]⁺), 403,1 (100 %, [M+2]⁺).



1'-((4-clorofenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido blanco (67%) mediante recristalización en una mezcla de CH₂Cl₂ y hexano después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4-clorobenceno-1-sulfonyl. pf 152 - 155 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,66 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,47 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 3,93 - 3,69 (m, 2 H), 2,80 (dt, J = 11,6, 3,4 Hz, 2 H), 2,23 (td, J = 12,0, 2,5 Hz, 3 H), 2,15 (t, J = 11,3 Hz, 2 H), 1,84 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 1,71 - 1,54 (m, 4 H), 1,42 - 1,26 (m, 1 H), 1,25 - 1,12 (m, 2 H), 0,87 (d, J = 6,2 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 139,3, 134,6, 129,3, 129,0, 61,4, 49,4, 46,0, 34,2, 30,8, 27,2, 21,7; MS (ESI) m/z 357,2 (100 %, [M+H]⁺).



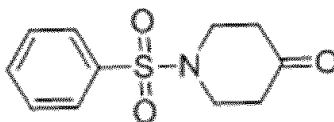
4-metil-1'-tosil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido blanco (67 %) mediante recristalización en una mezcla de CH₂Cl₂ y hexano después de la reacción entre el 4-metil-1,4'-bipiperidina y el cloruro de 4-metilbenceno-1-sulfonyl. pf 139 - 142 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,59 (d, J = 8,2 Hz, 2 H), 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 2 H), 3,80 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 2,79 (d, J = 11,1 Hz, 2 H), 2,39 (s, 3 H), 2,30 - 2,07 (m, 5 H), 1,84 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 1,69 - 1,53 (m, 4 H), 1,40 - 1,09 (m, 3 H), 0,86 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 143,5, 132,9, 129,6, 127,7, 61,6, 49,4, 46,0, 34,1, 30,8, 27,1, 21,7, 21,5; MS (ESI) m/z 337,2 (100 %, [M+H]⁺).



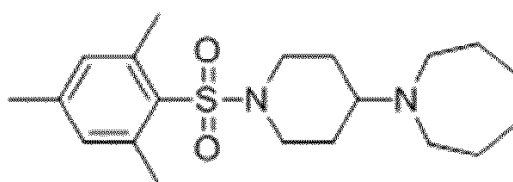
1'-((3,4-diclorofenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido marrón claro (86 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) después de la reacción entre 4-metil-1,4'-bipiperidina y cloruro de 3,4-diclorobenceno-1-sulfonyl. pf 160 162 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (d, J = 1,9 Hz, 1 H), 7,66 - 7,44 (m, 2 H), 3,81 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 2,76 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 2,29 (td, J = 11,9, 2,5 Hz, 2 H), 2,20 (tt, J = 11,5, 3,5 Hz, 1 H), 2,10 (td, J = 11,5, 2,4 Hz, 2 H), 1,84 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 1,62 (ddt, J = 16,3, 12,5, 5,6 Hz, 4 H), 1,28 (tdd, J = 12,8, 10,3, 5,5 Hz, 1 H), 1,15 (qd, J = 11,8, 11,2, 3,7 Hz, 2 H), 0,87 (d, J = 6,5 Hz, 3H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 137,5, 136,2, 133,8, 131,1, 129,4, 126,6, 61,3, 49,5, 46,1, 34,6, 31,0, 27,4, 21,8; MS (ESI) m/z 391,1 (100 %, [M+H]⁺).

III. Procedimiento general para la preparación de sulfonamidas a partir de cloruros de sulfonyl y sales de hidrocloreto de amina

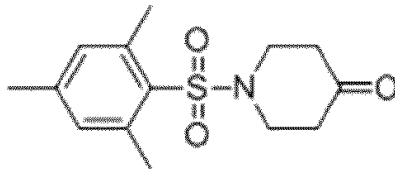
Cloruro de sulfonyl (1,2 mmol), sal hidrocloreto de amina (1,0 mmol), CHCl₃ (2 mL), agua (2 mL) y K₂CO₃ (2,5 mmol) se añadieron secuencialmente a un matraz de 15 mL. La solución de reacción bifásica se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 20 horas, después de lo cual la solución de reacción se transfirió a un embudo separador y se añadieron 25 mL de solución saturada de NaHCO₃. La solución bifásica resultante se extrajo por CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice con una mezcla de hexano: EtOAc (o MeOH: CH₂Cl₂) como eluyente para proporcionar el producto sulfonamida.



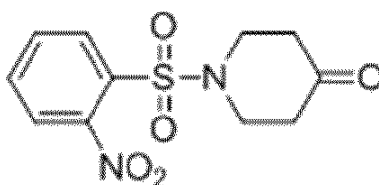
1-(fenilsulfonyl)piperidin-4-ona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (93 %) mediante cromatografía rápida (1: 1 Hexano: EtOAc). pf 105 108 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,85 - 7,73 (m, 2 H), 7,66 - 7,58 (m, 1 H), 7,58 - 7,48 (m, 2 H), 3,39 (t, J = 6,2 Hz, 4 H), 2,52 (t, J = 6,2 Hz, 4 H); ¹³C RMN (126MHz, CDCl₃) δ 205,6, 136,3, 133,2, 129,3, 127,5, 45,9, 40,7. Los datos analíticos fueron consistentes con el informe de la literatura (Ellis, GL y otros J. Med. Chem. 2008, 51, 2170-2177).



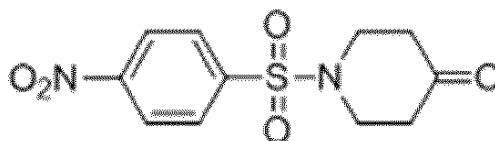
1-(1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)azepano: Este compuesto se obtuvo como un gel naranja (90 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,94 (s, 2 H), 3,71 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 3,62 (s, br, 1 H), 3,18 - 2,89 (s, 4 H), 2,77 (t, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,58 (s, 6 H), 2,29 (s, 3 H), 2,10 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 1,82 (s, 4 H), 1,76 - 1,54 (m, 6 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 142,8, 140,3, 132,0, 132,0, 132,0, 131,5, 63,3, 51,2, 43,8, 26,9, 26,6, 26,4, 22,8, 21,0. MS (ESI) m/z 365,2 (100%, [M+H]⁺).



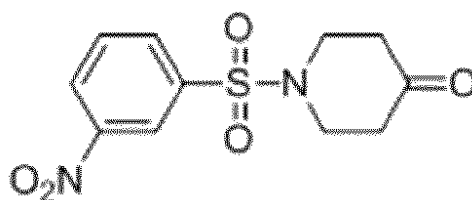
1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-ona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (95 %) mediante cromatografía rápida ((1: 19 MeOH: CH₂Cl₂). pf 102-105 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,95 (s, 2 H), 3,50 (t, J = 6,2 Hz, 4 H), 2,61 (s, 6 H), 2,52 (t, J = 6,2 Hz, 4 H), 2,29 (s, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 201,6, 138,3, 135,6, 127,4, 126,8, 39,6, 36,3, 18,1, 16,2; MS (ESI) m/z 282,1 (100 %, [M+H]⁺).



1-((2-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (88 %) mediante cromatografía rápida ((1: 19 MeOH: CH₂Cl₂). pf 107 - 109 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,13 - 7,96 (m, 1 H), 7,81 - 7,58 (m, 3 H), 3,64 (t, J = 6,3 Hz, 4 H), 2,63 - 2,45 (t, J = 6,3 Hz, 4 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 205,4, 134,1, 131,9, 131,9, 130,9, 124,4, 45,5, 41,2; MS (ESI) m/z 285,0 (100 %, [M+H]⁺).



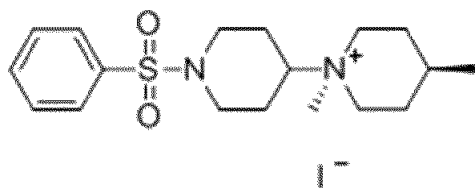
1-((4-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (82 %) mediante cromatografía rápida ((1: 19 MeOH: CH₂Cl₂). pf 192 - 195 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,47 - 8,33 (m, 2 H), 7,98 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 3,46 (t, J = 6,2 Hz, 4 H), 2,56 (t, J = 6,2 Hz, 4 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 204,5, 150,4, 142,7, 128,6, 124,6, 45,8, 40,7; MS (ESI) m/z 285,1 (100 %, [M+H]⁺).



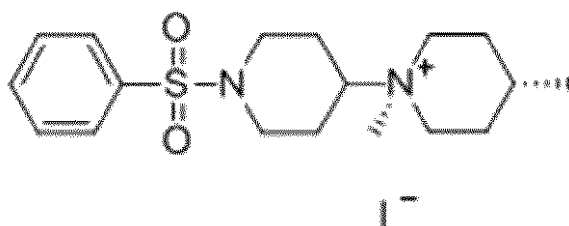
1-((3-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (90 %) mediante cromatografía rápida ((1: 19 MeOH: CH₂Cl₂). pf 141 - 143 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,60 (s, 1 H), 8,48 - 8,43 (m, 1 H), 8,14 - 8,07 (m, 1 H), 7,78 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 3,46 (t, J = 6,2 Hz, 4 H), 2,56 (t, J = 6,2 Hz, 4 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 204,6, 148,5, 139,1, 132,8, 130,8, 127,6, 122,5, 45,8, 40,7; MS (ESI) m/z 285,1 (100 %, [M+H]⁺).

IV. Procedimiento general para la metilación de aminas terciarias

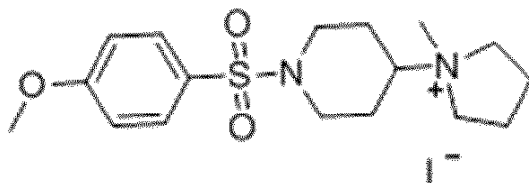
La amina terciaria (0,1 mmol) se disolvió en acetonitrilo (3 mL) y se añadió CH₃I (0,3 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a reflujo durante 4 horas. Tras la evaporación del disolvente orgánico al vacío, se obtuvo la sal de amonio cuaternario correspondiente sin purificación adicional a menos que se indique de cualquier otra forma.



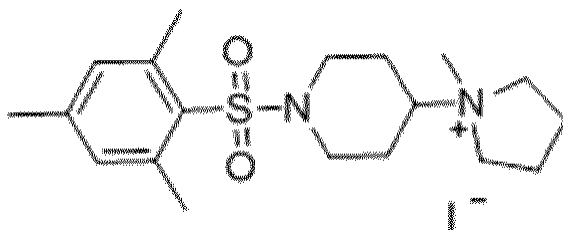
yoduro de 1,4-dimetil-1-(1-(fenilsulfonil)piperidin-4-il)piperidin-1-io (N-metil y C-metil son trans): Este isómero trans se obtuvo como un sólido amarillo (58 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 EtOH: CH₂Cl₂) después de la metilación del 4-metil-1'-(fenilsulfonil)-1,4'-bipiperidina. pf 201-204 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,73 (m, 3 H), 7,65 (m, 2 H), 3,78 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,36 (d, J = 12,0 Hz, 3 H), 3,07 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,84 (s, 3 H), 2,18 (t, J = 12,4 Hz, 4 H), 1,78 (qd, J = 12,0, 3,9 Hz, 2 H), 1,67 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 1,54 (m, 3H), 0,91 (d, J = 4,0 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 135,1, 133,9, 130,0, 128,0, 72,0, 58,5, 45,6, 41,1, 27,9, 27,6, 24,6, 20,7; MS (ESI) m/z 337,2 (100%, [M]⁺).



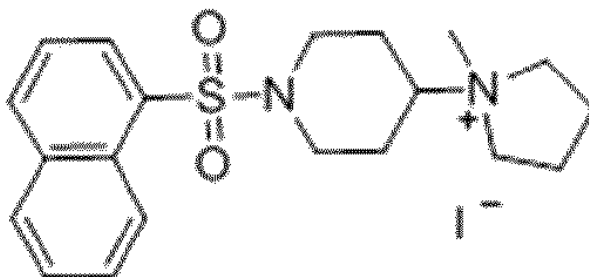
yoduro de 1,4-dimetil-1-(1-(fenilsulfonil)piperidin-4-il) piperidin-1-io (N-metil y C-metil son cis): Este isómero cis se obtuvo como un sólido blanco (28 %) mediante cromatografía rápida (EtOH 1: 9: CH₂Cl₂) después de la metilación de 4-metil-1'-(fenilsulfonil)-1,4'-bipiperidina. pf 264 - 266 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,74 (m, 3 H), 7,65 (m, 2 H), 3,75 (m, 3 H), 3,53 (d, J = 16,0 Hz, 2 H), 3,16 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,81 (s, 3 H), 2,40 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 1,99 (d, J = 12,0, 2 H), 1,75 (m, 2 H), 1,51 (m, 5 H), 0,87 (d, J = 4,0 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 135,8, 133,8, 130,1, 128,0, 59,8, 58,3, 47,2, 45,0, 28,0, 26,9, 24,0, 20,5; MS (ESI) m/z 337,2 (100 %, [M-I]⁺).



Yoduro de 1-(1-(4-metoxifenil)sulfonyl)piperidin-4-il)-1-metilpirrolidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (>95 %). pf 82 - 85 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,67 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,15 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 3,72 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,49 (dd, J = 12,0, 8,0 Hz, 2 H), 3,30 (s, br, 3 H), 2,79 (s, 3 H), 2,17 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,02 (m, 6 H), 1,84 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, DMSO-d₆) δ 163,4, 130,3, 126,6, 115,1, 70,1, 63,5, 56,3, 45,4, 43,3, 26,2, 21,3; MS (ESI) m/z 339,2 (100 %, [M-I]⁺).



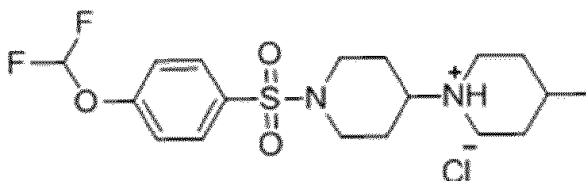
Yoduro de 1-(1-(mesitilsulfonil)piperidin-4-il)-1-metilpirrolidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (83 %). pf 263 - 266 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,07 (s, 2 H), 3,60-3,43 (m, 5 H), 3,34 (dd, J = 19,2, 8,0 Hz, 2 H), 2,80 (s, 3 H), 2,73 (td, J = 12,6, 2,1 Hz, 2 H), 2,56 (s, 6 H), 2,25 (s, 3 H), 2,05 (m, 6 H), 1,71 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, DMSO-d₆) δ 143,1, 140,1, 132,4, 131,6, 70,6, 63,4, 43,4, 43,2, 26,5, 22,8, 21,2, 20,9; MS (ESI) m/z 351,2 (100 %, [M-I]⁺).



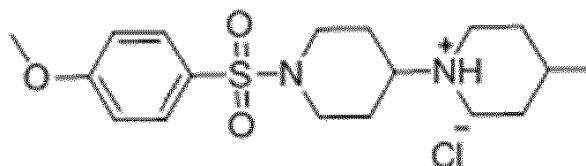
Yoduro de 1-metil-1-(1-(naftalen-1-ilsulfonil)piperidin-4-il) pirrolidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (91 %), pf 285 - 288 °C; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (dd, J = 8,4, 1,2 Hz, 1 H), 8,29 (dd, J = 8,4, 1,2 Hz, 1 H), 8,12 (m, 2 H), 7,69 (m, 3 H), 3,90 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 3,46 (dd, J = 9,6, 4,8 Hz, 2 H), 3,26 (m, 3 H), 2,75 (s, 3 H), 2,42 (s, 1 H), 2,02 (m, 7 H), 1,78 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, DMSO-d₆) δ 135,2, 134,5, 132,1, 130,8, 129,6, 128,7, 128,6, 127,5, 125,2, 125,0, 70,1, 63,4, 45,0, 43,2, 26,6, 21,2; MS (ESI) m/z 359,2 (100 %, [M-I]⁺).

V. Procedimiento general para la preparación de sales de hidrócloruro de amina terciaria

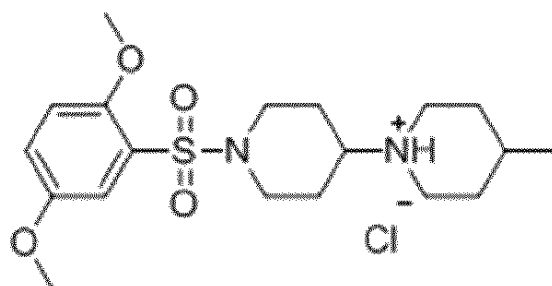
La amida terciaria (0,5 mmol) se disolvió en una cantidad mínima de DCM y la solución resultante se agitó vigorosamente durante la cual se añadió gota a gota HCl en 1,4-dioxano (4 M, 2 mL). Tras la eliminación de los disolventes, se obtuvo la sal del ácido clorhídrico de la amina del título como un sólido blanco sin purificación adicional.



Cloruro de 1-(1-((4-(difluorometoxi)fenil)sulfonil) piperidin-4-il)-4-metilpiperidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (>95 %), pf 251 - 254 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 12,08 (s, 1 H), 7,73 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,25 (d, J = 7,9 Hz, 2 H), 6,63 (t, J = 72,4 Hz, 1 H), 3,93 (d, J = 9,9 Hz, 2 H), 3,33 (d, J = 9,8 Hz, 2 H), 3,03 (s, 1 H), 2,70 (s, 2 H), 2,35 (d, J = 11,7 Hz, 4 H), 2,20 - 1,90 (m, 2 H), 1,81 (t, J = 15,8 Hz, 4 H), 1,55 (s, 1 H), 0,99 (d, J = 6,0 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 154,5, 132,4, 129,7, 119,7, 115,2 (triplete), 62,8, 49,5, 45,1, 30,7, 29,7, 25,3, 20,9; MS (ESI) m/z 389,2 (100 %, [M-Cl]⁺).



Cloruro de 1-(1-((4-metoxifenil)sulfonil)piperidin-4-il)-4-metilpiperidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (>95 %), pf 247 - 250 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 12,03 (s, 1 H), 7,63 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 6,98 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), 3,98 - 3,87 (s, 2 H), 3,85 (s, 3 H), 3,30 (s, 2 H), 2,99 (s, 1 H), 2,72 (s, 2 H), 2,30 (s, 4 H), 2,10 - 1,92 (s, 2 H), 1,78 (m, 4 H), 1,55 (s, 1 H), 1,13 - 0,89 (s, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 163,4, 129,8, 126,8, 114,5, 63,0, 55,8, RMN 49,4, 45,2, 30,8, 29,8, 25,3, 20,9; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M-Cl]⁺).



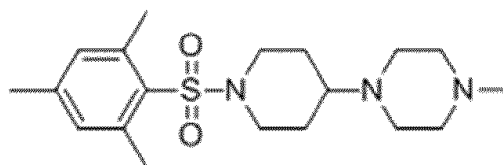
Cloruro de 1-((2,5-dimetoxifenil)sulfonyl)piperidin-4-il)-4-metilpiperidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (73 %), pf 207 - 210 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 11,90 (s, 1 H), 7,31 (s, 1 H), 6,96 (d, J = 32,2 Hz, 2 H), 4,16 - 3,90 (s, 2 H), 3,83 (s, 3 H), 3,73 (s, 3 H), 3,24 (d, br, J = 75,5 Hz, 3H), 2,70 (s, 4 H), 2,46 - 2,18 (s, 2 H), 2,16 - 1,90 (s, 2 H), 1,88 - 1,68 (s, 4 H), 1,69 - 1,41 (s, 1 H), 0,96 (s, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 152,98, 150,81, 126,50, 120,42, 115,98, 114,02, 63,41, 57,05, 56,07, 49,66, 45,11, 30,79, 29,68, 26,09, 20,93; MS (ESI) m/z 383,2, (100 %, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$).

Cloruro de 1-((1-mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)-4-metilpiperidin-1-io: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (69 %), pf 259 - 262 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 11,73 (s, 1 H), 6,85 (s, 2 H), 3,93 - 3,46 (s, br, 2 H), 3,33 (s, br, 3 H), 2,74 (s, 3 H), 2,46 (s, 6 H), 2,18 (d, J = 4,3 Hz, 5 H), 2,06 - 1,07 (m, 8 H), 0,89 (s, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,99, 140,20, 132,08, 131,01, 63,44, 49,91, 43,52, 30,77, 29,54, 25,70, 22,85, 20,96; MS (ESI) m/z 365,2 (100 %, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$).

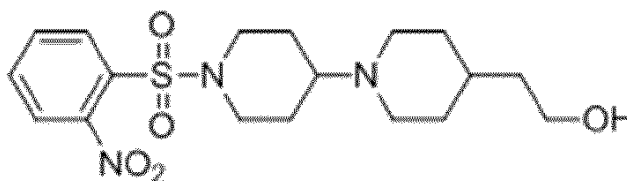
La Figura 30 muestra espectros de RMN de compuestos ejemplificados.

VI. Procedimiento general para la aminación reductiva

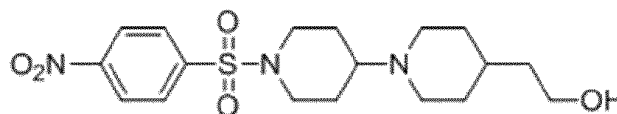
Una mezcla de cetona (o acetona) (1,0 mmol), amina (1,0 mmol), AcOH (1,0 mmol), y CH_2Cl_2 (o DCE) (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de que se añadió $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1,5 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente con un tiempo de reacción que varió de 20 horas a 89 horas. Después, la reacción se inactivó mediante la adición gota a gota de la solución saturada de NaHCO_3 a 0 °C y la solución bifásica generada se extrajo mediante CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice con una mezcla MeOH: CH_2Cl_2 (o hexano: EtOAc) como eluyente para proporcionar el producto de aminación reductiva.



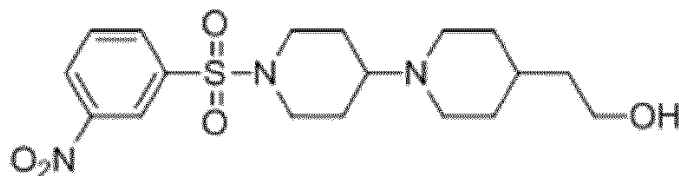
1-((1-mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)-4-metilpiperazina: Este compuesto se obtuvo como un gel incoloro (74 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la aminación reductora entre 1-((mesitilsulfonyl)piperidin-4-ona y 1-metilpiperazina con el tiempo de reacción de 20 horas. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,91 (s, 2 H), 3,59 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 2,73 (t, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,58 (s, 6 H), 2,55 (s, br, 4 H), 2,49 - 2,35 (s, br, 4 H), 2,36 - 2,29 (s, 1 H), 2,26 (s, 3 H), 2,25 (s, 3 H), 1,84 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,59 - 1,34 (m, 2 H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,4, 131,8, 131,7, 61,2, 55,3, 48,9, 45,9, 43,7, 27,8, 22,8, 20,9; MS (ESI) m/z 366,2 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



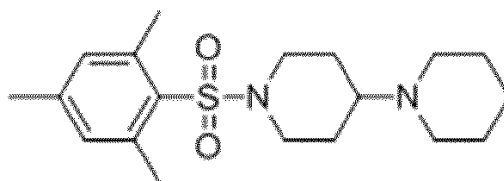
2-((2-nitrofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido (37 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH_2Cl_2) después de la aminación reductora entre 1-((2-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona y 2-(piperidin-4-il)etanol con el tiempo de reacción de 38 horas. pf 130 - 133 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,96 (d, J = 7,3 Hz, 1 H), 7,74 - 7,61 (m, 2 H), 7,61 - 7,51 (m, 1 H), 3,88 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 3,65 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 2,82 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,73 (t, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,33 (tt, J = 11,5, 3,6 Hz, 1 H), 2,14 (t, J = 11,6 Hz, 2 H), 1,84 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 1,73 - 1,65 (m, 2 H), 1,59 (qd, J = 12,3, 4,2 Hz, 3 H), 1,48 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,38 (m, 1 H), 1,20 (qd, J = 12,1, 3,8 Hz, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 148,3, 133,5, 131,8, 131,5, 130,9, 124,0, 61,4, 60,5, 49,4, 45,9, 39,4, 32,6, 32,6, 27,7; MS (ESI) m/z 398,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



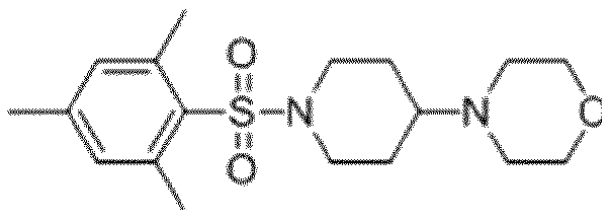
2-(1'-((4-nitrofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido (20 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la aminación reductora del 1-((4-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona y 2-(piperidin-4-il)etanol con el tiempo de reacción de 71 horas, pf 126 - 129 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,36 (d, J = 8,8 Hz, 2 H), 7,92 (d, J = 8,9 Hz, 2 H), 3,88 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 3,66 (t, J = 6,5 Hz, 2 H), 2,82 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,33 (td, J = 11,9, 2,2 Hz, 2 H), 2,25 (m, 1 H), 2,14 (t, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,87 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,66 (m, 4 H), 1,48 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,40 (m, 1H), 1,32 - 1,13 (m, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 150,1, 142,4, 128,7, 124,3, 61,2, 60,4,49,4,46,1, 39,3, 32,5, 27,3; MS (ESI) m/z 398,2 (100 %, [M+H]⁺).



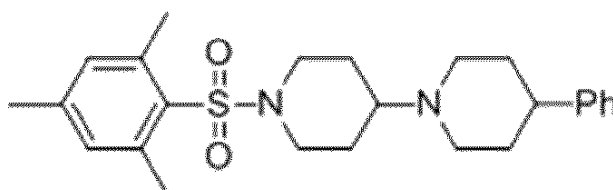
2-(1'-((3-nitrofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo pálido (25 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la aminación reductora del 1-((3-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona y 2-(piperidin-4-il)etanol con el tiempo de reacción de 64 horas, pf 128 -131 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,59 (s, 1 H), 8,46 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 8,09 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,77 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 3,92 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 3,68 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 2,84 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 2,35 (t, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,27 (tt, J = 11,6, 3,5 Hz, 1 H), 2,16 (t, J = 11,7 Hz, 3 H), 1,89 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 1,69 (m, 4 H), 1,50 (q, J = 6,7 Hz, 2 H), 1,47 - 1,35 (m, 1 H), 1,23 (qd, J = 12,0, 3,8 Hz, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 148,3, 138,8, 133,0, 130,5, 127,2, 122,6, 61,2, 60,4, 49,4, 46,1, 39,2, 32,5, 32,4, 27,3; MS (ESI) m/z 398,2 (100 %, [M+H]⁺).



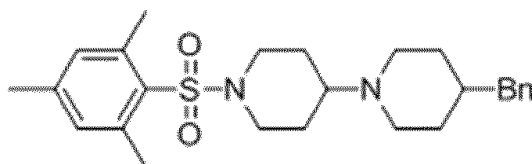
1'-(mesitisulfonyl)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un gel incoloro (67 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la aminación reductora entre el 1-(mesitisulfonyl)piperidina-4-ona y la piperidina con un tiempo de reacción de 24 horas. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,93 (s, 2 H), 3,62 (d, J = 11,7 Hz, 2 H), 2,74 (t, J = 12,1 Hz, 2 H), 2,60 (s, 6 H), 2,52 - 2,40 (s, 4 H), 2,38 - 2,30 (m, 1 H), 2,28 (s, 3 H), 1,85 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 1,56 (m, 4 H), 1,52 - 1,44 (m, 2 H), 1,41 (m, 2 H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 142,4, 140,4, 131,8, 131,8, 62,2, 50,2, 44,1, 27,5, 26,3, 24,6, 22,8, 20,9; MS (ESI) m/z 351,2 (100 %, [M+H]⁺).



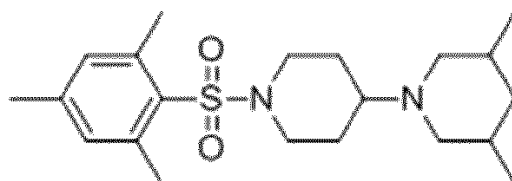
4-(1-(mesitisulfonyl)piperidin-4-il)morfolina: Este compuesto se obtuvo como un gel incoloro (74 %) mediante cromatografía rápida (1: 9 MeOH: CH₂Cl₂) después de la aminación reductora entre el 1-(mesitisulfonyl)piperidin-4-ona y la morfolina con un tiempo de reacción de 89 horas. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,92 (s, 2 H), 3,68 (s, 4 H), 3,60 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 2,75 (t, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,59 (s, 6 H), 2,55 - 2,45 (s, 4 H), 2,27 (s, 4 H), 1,87 (d, J = 14,5 Hz, 2 H), 1,46 (qd, J = 11,6, 3,4 Hz, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 142,5, 140,4, 140,4, 131,9, 131,6, 67,1, 61,5, 49,7, 43,6, 27,7, 22,8, 20,9; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M+H]⁺).



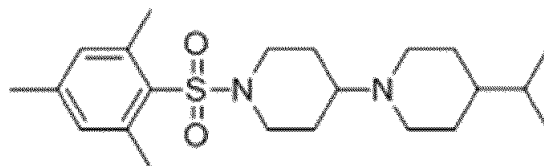
1'-(mesitilsulfonil)-4-fenil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco (90 %) mediante cromatografía rápida (2: 1 Hexano: EtOAc) después de la aminación reductora entre el 1-(mesitilsulfonil)piperidin-4-ona y la 4-fenilpiperidina con un tiempo de reacción de 48 horas. pf 141 - 144 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,34 - 7,26 (m, 2 H), 7,25 - 7,16 (m, 3 H), 6,95 (s, 2 H), 3,66 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 3,03 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,78 (t, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,62 (s, 6 H), 2,47 (m, 2 H), 2,30 (s, 3 H), 2,30 - 2,20 (m, 2 H), 1,99 - 1,66 (m, 6 H), 1,56 (qd, J = 12,2, 4,3 Hz, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,5, 131,9, 131,7, 128,4, 126,8, 126,2, 61,9, 50,0, 44,0, 42,9, 33,7, 27,7, 22,8, 21,0; MS (ESI) m/z 427,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



4-bencil-1'-(mesitilsulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite marrón claro (68 %) mediante cromatografía rápida (2: 1 hexano: EtOAc) después de la aminación reductora entre 1-(mesitilsulfonil)piperidin-4-ona y 4-bencilpiperidina con un tiempo de reacción de 48 horas. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36 - 7,22 (m, 2 H), 7,21 - 7,06 (m, 3 H), 6,92 (s, 2 H), 3,61 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,92 (s, 2 H), 2,72 (td, J = 12,5, 2,4 Hz, 2 H), 2,58 (s, 6 H), 2,50 (d, J = 7,0 Hz, 2 H), 2,40-2,26(s, br, 1 H), 2,28 (s, 3 H), 2,08 (t, J = 17,9 Hz, 1 H), 1,85 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 1,64 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 1,49 (d, J = 11,5 Hz, 3 H), 1,41 - 1,12 (s, br, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,5, 140,4, 131,9, 131,7, 129,1, 128,2, 125,8, 61,9, 49,6, 44,0, 43,1, 38,1, 32,3, 27,6, 22,8, 21,0; MS (ESI) m/z 441,3 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

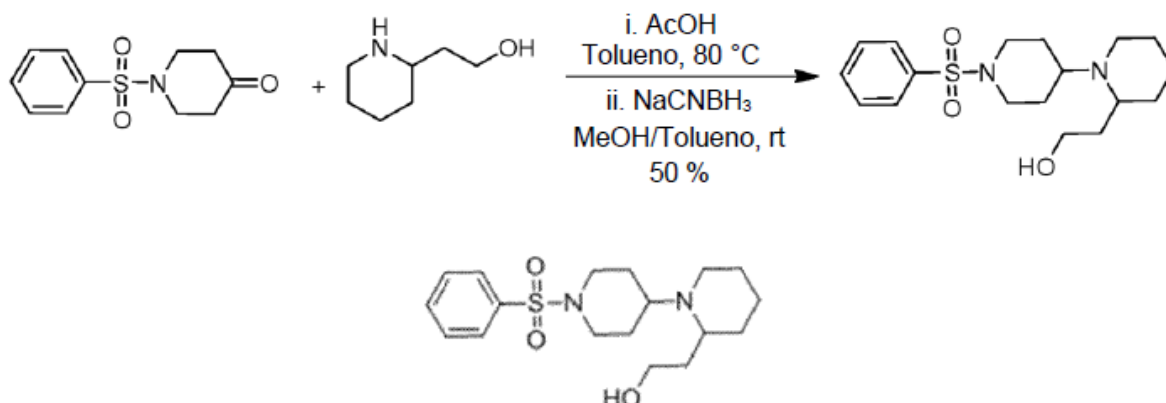


1'-(mesitilsulfonil)-3,5-dimetil-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite incoloro (36 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) después de la aminación reductora entre la 3,5-dimetilpiperidina y el 1-(mesitilsulfonil)piperidin-4-ona con un tiempo de reacción de 88 horas. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,92 (s, 2 H), 3,61 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,87 - 2,66 (m, 4 H), 2,59 (s, 6 H), 2,47 - 2,29 (m, 1 H), 2,27 (s, 3 H), 1,82 (d, J = 13,6 Hz, 2 H), 1,74 - 1,39 (m, 7 H), 0,81 (d, J = 5,8 Hz, 6 H), 0,47 (q, J = 11,4 Hz, 1 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,4, 140,4, 131,8, 131,8, 61,8, 57,2, 44,1, 42,3, 31,4, 27,5, 22,8, 20,9, 19,7; MS (ESI) m/z 379,3 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



4-isopropil-1'-(mesitilsulfonil)-1,4'-bipiperidina: Este compuesto se obtuvo como un aceite amarillo (46 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) después de la aminación reductora entre la 4-isopropilpiperidina y el 1-(mesitilsulfonil)piperidin-4-ona con un tiempo de reacción de 30 horas. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,91 (s, 2 H), 3,60 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,90 (dd, J = 11,5 Hz, 2 H), 2,72 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,59 (d, J = 2,3 Hz, 6 H), 2,38 - 2,29 (m, 1 H), 2,28 (s, 3 H), 2,06 (t, J = 10,6 Hz, 2 H), 1,85 (d, J = 11,2 Hz, 2 H), 1,63 (d, J = 11,3 Hz, 2 H), 1,49 (td, J = 12,1, 4,1 Hz, 2 H), 1,44 - 1,32 (m, 1 H), 1,30 - 1,14 (m, 2 H), 0,95 (m, 1 H), 0,83 (d, J = 6,7 Hz, 6 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,4, 140,4, 131,8, 131,7, 61,8, 50,0, 44,0, 42,6, 32,4, 29,6, 27,7, 22,8, 20,9, 19,8; MS (ESI) m/z 393,3(100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

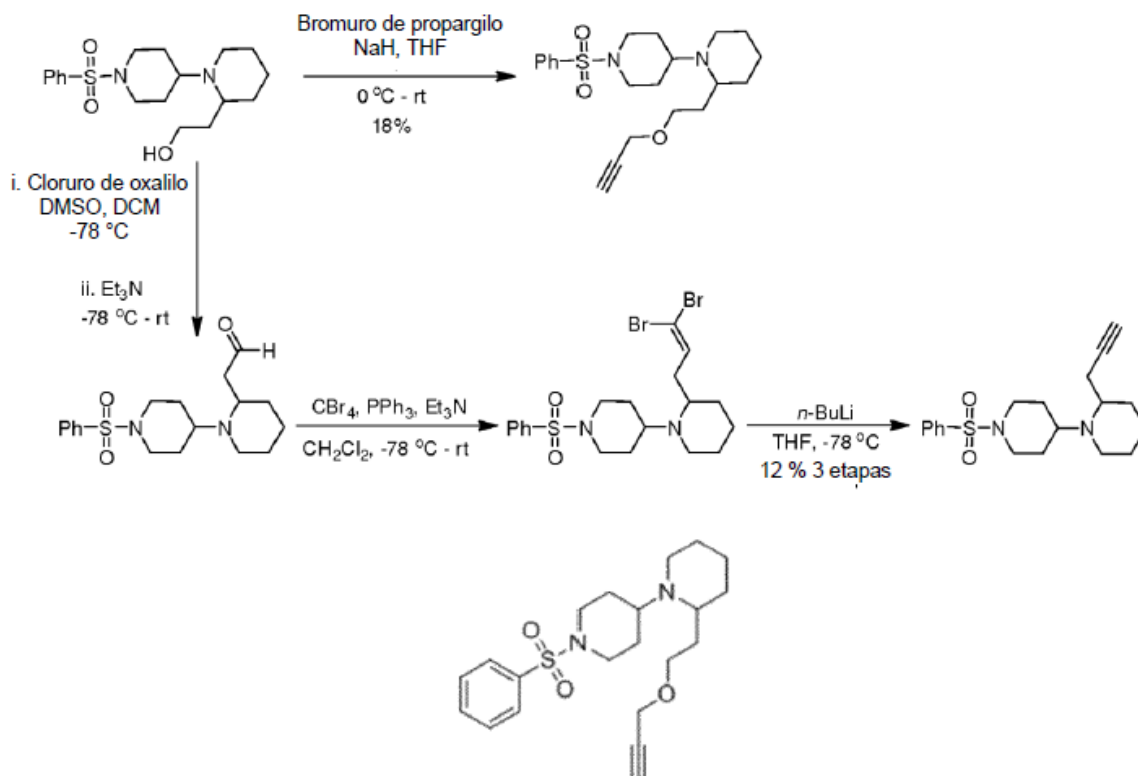
VII. Síntesis de 1'-(fenilsulfonil)-2-(2-(prop-2-in-1-iloxi)etil)-1,4'-bipiperidina y 1'-(fenilsulfonil)-2-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina



20 **2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-2-il)etan-1-ol:** 1-(fenilsulfonil)piperidin-4-ona (0,6004 g, 2,51 mmol) y se disolvieron 2-(piperidin-2-il)etan-1-ol (0,9701 g, 7,52 mmol) en tolueno (5 mL), seguido de la adición de AcOH (0,62 mL, 10,84 mmol). La solución resultante se agitó a 80 °C durante 3 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió NaCNBH₃ (0,2031 g, 3,22 mmol) en metanol (5 mL) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. La reacción se inactivó con solución saturada de NaHCO₃ (20 mL) a 0 °C. La solución bifásica resultante se extrajo mediante CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice con una mezcla de 1: 19 MeOH: CH₂Cl₂ como eluyente para proporcionar el producto de aminación reductiva como un aceite amarillo (0,4445 g, 50 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (d, J = 8,5 Hz, 2 H), 7,65 - 7,57 (m, 1 H), 7,56 - 7,47 (m, 2 H), 3,86 (dd, J = 11,1, 4,7 Hz, 3 H), 3,64 (dt, J = 11,1, 5,6 Hz, 1 H), 3,05 - 2,87 (m, 3 H), 2,44 - 2,30 (m, 2 H), 2,26 (td, J = 12,1, 2,5 Hz, 1 H), 1,88 - 1,29 (m, 12 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 135,9, 132,9, 129,1, 127,6, 60,7, 56,7, 56,0, 46,1, 45,8, 44,9, 31,1, 29,7, 28,5, 25,0, 24,2, 22,4; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M+H]⁺).

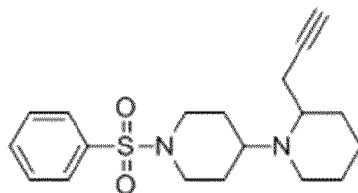
25

30



65 **1'-(fenilsulfonil)-2-(2-(prop-2-in-1-ilo)etil)-1,4'-bipiperidina:** 2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidina]-2-il)etan-1-ol (0,0830 g, 0,24 mmol) se disolvió en THF anhidro (2 mL), seguido de la adición de NaH (60 %, 0,0192 g, 0,48 mmol) a 0 °C. El matraz se enjuagó inmediatamente con flujo de argón y se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. La solución de reacción se agitó a 0 °C durante 15 minutos y se añadió bromuro de propargilo (80 %

en tolueno, 0,075 mL, 0,67 mmol) por medio de una jeringa. La solución de reacción se agitó a 0 °C durante otros 30 minutos y se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas antes de que se introdujera una segunda porción de NaH (60 %, 0,0175 g, 0,44 mmol) en THF anhidro (1 mL). La solución de reacción se agitó después durante 18 horas a temperatura ambiente y se añadió agua (10 mL) para inactivar la reacción, seguido de la extracción con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Después de la purificación mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:19 CH₃OH: CH₂Cl₂), el producto se obtuvo como un gel amarillo (0,0132 g, 18 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,82 - 7,69 (m, 2 H), 7,64 - 7,56 (m, 1 H), 7,53 (m, 2 H), 4,06 (d, J = 2,4 Hz, 2 H), 3,83 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 3,58 - 3,37 (m, 2 H), 2,73 (dd, J = 39,3, 10,5 Hz, 3 H), 2,35 (t, J = 2,4 Hz, 1 H), 2,25 (dtd, J = 26,4, 12,1, 11,7, 2,9 Hz, 3 H), 1,88 - 1,70 (m, 4 H), 1,69 - 1,19 (m, 8 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 136,0, 132,8, 129,1, 127,6, 79,6, 74,4, 67,1, 58,2, 55,5, 55,0, 46,4, 45,9, 45,4, 30,3, 29,8, 29,7, 25,6, 24,2, 23,0; MS (ESI) m/z 391,2 (100 %, [M+H]⁺).

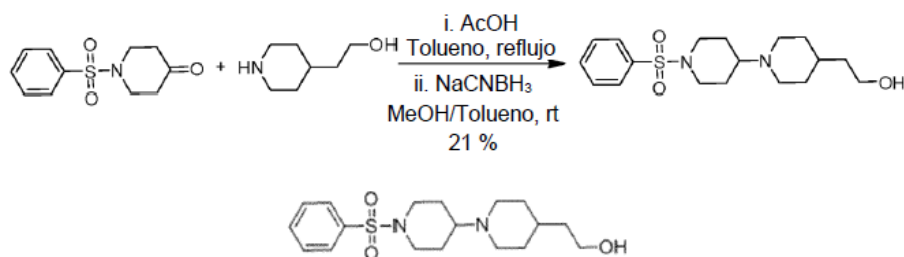


1'-(fenilsulfonil)-2-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina: Un matraz secado al fuego de 25 mL equipado con una barra de agitación magnética se purgó con argón y después se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. CH₂Cl₂ anhidro (1 mL) y cloruro de oxalilo (0,039 mL, 0,45 mmol) se añadieron secuencialmente por medio de una jeringa. La solución resultante se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco - acetona. Se introdujo DMSO anhidro (0,066 mL, 0,93 mmol) y la solución se agitó durante 1,5 horas a -78 °C. 2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-2-il)etanol (0,1344 g, 0,38 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ anhidro se añadió gota a gota. Después la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora, se añadió Et₃N (0,20 mL, 1,44 mmol) y después de 15 minutos, se dejó que la solución de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, antes de ser inactivado con 6 mL de agua. Se añadió solución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y la solución resultante se generó por CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el intermedio aldehído que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

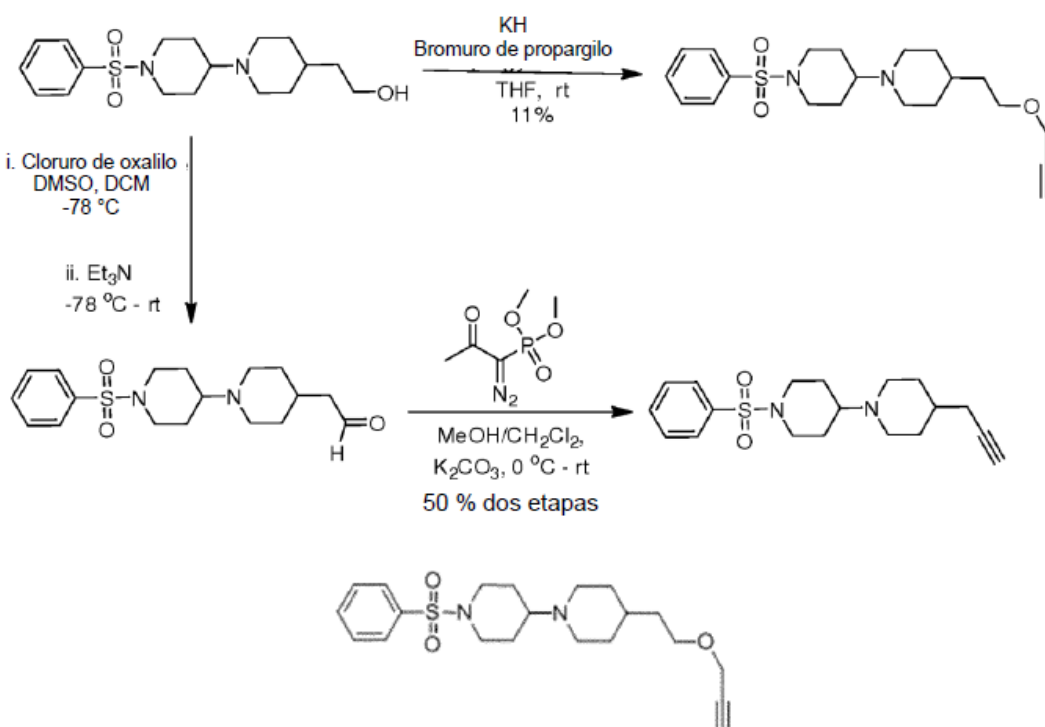
A una solución de trifenilfosfina (0,4429 g, 1,69 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL), se añadió gota a gota una solución de tetrabromuro de carbono (0,2653 g, 0,80 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL) a temperatura ambiente y la solución resultante se agitó durante 30 minutos, después de lo que se añadió Et₃N (0,45 mL, 3,39 mmol) por medio de una jeringa. La solución se enfrió después a -78 °C bajo lo que se añadió gota a gota el intermedio aldehído anterior disuelto en CH₂Cl₂ (2 mL). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche antes de filtrarse a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía rápida (dos veces, 1:19 CH₃OH: CH₂Cl₂ después 1:1 de hexano: EtOAc) para proporcionar el dibromuro correspondiente (0,0505 g) como un aceite incoloro.

El dibromuro anterior se disolvió en THF anhidro (1 mL) y se enfrió a -78 °C. Se introdujo n-BuLi (0,090 mL, 2,5 M en hexano, 0,225 mmol) por medio de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas a la misma temperatura y se inactivó mediante la adición de solución de NH₄Cl (15 mL) saturada. La mezcla se extrajo después con EtOAc (3 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron mediante Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (1:1 hexano: EtOAc) para proporcionar el alquino final (0,0165 g, 12 % en tres etapas). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,82 - 7,70 (m, 2 H), 7,63 - 7,57 (m, 1 H), 7,57 - 7,50 (m, 2 H), 3,85 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 2,78 - 2,57 (m, 3 H), 2,36 - 2,19 (m, 4 H), 1,94 (t, J = 2,7 Hz, 1 H), 1,89 - 1,39 (m, 9 H), 1,35 - 1,19 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 136,2, 232,7, 129,0, 127,6, 82,1, 70,0, 56,4, 55,5, 46,5, 46,0, 45,2, 31,8, 30,1, 26,0, 24,2, 23,2, 21,7; MS (ESI) m/z 347,2 (100 %, [M+H]⁺).

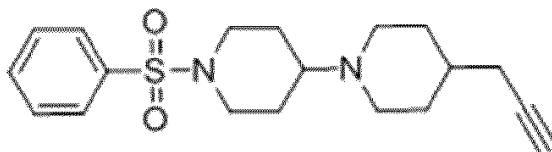
VIII. Síntesis de 1'-(fenilsulfonil)-4-(2-(prop-2-in-1-ilo)etil)-1,4'-bipiperidina y 1'-(fenilsulfonil)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina



2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: 1-(fenilsulfonil)piperidin-4-ona (0,4923 g, 2,06 mmol) y AcOH (0,24 mL, 4,20 mmol) se disolvieron en tolueno (4 mL) y la solución resultante se agitó en condiciones de reflujo durante 30 minutos, seguido de la adición de 2-(piperidin-4-il)etanol (0,2562 g, 1,99 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más bajo condiciones de reflujo y después se enfrió a temperatura ambiente. El NaCNBH₃ (0,1590 g, 2,52 mmol) en metanol (4 mL) se añadió gota a gota y la solución se agitó durante 50 minutos. La reacción se inactivó con solución saturada de NaHCO₃ (10 mL) a 0 °C. La solución resultante se extrajo mediante CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La cromatografía rápida en gel de sílice (1:19 CH₃OH:CH₂Cl₂) proporcionó el producto deseado como un aceite amarillo (0,1613 g, 21 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 - 7,72 (m, 2 H), 7,62 - 7,56 (m, 1 H), 7,53 (ddt, J = 8,4, 6,7, 1,4 Hz, 2 H), 3,85 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 3,66 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 2,81 (d, J = 11,6 Hz, 2 H), 2,32 - 2,04 (m, 5 H), 1,83 (d, J = 13,0 Hz, 3 H), 1,75 - 1,54 (m, 4 H), 1,49 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,45 - 1,32 (m, 1 H), 1,29 - 1,14 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 136,1, 132,7, 129,0, 127,6, 61,4, 60,4, 49,4, 46,1, 39,3, 32,5, 27,3; MS (ESI) m/z 353,2 (100 %, [M+H]⁺).



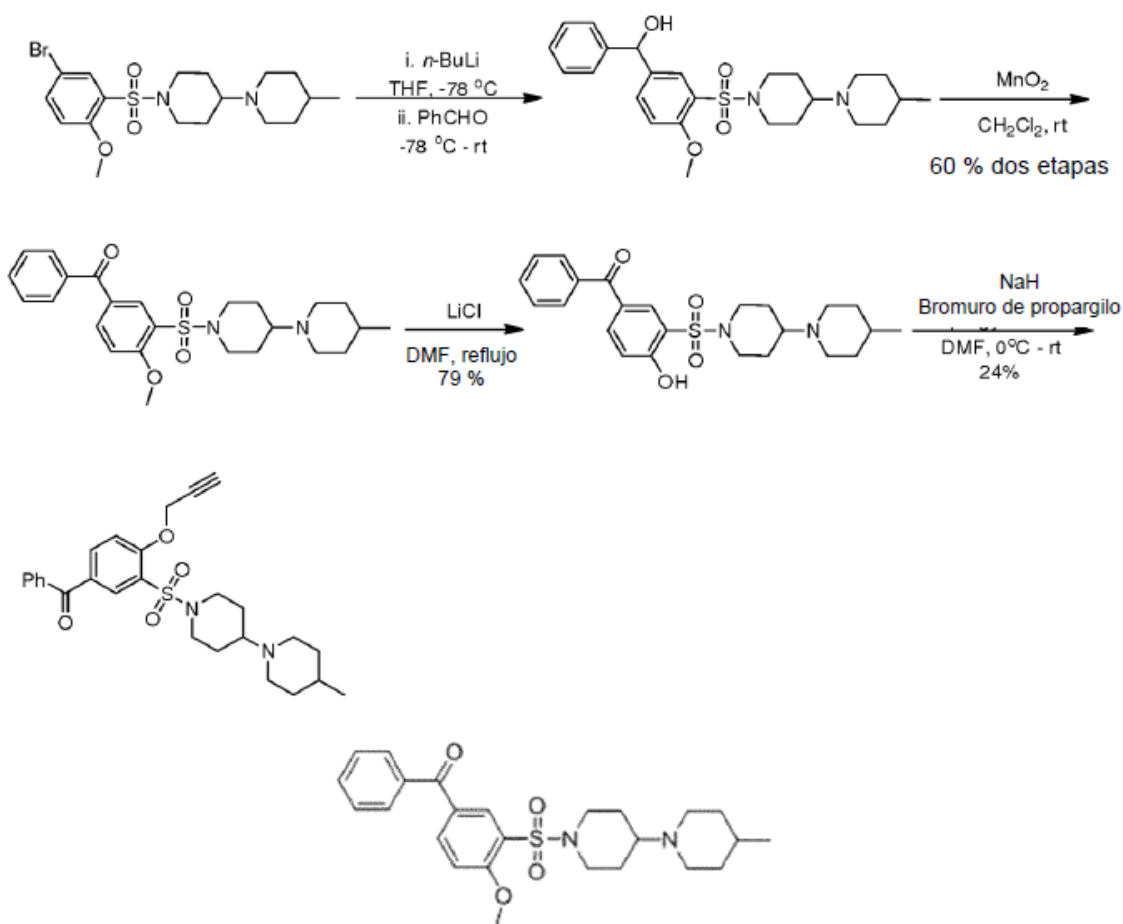
1'-(fenilsulfonil)-4-(2-(prop-2-in-1-ilo)etil)-1,4'-bipiperidina: 2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidina]-4-il)etanol (0,0585 g, 0,17 mmol) se disolvió en THF anhidro (1 mL). El matraz se lavó inmediatamente con flujo de argón y se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. Se añadió KH (30 % en aceite mineral, 0,0275 g, 0,21 mmol) suspendido en THF anhidro (0,5 mL) por medio de una jeringa a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y se añadió gota a gota bromuro de propargilo (80 % en tolueno, 0,038 mL, 0,43 mmol) por medio de una jeringa. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 7,5 horas. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:19 CH₃OH: CH₂Cl₂) proporcionó el producto deseado como un gel amarillo (0,0072 g, 11 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,83 - 7,69 (m, 2 H), 7,63 - 7,57 (m, 1 H), 7,57 - 7,49 (m, 2 H), 4,11 (d, J = 2,3 Hz, 2 H), 3,95 - 3,80 (m, 2 H), 3,53 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 2,85 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 2,41 (t, J = 2,4 Hz, 1 H), 2,22 (m, 5 H), 1,87 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 1,79 - 1,59 (m, 4 H), 1,52 (q, J = 6,5 Hz, 2 H), 1,45 - 1,36 (m, 1 H), 1,25 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 136,06, 132,74, 129,01, 127,63, 79,89, 74,18, 67,58, 61,57, 58,05, 49,34, 46,08, 35,88, 32,57, 32,15, 27,11; MS (ESI) m/z 391,1 (100 %, [M+H]⁺).



1'-(fenilsulfonil)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina: Un matraz secado al fuego de 25 mL, equipado con una barra de agitación magnética se purgó con argón y después se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. CH₂Cl₂ anhidro (1,5 mL) y cloruro de oxalilo (0,10 mL, 2 M en CH₂Cl₂, 0,20 mmol) se añadieron secuencialmente por medio de una jeringa. La solución resultante se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco - acetona. Se introdujo el DMSO anhidro (0,030 mL, 0,42 mmol) y la solución se agitó durante 40 minutos a -78 °C. 2-(1'-(fenilsulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol (0,0570 g, 0,16 mmol) se añadió gota a gota en 1,5 mL del CH₂Cl₂ anhidro. Después la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 2 horas, se añadió Et₃N (0,085 mL, 0,61 mmol) y la solución de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, antes de inactivarse mediante 25 mL de solución saturada de NaHCO₃. La solución resultante se generó por CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el intermedio aldehído que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

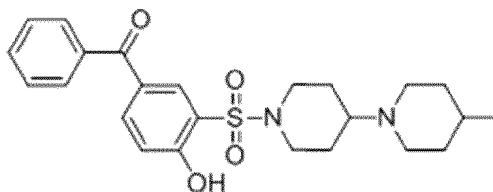
El reactivo Bestmann Ohira (dimetil (1-diazo-2-oxopropil) fosfonato) se preparó de antemano de acuerdo con el procedimiento experimental informado por Pietruszka, J. y otros. [Pietruszka, J. y otros. Synthesis 2006, 24, 4266-4268]. El reactivo Bestmann Ohira (0,0441 g, 0,023 mmol) y metanol (2 mL) se mezclaron a 0 °C, seguido de la adición de aldehído (disuelto en 0,5 mL de CH₂Cl₂) y K₂CO₃ (0,0523 g, 0,38 mmol). La solución de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La solución de suspensión se filtró y se vertió en un embudo de decantación, se diluyó con 25 mL de CH₂Cl₂, se lavó con NaOH 1 N (25 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:9 CH₃OH: CH₂Cl₂) para proporcionar el producto del título como un sólido amarillo (0,0282 g, 50 %). Si el producto no es lo suficientemente puro, podría sonicarse con una pequeña cantidad de hexano y el sobrenadante de la capa de hexano podría eliminarse con una pipeta de vidrio para eliminar las impurezas. pf 109 - 111 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,82 - 7,73 (m, 2 H), 7,67 - 7,59 (m, 1 H), 7,55 (dd, J = 8,4, 7,0 Hz, 2 H), 3,88 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 2,84 (s, 2 H), 2,35 - 2,03 (m, 7 H), 1,97 (t, J = 2,7 Hz, 1 H), 1,92 - 1,74 (m, 4 H), 1,67 (tt, J = 15,6, 7,8 Hz, 2 H), 1,46 (s, br, 1 H), 1,30 (s, br, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 136,1, 132,8, 129,0, 127,6, 82,5, 69,5, 61,6, 49,1, 46,0, 35,4, 31,5, 27,0, 25,2; MS (ESI) m/z 347,2 (100 %, [M+H]⁺).

IX. Síntesis de (3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonil)-4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)(fenil)metanona

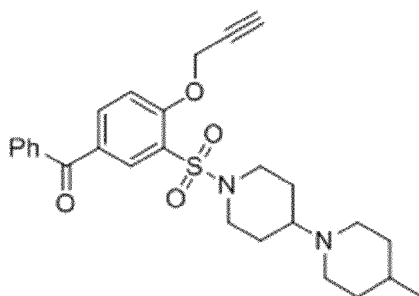


(4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenil)(fenil)metanona: A un matraz secado al fuego de 25 mL equipado con una barra de agitación magnética se añadieron 1'-((5-bromo-2-metoxifenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina (0,3686 g, 0,86 mmol) y THF anhidro (2,5 mL). El matraz se purgó con argón y después se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. La solución resultante se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco - acetona y se introdujo n-BuLi (0,68 mL, 2,5 M en hexano, 1,70 mmol) por medio de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 50 minutos a la temperatura. Se añadió benzaldehído (0,125 mL, 1,23 mmol) por medio de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos antes de que se dejara calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. Después, la reacción se inactivó mediante 20 mL de solución saturada de NaHCO₃ y la solución resultante se generó por CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (1:19 metanol: CH₂Cl₂) para proporcionar el alcohol intermedio como gel incoloro.

Se añadió dióxido de manganeso (IV) (2,0087 g, 22,32 mmol) a una solución del intermedio alcohol en CH₂Cl₂ (7 mL). La solución en suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas. La mezcla de reacción se filtró después a través de una almohadilla de Celite y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el producto deseado como un sólido blanco (0,2329 g, 60 % en dos etapas). pf 52 - 56 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,33 (d, J = 2,2 Hz, 1 H), 8,04 (dd, J = 8,6, 2,2 Hz, 1 H), 7,82 - 7,67 (m, 2 H), 7,67 - 7,54 (m, 1 H), 7,48 (m, 2 H), 7,09 (d, J = 8,7 Hz, 1 H), 4,00 (s, 3 H), 3,91 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,79 (d, J = 11,1 Hz, 2 H), 2,63 (td, J = 12,5, 2,4 Hz, 2 H), 2,30 (tt, J = 11,6, 3,2 Hz, 1 H), 2,12 (t, J = 10,2 Hz, 2 H), 1,81 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,60 - 1,48 (m, 4 H), 1,29 (m, 1 H), 1,18 (qd, J = 11,6, 7,9 Hz, 2 H), 0,88 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 194,3, 159,9, 137,2, 136,4, 133,8, 132,6, 129,9, 129,8, 128,5, 127,0, 112,0, 61,8, 56,4, 49,5, 45,9, 34,6, 31,0, 28,0, 21,9; MS (ESI) m/z 457,1 (100 %, [M+H]⁺).



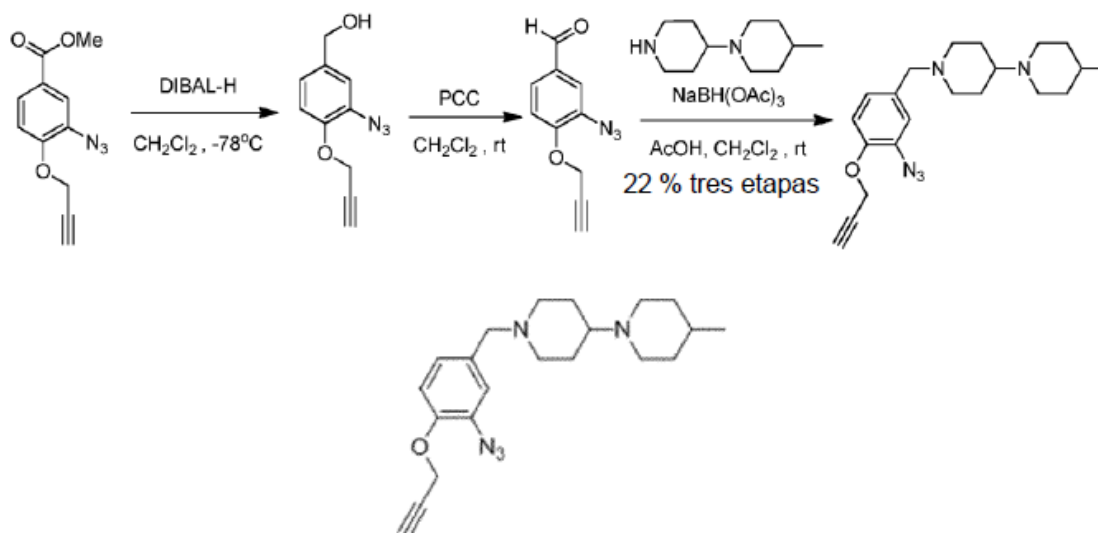
(4-hidroxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenil)(fenil)metanona: LiCl (0,0672 g, 1,6 mmol) en un matraz de 15 mL se secó al fuego bajo vacío y el matraz se volvió a llenar después con argón. (4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenil)(fenil)metanona (0,0733 g, 0,16 mmol) en DMF anhidra (3 mL) se añadió al matraz por medio de una jeringa. El matraz se equipó después con un condensador de reflujo equipado con un globo de argón. La reacción se llevó a cabo bajo condiciones de reflujo durante 21,5 horas. Después la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de una almohadilla de Celite, se lavó mediante CH₂Cl₂. Después de la evaporación de los disolventes, el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:19 metanol: CH₂Cl₂) para proporcionar el producto deseado como un sólido naranja (0,0560 g, 79 %). pf 153 - 156 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,11 (d, J = 2,1 Hz, 1 H), 7,91 (dd, J = 8,6, 2,2 Hz, 1 H), 7,75 - 7,69 (m, 2 H), 7,63 - 7,55 (m, 1 H), 7,48 (ddd, J = 8,2, 6,6, 1,3 Hz, 2 H), 7,21 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 3,94 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 3,32 (d, J = 11,3 Hz, 2 H), 3,06 (t, J = 12,3 Hz, 1 H), 2,79 - 2,50 (m, 4 H), 2,25 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 1,83 (s, br, 6 H), 1,57 (m, 1 H), 0,98 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 194,3, 161,0, 137,4, 136,9, 133,2, 132,5, 129,7, 128,5, 128,1, 122,6, 119,1, 62,7, 49,5, 44,8, 30,9, 29,1, 26,0, 20,7; MS (ESI) m/z 443,1 (100 %, [M+H]⁺).



(3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)-4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)(fenil)metanona: (4-hidroxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenil)(fenil)metanona (0,1103 g, 0,25 mmol) se disolvió en DMF anhidro (1,5 mL), seguido de la adición de NaH (95 %, 0,0095 g, 0,38 mmol) a 0 °C. El matraz se enjuagó inmediatamente con flujo de argón y se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. La solución de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. La solución se enfrió después a 0 °C y se añadió bromuro de propargilo (80 % en tolueno, 0,032 mL, 0,29 mmol) por medio de una jeringa. La solución se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante 17 horas. La solución de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó mediante una solución saturada de NaHCO₃ (25 mL) y solución de LiCl al 20 % (25 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La cromatografía rápida en gel de sílice (metanol 1:19: CH₂Cl₂) proporcionó el producto deseado como un aceite amarillo (0,0290 g, 24 %). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 8,37 (d, J = 2,2 Hz, 1 H), 8,07 (dd, J = 8,6, 2,2 Hz, 1 H), 7,76 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 2 H), 7,67 - 7,58 (m, 1 H), 7,51 (t, J = 7,7 Hz, 2

H), 7,24 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 4,93 (d, J = 2,4 Hz, 2 H), 3,96 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,89 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,72 (t, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,62 (t, J = 2,3 Hz, 1 H), 2,46 (s, 1 H), 2,24 (t, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,90 (d, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,73 - 1,56 (m, 4 H), 1,44 - 1,27 (m, 3 H), 0,93 (d, J = 5,8 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 194,2, 157,6, 137,0, 136,1, 133,9, 132,7, 130,8, 129,8, 128,5, 127,7, 113,5, 77,4, 77,4, 62,0, 56,8, 49,4, 45,9, 34,2, 30,9, 27,8, 21,7; MS (ESI) m/z 481,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

X. Síntesis de 1'-(3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-metil-1,4'-bipiperidina

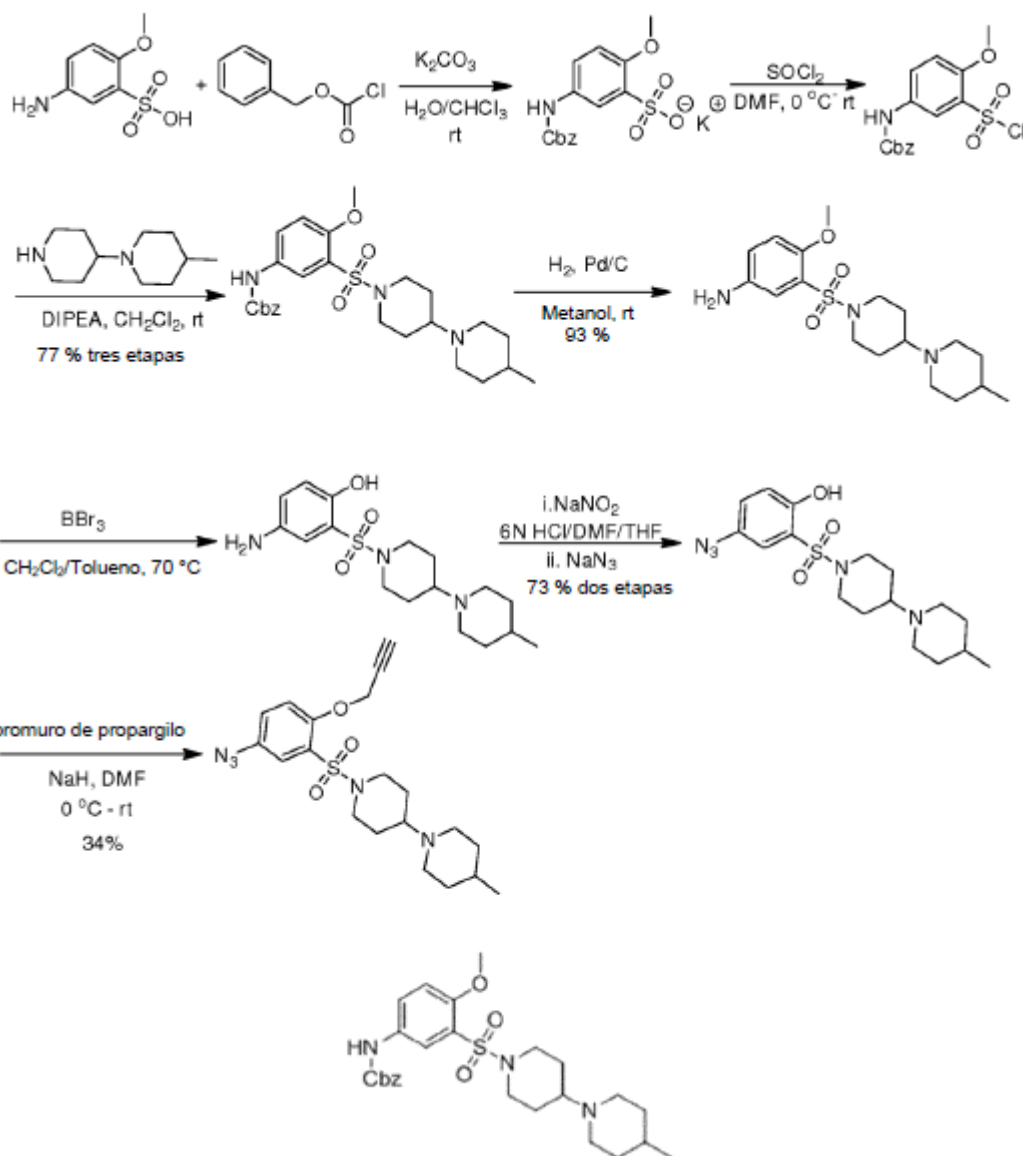


1'-(3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)bencil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Metil 3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzoato (0,1085 g, 0,47 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL) y la solución se enfrió a -78°C . Se añadió gota a gota DIBAL-H (1,2 M en hexano, 1,1 mL, 1,32 mmol) por medio de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó después a -78°C durante 1 hora antes de que se inactivó mediante la adición lenta de 1,5 mL de CH_3OH y 15 mL de HCl (2,5 M). La solución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el (3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)metanol que se usó directamente para la siguiente etapa.

A una solución de (3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)metanol (arriba) en CH_2Cl_2 (2 mL) se añadió clorocromato de piridinio (PCC) (0,3103 g, 1,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se diluyó con hexano: EtOAc 1:1. La suspensión resultante se filtró a través de una almohadilla corta de gel de sílice y se lavó la torta filtrada mediante 1:1 Et_2O : hexano y Et_2O . La evaporación de los disolventes dio el 3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído que se confirmó por RMN de protón y se usó directamente para la siguiente etapa.

Una mezcla de 3-metil-1,4'-bipiperidina (0,0865 g, 0,048 mmol), la 3-azido-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (arriba), CH_2Cl_2 (2 mL), AcOH (0,027 mL, 0,47 mmol) y $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0,1425 g, 0,67 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 28 horas. Después, la reacción se inactivó mediante la solución de NaHCO_3 saturada (20 mL) a 0°C y la solución bifásica generada se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. La cromatografía rápida en gel de sílice (1:9 de metanol: CH_2Cl_2) proporcionó el producto deseado como un gel de color amarillo (0,0378 g, 22 % en tres etapas). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,10 - 6,87 (m, 3 H), 4,72 (d, J = 2,4 Hz, 2 H), 3,38 (s, 2 H), 3,03 - 2,85 (m, 4 H), 2,51 (t, J = 2,4 Hz, 1 H), 2,41 (s, 1 H), 2,24 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 1,93 (td, J = 11,9, 2,2 Hz, 2H), 1,84 (d, J = 9,9 Hz, 2 H), 1,61 (m, 5 H), 1,37 (s, 2 H), 0,91 (d, J = 5,4 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 148,5, 133,0, 128,9, 125,9, 120,9, 114,1, 78,0, 76,1, 62,7, 61,9, 56,9, 53,1, 49,4, 33,8, 30,8, 27,5, 21,7; MS (ESI) m/z 368,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

XI. 1'-((5-azido-2-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina

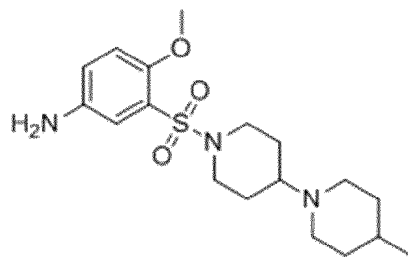


bencil (4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonil)fenil)carbamato: ácido p-anisidina-3-sulfónico (1,2215 g, 6,02 mmol), agua (10 mL), cloroformato de bencilo (1,03 mL, 7,21 mmol), K_2CO_3 (2,0854 g, 15,11 mmol) y $CHCl_3$ (10 mL) se añadieron secuencialmente en un matraz. La solución de dos fases se agitó vigorosamente durante 71 horas. Después de la adición de 75 mL de agua, la solución se lavó mediante $CHCl_3$ (2 x 75 mL) y la solución acuosa se concentró al vacío para formar sal de potasio 5-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-metoxibencenosulfonato como un sólido amarillo.

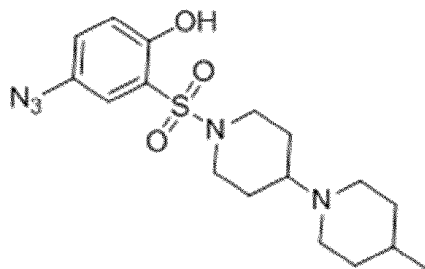
La sal se mezcló con DMF (20 mL) y la suspensión se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$. $SOCl_2$ (1,80 mL, 25,02 mmol) se añadió gota a gota dentro de 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La solución de reacción se vertió en agua con hielo (50 mL) y se extrajo mediante CH_2Cl_2 (3 x 60 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida, para formar bencil (3-(cloro-sulfonil)-4-metoxifenil)carbamato que se usó sin purificación adicional.

Una mezcla de 4-metil-1,4'-bipiperidina (1,2090 g, 6,64 mmol), bencil (3-(clorosulfonil)-4-metoxifenil)carbamato (arriba), N,N -diisopropil etilamina (3 mL, 18,19 mmol), y CH_2Cl_2 (15 mL) se agitaron a temperatura ambiente durante 21 horas. Después, la solución se diluyó con CH_2Cl_2 (20 mL) y se lavó mediante una solución saturada de $NaHCO_3$ (35 mL) y salmuera (35 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:19 metanol: CH_2Cl_2) para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco (2,3318 g, 77 % tres etapas). pf $124 - 127\text{ }^\circ\text{C}$; ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,80 (s, br, 1 H), 7,67 (d, $J = 2,8\text{ Hz}$, 1 H), 7,43 - 7,30 (m, 4 H), 6,95 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 1 H), 6,89 (s, 1 H), 5,18 (s, 2 H), 3,89 (s, $J = 3,4\text{ Hz}$, 1 H), 3,87 (s, 3 H), 2,79 (d, $J = 11,5\text{ Hz}$, 2 H), 2,66 - 2,53 (m, 2 H), 2,29 (tt, $J = 11,6, 3,5\text{ Hz}$, 1 H), 2,19 - 2,06 (m, 2 H), 1,96 - 1,72 (m, 3 H), 1,68 - 1,48 (m, 4 H), 1,31 (ddt, $J = 14,5, 6,7, 3,7\text{ Hz}$, 1 H), 1,25 - 1,10 (m, 2

H), 0,89 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 153,6, 153,0, 135,9, 130,8, 128,6, 128,4, 128,3, 126,9, 125,1, 122,2, 113,2, 67,2, 61,8, 56,4, 49,5, 45,9, 34,6, 31,1, 27,9, 21,9; MS (ESI) m/z 502,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

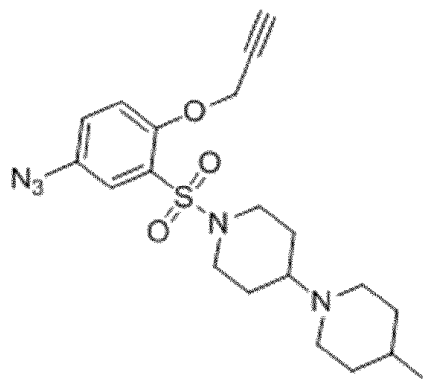


4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)anilina: A un matraz se le añadieron metanol (6 mL), bencil (4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenil)carbarnato (0,5270 g, 1,05 mmol) y 3 espátulas de paladio sobre carbono (10 % en peso). El matraz se selló con un septum de goma, seguido de evacuación de aire mediante el uso de vacío y relleno de hidrógeno mediante el uso de un globo de hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 27 horas y se filtró a través de una almohadilla de Celite, se lavó por CH_2Cl_2 . La evaporación de los solventes proporcionó el producto como un sólido amarillo (0,3591 g, 93 %), pf 54 - 57 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,24 (d, J = 2,5 Hz, 1 H), 6,89 - 6,79 (m, 2 H), 3,91 (d, J = 13,0 Hz, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 3,59 (s, 2 H), 2,84 (d, J = 9,3 Hz, 2 H), 2,60 (t, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,36 (t, J = 11,9 Hz, 1 H), 2,19 (td, J = 11,6, 10,0, 2,7 Hz, 2 H), 1,84 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 1,70 - 1,50 (m, 4 H), 1,35 (s, br, 1 H), 1,26 (m, 2 H), 0,92 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 149,6, 140,0, 126,8, 120,8, 117,7, 114,3, 62,7, 56,7, 49,2, 45,4, 32,3, 30,1, 26,8, 21,2; MS (ESI) m/z 502,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



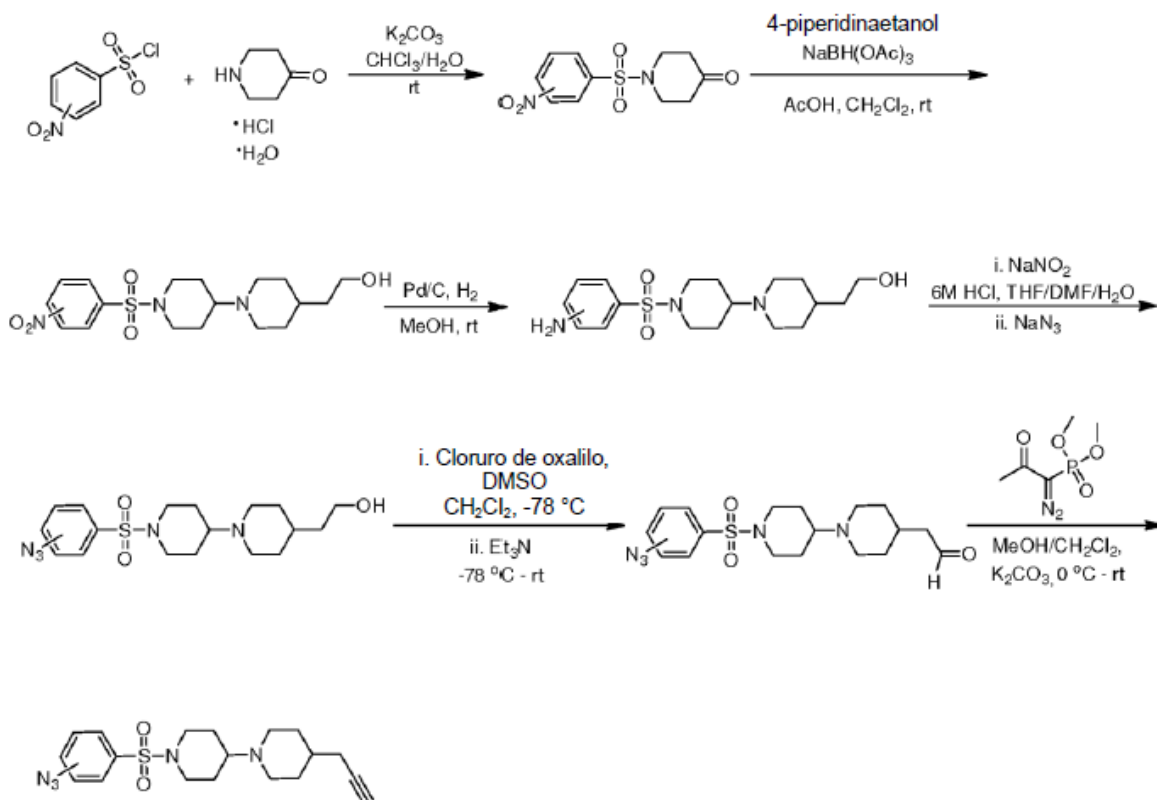
4-azido-2-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)fenol: A un matraz secado al fuego de 25 mL equipado con un condensador de reflujo se le añadió 4-metoxi-3-((4-metil-[1,4'-bipiperidin]-1'-il)sulfonyl)anilina (0,2546 g, 0,69 mmol), tolueno anhidro (6 mL), CH_2Cl_2 anhidro (1,5 mL) y BBr_3 (1M en CH_2Cl_2 , 3,5 mL, 3,5 mmol). La solución resultante se llevó a cabo a 70 °C en un baño de aceite durante 3 horas antes de que se enfriara a 0 °C y se inactivó con 6 mL de metanol. La solución se filtró a través de una almohadilla de Celite, se lavó con metanol. Después de la evaporación de los disolventes, el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1,5:8,5 Metanol: CH_2Cl_2) para proporcionar el producto desmetilado. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 7,79 (d, J = 2,7 Hz, 1 H), 7,51 (dd, J = 8,8, 2,7 Hz, 1 H), 7,13 (d, J = 8,7 Hz, 1 H), 3,95 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 3,49 (d, J = 10,8 Hz, 2H), 3,40 (m, 1 H), 3,26 (m, 2 H), 3,05 (t, J = 13,7 Hz, 2 H), 2,82 (t, J = 12,5 Hz, 2 H), 2,21 (dd, J = 11,6, 3,3 Hz, 2 H), 1,88 (d, J = 14,7 Hz, 2 H), 1,75 (d, J = 14,2 Hz, 3 H), 1,53 (q, J = 12,7 Hz, 2 H), 0,94 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100 MHz, Metanol- d_4) δ 155,9, 129,3, 125,2, 125,0, 121,6, 118,8, 62,9, 49,8, 44,5, 31,1, 28,5, 26,3, 20,0.

Al matraz que contenía el producto desmetilado (anterior) se añadieron HCl 6 M (3 mL), THF (3 mL) y DMF (3 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C y NaNO_2 (0,0612 g, 0,89 mmol) en H_2O (1 mL) se añadió gota a gota en 5 minutos. La solución de reacción se agitó durante 40 min a 0 °C y NaN_3 (0,0699 g, 1,08 mmol) en H_2O (1 mL) se añadió gota a gota. La solución resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche, después de lo cual la solución de reacción se diluyó con agua (10 mL) y se basificó con solución de NaOH 1 M. La solución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1:9 de metanol: CH_2Cl_2) para proporcionar el producto deseado (0,1921 g, 73 % en dos etapas) como un aceite verde. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,15 (dd, J = 2,1, 1,0 Hz, 1 H), 7,12 - 7,08 (m, 2 H), 3,85 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 3,05 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 2,67 (t, J = 11,8 Hz, 1 H), 2,51 (td, J = 12,4, 2,4 Hz, 2 H), 2,40 (t, J = 10,4 Hz, 2 H), 2,04 (d, J = 11,1 Hz, 2 H), 1,83 - 1,61 (m, 4 H), 1,46 (dt, J = 19,6, 7,8 Hz, 3 H), 0,91 (d, J = 5,5 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 152,8, 132,1, 125,9, 121,3, 120,5, 118,8, 61,8, 49,4, 45,4, 32,7, 30,1, 26,5, 21,3; MS (ESI) m/z 380,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

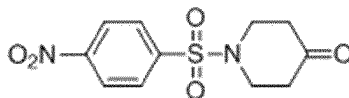


1'-((5-azido-2-(prop-2-in-1-iloxi)fenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina: Se disolvió 4-azido-2-((4-metil-[1,4'-bipiperid-in]-1'-il)sulfonyl)fenol (0,1190 g, 0,31 mmol) en DMF anhidro (2,5 mL), seguido de la adición de NaH (60 %, 0,163 g, 0,41 mmol) a 0 °C. El matraz se enjuagó inmediatamente con flujo de argón y se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. La solución de reacción se agitó a 0 °C durante 15 minutos y se añadió bromuro de propargilo (80 % en tolueno, 0,035 mL, 0,31 mmol) por medio de una jeringa. La solución se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La reacción se inactivó después mediante la adición de una solución saturada de NaHCO₃ (20 mL), seguido de la extracción con EtOAc (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (40 mL) y salmuera (40 mL) después de lo cual se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La cromatografía rápida en gel de sílice (metanol 1:19: CH₂Cl₂) proporcionó el producto deseado (0,0442 g, 34 %) como un gel amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,57 (dd, J = 2,1, 1,1 Hz, 1 H), 7,17 - 7,07 (m, 2 H), 4,77 (d, J = 2,4 Hz, 2 H), 3,90 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 2,80 (d, J = 11,3 Hz, 2 H), 2,66 (td, J = 12,5, 2,4 Hz, 2 H), 2,54 (t, J = 2,4 Hz, 1 H), 2,34 (tt, J = 11,6, 3,5 Hz, 1 H), 2,15 (td, J = 11,5, 2,7 Hz, 2 H), 1,90 - 1,75 (m, 2 H), 1,71 - 1,52 (m, 4 H), 1,42 - 1,27 (m, 1 H), 1,27 - 1,11 (m, 2 H), 0,88 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 151,7, 133,8, 129,5, 124,2, 122,0, 115,9, 77,3, 76,9, 61,9, 57,2, 49,4, 46,0, 34,4, 31,0, 27,8, 21,9; MS (ESI) m/z 418,2 (100 %, [M+H]⁺).

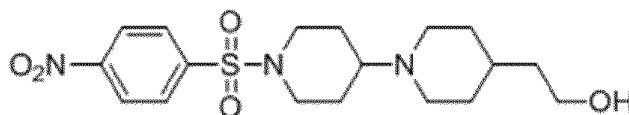
XII. Síntesis del compuesto 1'-(fenilsulfonil)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina con azida de arilo



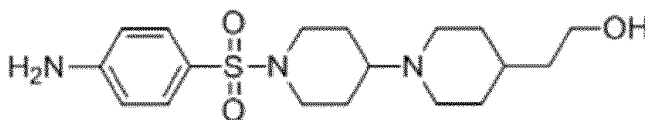
El procedimiento experimental sintético se representa por la preparación del 1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina.



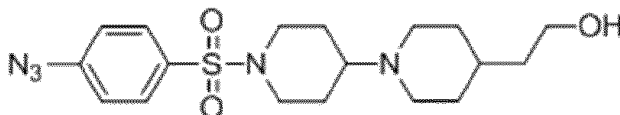
1'-((4-nitrofenil)sulfonyl)piperidin-4-ona se preparó de acuerdo con el procedimiento general para la preparación de sulfonamidas a partir de cloruros de sulfonyl y sales de hidrocloreto de amina con la caracterización detallada anterior.



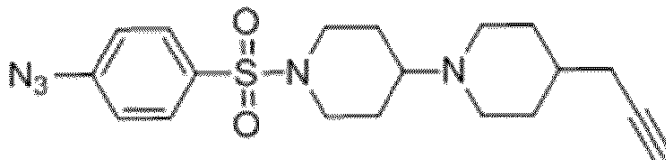
2-(1'-((4-nitrofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol se preparó de acuerdo con el procedimiento general para la aminación reductora con la caracterización detallada anterior.



2-(1'-((4-aminofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: A un matraz de 10 mL se añadieron 2-(1'-((4-nitrofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol (0,1002 g, 0,25 mmol), metanol (3,5 mL) y 1 espátula de paladio sobre carbono (10 % en peso). El matraz se selló con un septum de goma, seguido de evacuación de aire mediante el uso de vacío y rellenado de hidrógeno mediante el uso de un globo de hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 21 horas y se filtró a través de una almohadilla de Celite, se lavó mediante CH_2Cl_2 . La evaporación de los disolventes proporcionó el producto como un sólido amarillo (0,0815 g, 88 %). pf 59 - 62 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 2 H), 6,70 (d, J = 8,6 Hz, 2 H), 4,15 (s, 2 H), 3,80 (dt, J = 10,9, 3,1 Hz, 2 H), 3,68 (t, J = 6,7 Hz, 2 H), 2,82 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 2,30 - 2,06 (m, 5 H), 1,83 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 1,67 (m, 4 H), 1,50 (q, J = 6,7 Hz, 2H), 1,45 - 1,35 (m, 1 H), 1,35 - 1,15 (m, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 150,5, 129,8, 124,2, 113,9, 61,6, 60,5, 49,4, 46,1, 39,3, 32,6, 32,5, 27,3; MS (ESI) m/z 368,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



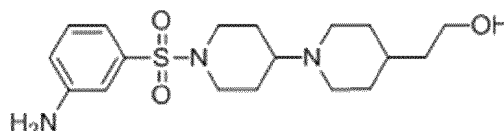
2-(1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol: A un matraz de 25 mL que contenía 2-(1'-((4-aminofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol (0,1822 g, 0,50 mmol) se añadieron HCl 6 M (2 mL), THF (2 mL) y DMF (2 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió NaNO_2 (0,0445 g, 0,64 mmol) en H_2O (0,7 mL) gota a gota en 5 minutos. La solución de reacción se agitó durante 20 minutos a 0 °C y se añadió NaN_3 (0,0521 g, 0,80 mmol). La solución resultante se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Después, la reacción se inactivó mediante la adición de NaOH 1 M (30 mL), seguido por la extracción con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (30 mL), se lavó con una solución de LiCl al 10 % (30 mL) y salmuera (3 x 30 mL) para proporcionar el producto indicado (0,0719 g, 36 %) como un sólido amarillo pálido. pf 165-167 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,72 (d, J = 8,6 Hz, 2 H), 7,12 (d, J = 8,6 Hz, 2 H), 3,81 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 3,65 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 2,80 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 2,33 - 2,04 (m, 5 H), 1,82 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 1,64 (m, 5 H), 1,47 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,38 (m, 1 H), 1,18 (ddd, J = 15,4, 10,3, 3,7 Hz, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 144,8, 132,3, 129,5, 119,4, 61,4, 60,4, 49,4, 46,1, 39,3, 32,6, 32,5, 27,3; MS (ESI) m/z 394,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



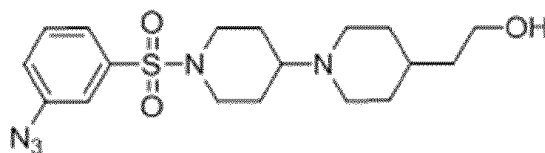
1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina: Un matraz secado al fuego de 25 mL equipado con una barra de agitación magnética se purgó con argón y después se selló con un septum de goma equipado con un globo de argón. El CH_2Cl_2 anhidro (1,5 mL) y el cloruro de oxalilo (0,30 mL, 2 M en CH_2Cl_2 , 0,60 mmol) se añadieron secuencialmente por medio de una jeringa. La solución resultante se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco - acetona. Se introdujo DMSO anhidro (0,085 mL, 1,20 mmol) y la solución se agitó durante 25 minutos a -78 °C. 2-(1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol (0,1910 g, 0,49 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 se añadió gota a gota.

Después la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora, se añadió, Et₃N (0,24 mL, 1,73 mmol) y la solución de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 horas, antes de interrumpirse por 20 mL de solución saturada de NaHCO₃. La solución bifásica resultante se generó por CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el intermedio aldehído que se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

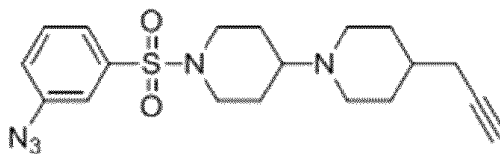
El aldehído generado se disolvió en 2 mL de CH₂Cl₂ y la mitad fue para la reacción del reactivo Bestmann Ohira. El procedimiento de reacción del reactivo de Bestmann Ohira se describe a continuación. El reactivo Bestmann Ohira (dimetil (1-diazo-2-oxopropil) fosfonato) (0,0570 g, 0,030 mmol) y metanol (2 mL) se mezclaron a 0 °C, seguido de la adición de aldehído (disuelto en 1 mL de CH₂Cl₂) y K₂CO₃ (0,0670 g, 0,49 mmol). La suspensión de la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La solución de suspensión se filtró y se vertió en un embudo de decantación, se diluyó con 20 mL de CH₂Cl₂, se lavó mediante una solución saturada de NaHCO₃ (20 mL) y NaOH 1 N (20 mL). La capa orgánica se secó mediante Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se sonizó con una pequeña cantidad de hexano y el sobrenadante de la capa de hexano se eliminó con una pipeta de vidrio y después se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1: 9 CH₃OH: CH₂Cl₂) para proporcionar el producto del título como un sólido amarillo (0,0454 g, 48 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 7,15 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 3,85 (dd, J = 11,5, 3,8 Hz, 2 H), 2,87 (s, 2 H), 2,39 - 2,05 (m, 7 H), 1,97 (t, J = 2,1 Hz, 1 H), 1,85 (m, 4 H), 1,67 (q, J = 12,5 Hz, 2 H), 1,46 (s, br, 1 H), 1,30 (s, br, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 144,8, 132,3, 129,5, 119,4, 82,6, 69,4, 61,5, 49,2, 46,0, 35,4, 31,7, 27,2, 25,3; MS (ESI) m/z 388,2 (100 %, [M+H]⁺).



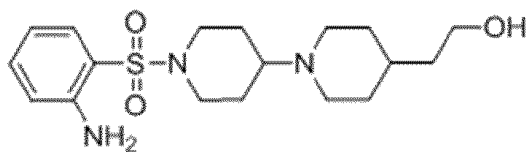
2-(1'-((3-aminofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol se preparó como un sólido amarillo (91 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de síntesis de 2-(1'-((4-aminofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol. pf 61-64 °C; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,27 (t, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,03 (s, 1 H), 6,97 (d, J = 7,7 Hz, 1 H), 6,91 (dd, J = 8,1, 2,3 Hz, 1 H), 3,82 (d, J = 12,8 Hz, 2 H), 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,32 (s, 2 H), 3,05 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 2,49 (t, J = 11,7 Hz, 1 H), 2,45 - 2,26 (m, 4 H), 1,97 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 1,80 (d, J = 13,3 Hz, 2 H), 1,62 (qd, J = 12,3, 4,1 Hz, 2 H), 1,57 - 1,50 (m, 1 H), 1,48 (q, J = 6,4 Hz, 2 H), 1,37 - 1,22 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CD₃OD) δ 149,2, 136,3, 129,4, 118,5, 115,4, 112,5, 61,6, 58,9, 49,2, 45,6, 38,4, 31,7, 31,0, 26,6; MS (ESI) m/z 368,2 (100 %, [M+H]⁺).



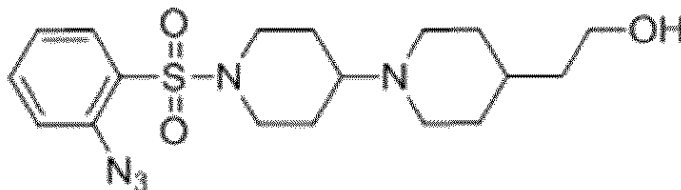
2-(1'-((3-azidofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol se preparó como un sólido amarillo pálido (>95 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de síntesis de 2-(1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol. pf 168 - 171 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,54 - 7,45 (m, 2 H), 7,36 (s, 1 H), 7,24 - 7,18 (m, 1 H), 3,83 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 3,65 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 2,79 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,37 - 2,07 (m, 5 H), 1,83 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 1,72 - 1,54 (m, 5 H), 1,47 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,43 - 1,34 (m, 1 H), 1,20 (tdd, J = 15,5, 9,6, 4,2 Hz, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 141,4, 138,2, 130,5, 123,8, 123,0, 118,0, 61,4, 60,4, 49,4, 46,1, 39,3, 32,6, 32,5, 27,3; MS (ESI) m/z 394,2 (100 %, [M+H]⁺).



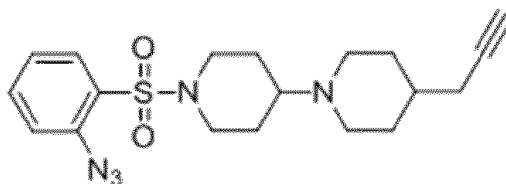
1'-((3-azidofenil)sulfonyl)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina se preparó como un sólido amarillo (49 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de la síntesis del 1'-((4-azidofenil)sulfonyl)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,59 - 7,48 (m, 2 H), 7,38 (s, 1 H), 7,27 - 7,23 (m, 1 H), 3,90 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 3,02 (s, 2 H), 2,53 (s, br, 1 H), 2,33 (m, 4 H), 2,16 (s, 2 H), 2,04 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 1,99 (t, J = 2,6 Hz, 1 H), 1,89 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 1,73 (qd, J = 12,3, 4,2 Hz, 2 H), 1,66 - 1,46 (s, br, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 141,6, 137,9, 130,6, 123,7, 123,2, 118,0, 82,1, 69,8, 61,8, 49,0, 45,7, 35,0, 30,6, 26,6, 25,0; MS (ESI) m/z 388,1 (100 %, [M+H]⁺).



2-(1'-((2-aminofenil)sulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol se preparó como un sólido amarillo (90 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de la síntesis del 2-(1'-((4-aminofenil)sulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol. pf 204 - 206 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,52 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 1 H), 7,37 - 7,18 (m, 1 H), 6,85 - 6,58 (m, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 3,84 (d, J = 12,4 Hz, 2 H), 3,64 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 2,86 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 2,45 (td, J = 12,3, 2,4 Hz, 2 H), 2,34 (t, J = 11,8 Hz, 1 H), 2,26 - 2,13 (m, 2 H), 1,86 (d, J = 13,3 Hz, 2 H), 1,70 (d, J = 11,4 Hz, 2 H), 1,60 (qd, J = 12,3, 4,1 Hz, 2 H), 1,52 - 1,20 (m, 6 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 146,2, 134,2, 130,3, 117,8, 117,6, 117,2, 61,7, 60,3, 49,4, 45,8, 39,1, 32,3, 32,0, 27,0; MS (ESI) m/z 368,2 (100 %, [M+H]⁺).

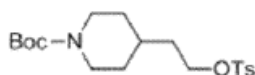
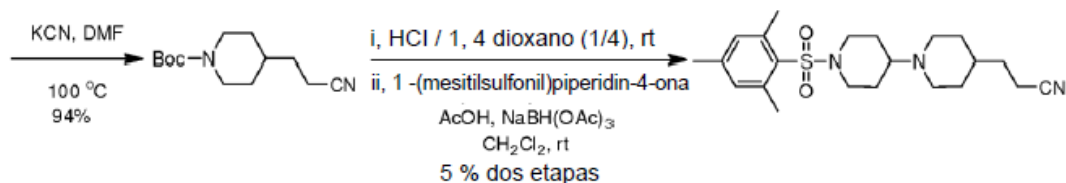
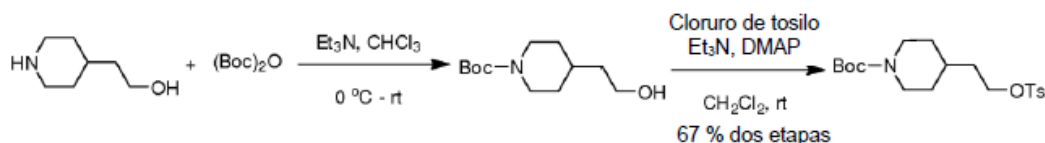


2-(1'-((2-azidofenil)sulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol se preparó como un sólido amarillo pálido (78 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de la síntesis del 2-(1'-((4-azidofenil)sulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)etanol. pf 152 - 155 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1 H), 7,56 (td, J = 7,7, 1,6 Hz, 1 H), 7,38 - 7,12 (m, 2 H), 3,94 (d, J = 13,0 Hz, 2 H), 3,67 (s, 2 H), 2,87 (d, J = 10,9 Hz, 2 H), 2,66 (td, J = 12,7, 2,4 Hz, 2 H), 2,35 (d, J = 12,5 Hz, 1 H), 2,18 (t, J = 11,3 Hz, 2 H), 1,87 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 1,71 (d, J = 10,8 Hz, 2 H), 1,66 - 1,54 (m, 2 H), 1,54 - 1,21 (m, 6 H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 138,3, 133,9, 131,7, 129,3, 124,6, 119,9, 61,9, 60,4, 49,4, 45,8, 39,2, 32,4, 32,3, 27,8; MS (ESI) m/z 394,2 (100 %, [M+H]⁺).



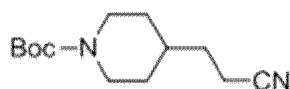
1'-((2-azidofenil)sulfonil)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina se preparó como un sólido amarillo (40 %) de acuerdo con el procedimiento experimental de la síntesis del 1'-((4-azidofenil)sulfonil)-4-(prop-2-in-1-il)-1,4'-bipiperidina. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,94 (dd, J = 7,9, 1,6 Hz, 1 H), 7,57 (td, J = 7,8, 1,6 Hz, 1 H), 7,31 - 7,27 (m, 1 H), 7,23 (td, J = 7,7, 1,1 Hz, 1 H), 3,94 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 2,87 (d, J = 11,0 Hz, 2 H), 2,67 (td, J = 12,4, 2,4 Hz, 2 H), 2,34 (ddt, J = 11,5, 7,3, 3,7 Hz, 1 H), 2,12 (m, 3 H), 1,96 (t, J = 2,6 Hz, 1 H), 1,82 (t, J = 15,2 Hz, 4 H), 1,60 (qd, J = 12,1, 4,2 Hz, 2 H), 1,46 (m, 1 H), 1,29 (ddd, J = 24,3, 12,1, 3,7 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 138,3, 133,8, 131,7, 129,4, 124,6, 119,9, 82,8, 69,3, 61,6, 49,2, 45,9, 35,6, 32,0, 28,0, 25,4; MS (ESI) m/z 388,1 (100 %, [M+H]⁺).

XIII. Síntesis de 3-(1'-((mesitilsulfonil)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)propanonitrilo

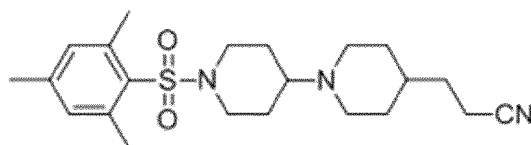


4-(2-(tosiloxy)etil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo: 2-(piperidin-4-il)etanol (1,3091 g, 10,15 mmol), Et₃N (4,20 ml, 30,19 mmol) y CHCl₃ (10 mL) se mezclaron y se agitó a 0 °C, seguido de la adición gota a gota de Di-terc-butildicarbonato (2,5770 g, 11,81 mmol) en CHCl₃ (4 mL) en 30 minutos. La solución de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 9 horas. La solución de reacción se vertió en solución saturada de NaHCO₃ (30 mL) y se extrajo con CHCl₃ (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para obtener el 2-(piperidin-4-il)etanol protegido con Boc que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El 2-(piperidin-4-il)etanol protegido con Boc se agitó con cloruro de tosilato (3,8988 g, 20,46 mmol) y DMAP (0,2514 g, 2,06 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL), seguido de la adición gota a gota de Et₃N (4,25 mL, 30,55 mmol) en 10 minutos. La solución de reacción se agitó durante 14 horas y se vertió lentamente en una solución saturada de NaHCO₃ (70 mL), se extrajo por CH₂Cl₂ (3 x 70 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (1:4 EtOAc : hexano) para obtener el producto del título (2,6127 g, 67 % en dos etapas) como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d, J = 8,3 Hz, 2 H), 7,33 (d, J = 8,3 Hz, 2 H), 4,21 - 3,86 (m, 4 H), 2,58 (t, J = 12,8 Hz, 2 H), 2,43 (s, 3 H), 1,65 - 1,46 (m, 5 H), 1,46 - 1,30 (s, 9 H), 1,14 - 0,87 (m, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 154,7, 144,8, 132,9, 129,8, 127,9, 79,3, 68,0, 43,7, 35,2, 32,1, 31,6, 28,4 21,6; MS (ESI) m/z 406,2 (100 %, [M+H]⁺).



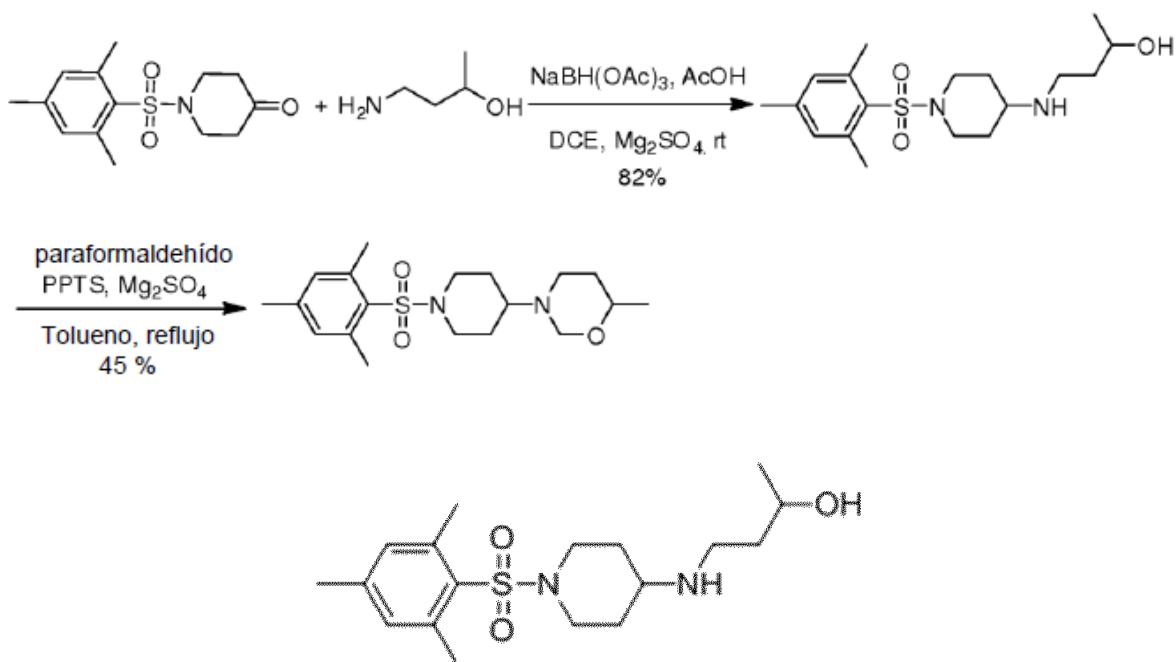
4-(2-cianoetil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo: A un matraz de 15 ml se añadieron 4-(2-(tosiloxy)etil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (0,4975 g, 1,30 mmol), KCN (0,6981 g, 10,74 mmol) y DMF (5 mL). La suspensión resultante se agitó vigorosamente a 100 °C durante 4 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Después, la suspensión se vertió lentamente en una solución de NaHCO₃ saturado (30 mL) y se extrajo mediante CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La cromatografía rápida en gel de sílice (2:1 Hexano: EtOAc) proporcionó el producto deseado (0,2901 g, 94 %) como un gel incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,09 (s, 2 H), 2,67 (t, J = 12,4 Hz, 2 H), 2,36 (td, J = 7,1, 0,9 Hz, 2 H), 1,80 - 1,50 (m, 5 H), 1,42 (s, 9 H), 1,08 (qd, J = 12,2, 4,2 Hz, 2 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 154,7, 119,5, 79,4, 43,6, 34,9, 31,7, 31,4, 28,4, 14,5.



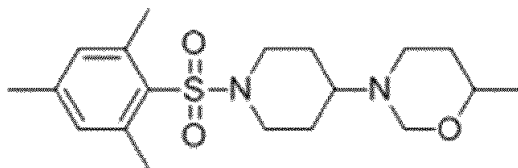
3-(1'-(mesitilsulfonyl)-[1,4'-bipiperidin]-4-il)propanonitrilo: Se mezcló 4-(2-cianoetil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (0,3280 g, 1,38 mmol) y se agitó con HCl (1 mL) en 1, 4-dioxano (4 mL) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la evaporación de los disolventes, la sal del ácido clorhidrato de 4-(2-cianoetil)piperidina generada se neutralizó mediante una solución saturada de NaHCO_3 a 0 °C, seguido de extracción con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida (bajo vacío) para proporcionar el 3-(piperidin-4-il)propanonitrilo que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

3-(piperidin-4-il)propanonitrilo anteriormente, 1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-ona (0,3860 g, 1,37 mmol), CH_2Cl_2 (4 mL), AcOH (0,080 mL, 1,40 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 25 minutos y se añadió $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0,4298 g, 2,03 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 50 horas. Después, la reacción se inactivó mediante una solución saturada de NaHCO_3 a 0 °C, seguido de extracción con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (1:19 MeOH: CH_2Cl_2) para proporcionar el producto deseado (0,0252 g, 5 % en dos etapas) como un gel blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,94 (s, 2 H), 3,63 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,90 (d, J = 10,7 Hz, 2 H), 2,74 (td, J = 12,4, 2,4 Hz, 2 H), 2,60 (s, 6 H), 2,35 (t, J = 7,2 Hz, 3 H), 2,29 (s, 3 H), 2,14 (t, J = 9,6 Hz, 2 H), 1,84 (d, J = 12,7 Hz, 2 H), 1,71 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 1,63 - 1,34 (m, 5 H), 1,24 (m, 2 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,4, 131,9, 131,7, 119,7, 61,8, 49,2, 44,0, 34,8, 31,8, 31,7, 27,6, 22,8, 21,0, 14,6; MS (ESI) m/z 404,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

XIV. Síntesis de 3-(1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)-6-metil-1,3-oxazinano

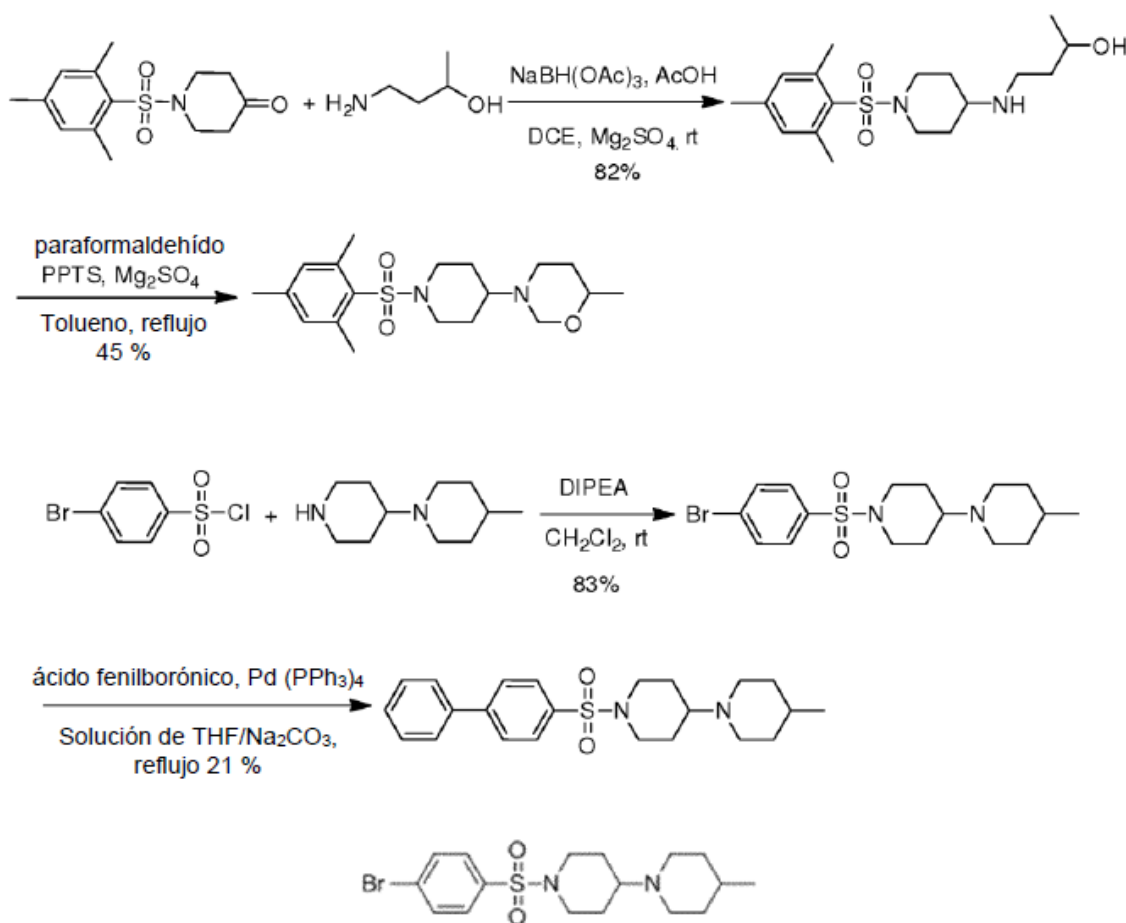


4-((1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)amino)butan-2-ol se obtuvo como un sólido blanco (82 %) mediante cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) después de la aminación reductora entre 4-aminobutan-2-ol y 1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-ona con un tiempo de reacción de 27 horas. pf 105 - 108 °C; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 6,95 (s, 2 H), 3,96 (ddd, J = 8,9, 5,8, 2,4 Hz, 1 H), 3,55 (d, J = 12,5 Hz, 2 H), 3,05 (dt, J = 11,9, 4,2 Hz, 1 H), 2,83 (tt, J = 12,5, 3,3 Hz, 2 H), 2,76 (td, J = 11,1, 2,9 Hz, 1 H), 2,61 (s, 7 H), 2,30 (s, 3 H), 1,96 (t, J = 12,8 Hz, 2 H), 1,63 (d, J = 14,9 Hz, 1 H), 1,47 (m, 1 H), 1,34 (m, 2 H), 1,16 (d, J = 6,2 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,6, 140,4, 131,9, 131,6, 69,5, 54,4, 45,5, 43,1, 43,0, 37,0, 31,8, 31,5, 23,6, 22,8, 21,0; MS (ESI) m/z 355,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

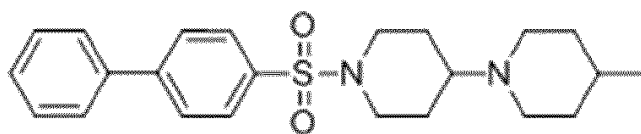


3-(1-(mesitilsulfonyl)piperidin-4-il)-6-metil-1,3-oxazinano: A un matraz de 15 mL equipado con un condensador de reflujo se añadieron 4-((1-(mesitilsulfonyl) piperidin-4-il)amino)butan-2-ol (0,1192 g, 0,34 mmol), paraformaldehído (0,0143 g, 0,48 mmol), Mg_2SO_4 (0,2091 g, 1,74 mmol), ptoluenosulfonato de piridinio (PPTS) (0,0025 g, 0,01 mmol) y tolueno anhidro (4 mL). La suspensión se agitó a reflujo durante 3 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión se vertió en un embudo de separación que contenía 30 mL de solución saturada de NaHCO_3 seguido de extracción con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) para proporcionar el producto deseado como un gel incoloro (0,0555 g, 45 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,91 (s, 2 H), 4,61 (dd, J = 10,0, 2,3 Hz, 1 H), 4,16 (d, J = 10,1 Hz, 1 H), 3,57 (m, 3 H), 3,11 (ddt, J = 13,4, 4,4, 2,2 Hz, 1 H), 2,89 - 2,68 (m, 4 H), 2,58 (s, 6 H), 2,27 (s, 3 H), 1,92 (dp, J = 12,2, 2,8 Hz, 2 H), 1,65 - 1,29 (m, 4 H), 1,15 (d, J = 6,1 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 142,5, 140,4, 131,9, 131,6, 81,6, 73,6, 55,0, 46,5, 43,4, 30,3, 29,8, 29,2, 22,8, 21,8, 20,9; MS (ESI) m/z 367,2 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

XV. Síntesis de 1'-([1,1'-bifenil]-4-ilsulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina



1'-((4-bromofenil)sulfonyl)-4-metil-1,4'-bipiperidina se obtuvo como un sólido blanco (83 %) mediante de cromatografía rápida (1: 19 MeOH: CH_2Cl_2) después de la reacción de formación de sulfonamida entre cloruro de 4-bromobenceno-1-sulfonyl y 4-metil-1,4'-bipiperidina. pf 165 -1 68 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,75 - 7,45 (m, 4 H), 3,81 (d, J = 11,9 Hz, 2 H), 2,75 (d, J = 11,5 Hz, 2 H), 2,38 - 1,96 (m, 5 H), 1,81 (d, J = 11,8 Hz, 2 H), 1,73 - 1,52 (m, 4 H), 1,28 (m, 1 H), 1,22 - 1,06 (m, 2 H), 0,87 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) δ 135,2, 132,3, 129,1, 127,7, 61,3, 49,5, 46,1, 34,6, 31,0, 27,3, 21,9; MS (ESI) m/z 403,1 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$).



1'-([1,1'-bifenil]-4-ilsulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina: A un matraz secado al fuego equipado con un condensador de reflujo se añadieron 1'-((4-bromofenil)sulfonil)-4-metil-1,4'-bipiperidina (0,2200 g, 0,55 mmol), ácido fenilborónico (0,1065 g, 0,87 mmol), Tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0,0609 g, 0,053 mmol), THF (8 mL) y Na₂CO₃ (2 M, 0,8 mL). La mezcla se desgasificó a través de ciclos Freeze-Pump-Thaw y se reflujo durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión de reacción se diluyó con agua (25 mL), se agitó durante 10 minutos y se extrajo con DCM (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en gel de sílice (1: 19 MeOH: CH₂Cl₂) para proporcionar el producto del título como un sólido blanco (0,0433 g, 21 %). pf 178 - 181 °C; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,72 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,64 - 7,56 (m, 2 H), 7,52 - 7,45 (m, 2 H), 7,45 - 7,37 (m, 1 H), 3,90 (d, J = 12,1 Hz, 2 H), 2,84 (d, J = 10,8 Hz, 2 H), 2,32 (td, J = 12,1, 2,5 Hz, 3 H), 2,20 (t, J = 11,9 Hz, 2 H), 1,91 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 1,77 - 1,57 (m, 4 H), 1,42 - 1,12 (m, 3 H), 0,90 (d, J = 5,9 Hz, 3 H); ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 145,6, 139,2, 134,6, 129,1, 129,1, 128,5, 128,2, 127,6, 127,3, 61,6, 49,4, 46,1, 34,1, 30,8, 27,1, 21,7; m/z 399,2 (100 %, [M+H]⁺).

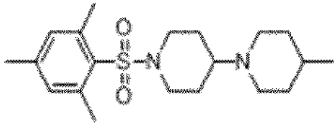
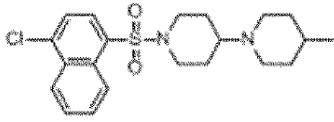
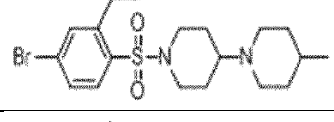
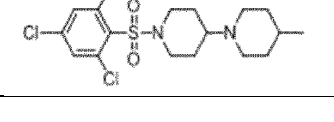
Ejemplo 2. Ensayo de inhibición in vitro de APC

Los compuestos anticancerígenos de molécula pequeña se evaluaron para determinar la capacidad de inhibir la actividad de APC en un ensayo *in vitro*. La **Tabla A** muestra el IC₅₀ medido para cada compuesto ejemplificado.

Los reactivos necesarios para el ensayo son: (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo; RPI corp., Cat # M92050); RPMI-1640 o medio de elección (es decir, DMEM) sin rojo fenol; Hepes 1M; NaPiruvato 100 mM; Gentamicina 1000X (50 mg/mL); penicilina/estreptomicina /fungizona 100X; PBS IX; Triton X-100; HCl e isopropanol 1N. Para preparar la solución de MTT (10x), el polvo de MTT se disolvió en RPMI completo (o solución de DMEM) hasta una concentración final de 5 mg/mL y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,2 µm. La solución de solubilización MTT contenía Triton X-100 10 %, 0,1 N e isopropanol 80 %. La solución de MTT se diluyó a IX con medio completo a 12 mL por placa. Las placas de cultivo (96 pocillos) se retiraron de la incubadora y se descartó el medio. Las placas se lavaron tres veces con PBS 1x. Se añadieron 100 µL de solución MTT IX a cada pocillo y las placas se incubaron en una incubadora de cultivo de tejidos durante 2-4 horas, en dependencia de la línea celular. Las células se retiraron de la incubadora y la solución MTT se descartó. Se añadieron 200 µL de la solución de solubilización MTT IX a cada pocillo mediante el uso de un pipeteador multicanal y las células se colocaron en un agitador orbital durante 10 minutos. Los resultados se leyeron en un lector de placa de microtitulación (absorbancia = 570 nm, referencia = 700 nm) y se exportaron los datos.

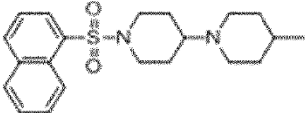
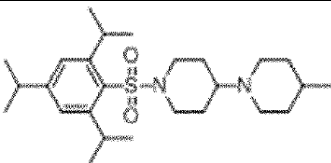
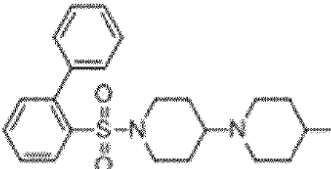
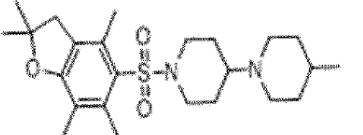
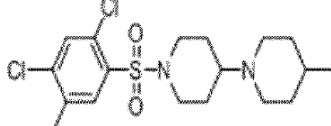
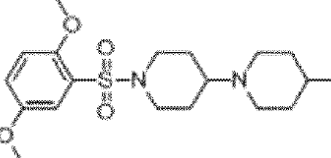
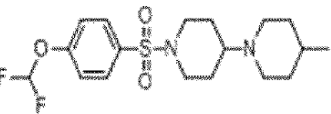
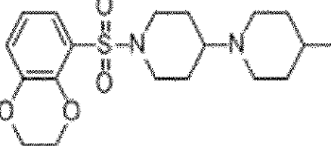
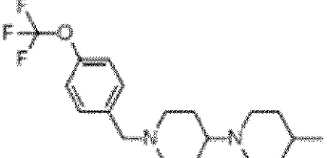
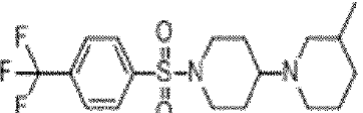
El porcentaje de inhibición se determinó con relación a las reacciones de control sin inhibidor, y los valores de la mitad del máximo de concentración inhibitoria (IC₅₀) se determinaron mediante el uso de un estándar de ajuste de cuatro parámetros a los datos de inhibición. El término "IC₅₀", como se usa en la presente descripción, se refiere a una medida cuantitativa de la eficacia de un compuesto en la inhibición de la función biológica o bioquímica que indica la cantidad que se necesita para inhibir un proceso biológico dado (o componente de un proceso) en un 50 %.

TABLA A

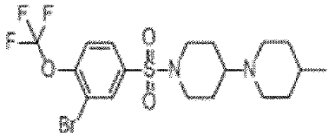
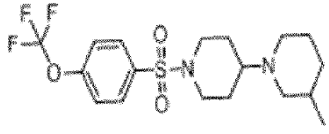
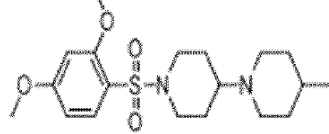
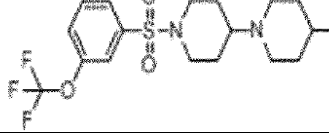
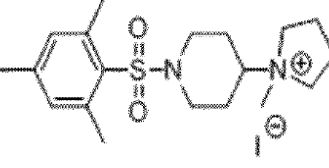
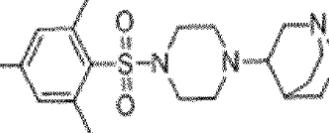
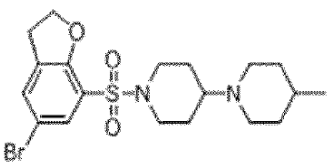
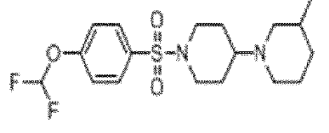
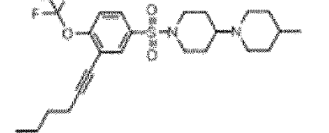
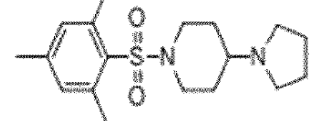
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC ₅₀ por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC ₅₀ (nM) en HCT-116	IC ₅₀ (nM) en DLD-1	IC ₅₀ (nM) en HT-29	S9 T _{1/2} (minutos)
	364,6		0,03		5
	407		0,1		14
	429,4		0,6		9,1
	405,4		0,6		9,1

Continuación

Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC₅₀ por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en **negrita**.

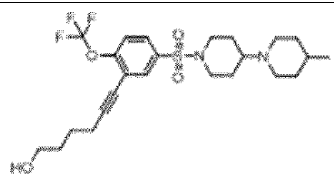
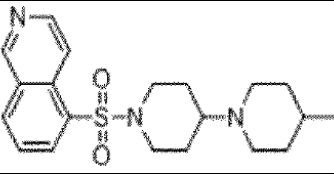
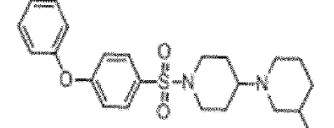
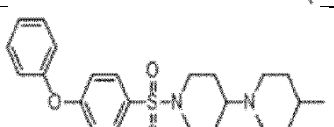
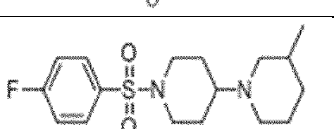
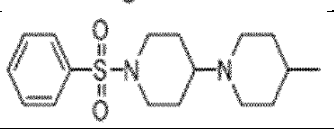
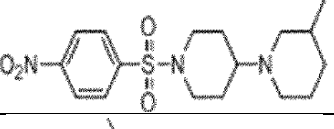
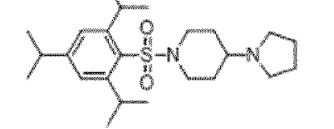
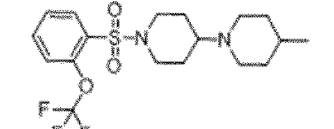
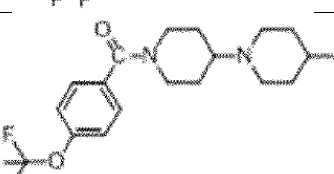
	Estructura	PM	IC ₅₀ (nM) en HCT-116	IC ₅₀ (nM) en DLD-1	IC ₅₀ (nM) en HT-29	S9 T _{1/2} (minutos)
5		372,5		0,65		<5
10						
15		448,7		0,7		59
20						
25		398,6		0,96		<6
30		434,6		1,2		67
35		405,4		2		6,5
40		382,5		4,5		9,4
45		388,5		4,8		144
50		380,5		10		22,6
55		356,4		19		
60						
65		390,5		29		

Continuación

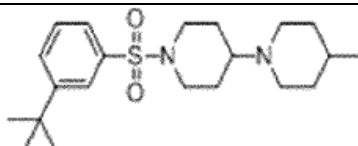
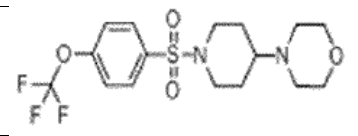
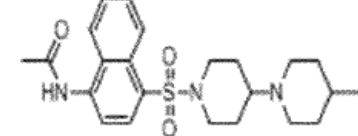
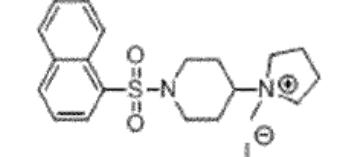
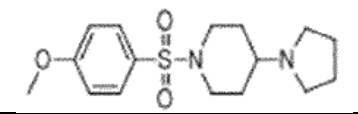
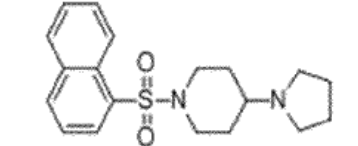
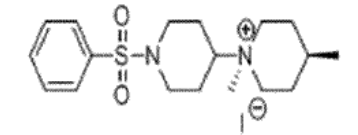
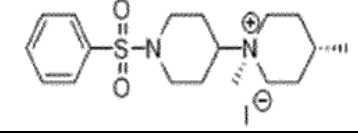
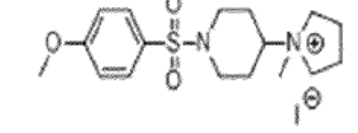
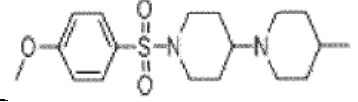
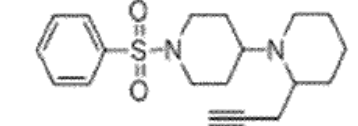
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	485,4		29		
	406,5		31		
	382,5		41		
	406,5		56		
	478,4		69		
	377,5		84		
	443,4		96		
	388,5		105		
	486,6		147		
	336,5		172,2		

65

Continuación

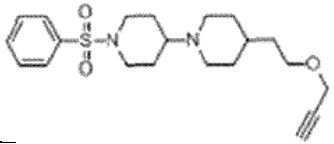
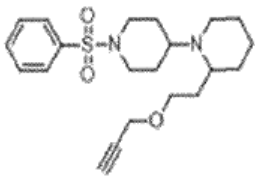
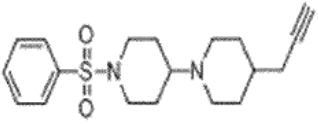
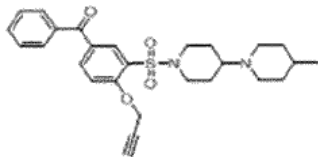
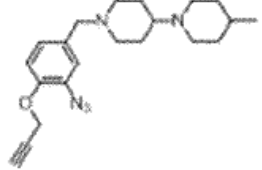
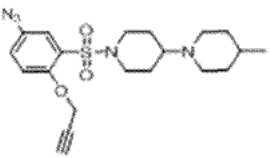
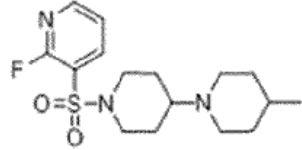
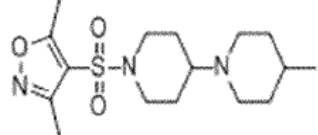
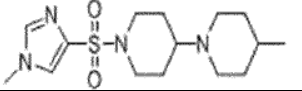
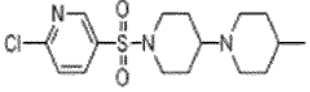
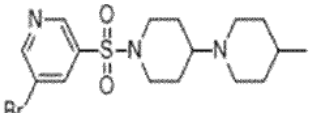
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	502,6		205		
	373,5		225		
	414,6		244		
	414,6		253		
	340,5		255		
	322,5		293,9		
	367,5		366		
	420,7		374		
	406,5		421		
	370,4		426		

Continuación

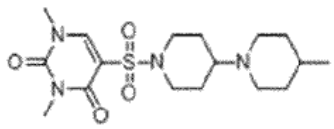
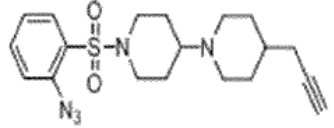
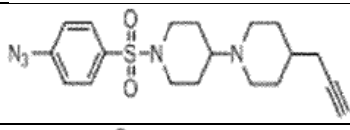
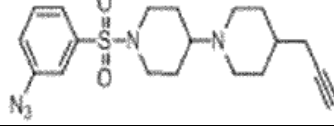
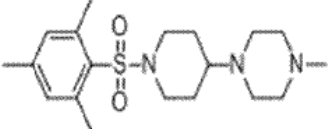
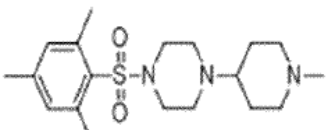
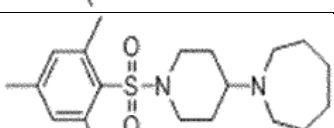
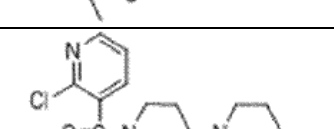
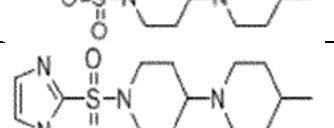
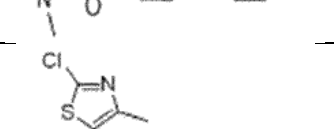
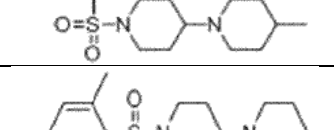
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	378,6		463		
	394,4		501		
	429,6		1100		
	486,4		2300		
	324,4		3203		
	344,5		3896		
	464,4		~ 7963		
	464,4		> 10 000		
	466,4		> 10 000		
	352,5	> 10 000	63	53	
	346,5	> 10 000	5300	1100	

65

Continuación

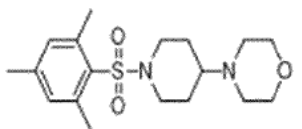
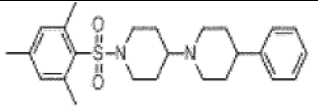
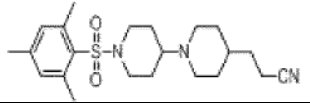
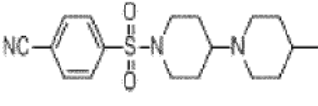
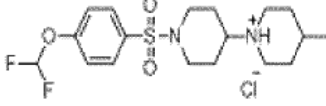
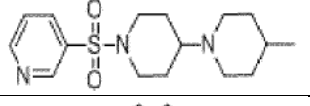
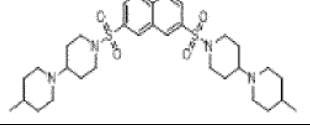
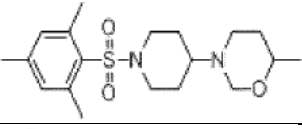
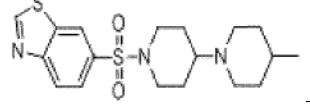
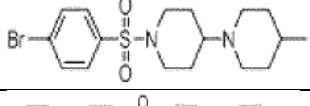
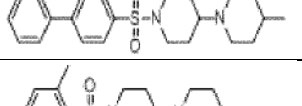
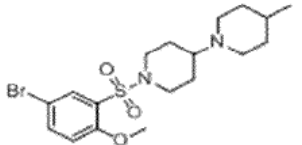
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	390,5	> 10 000	85	35	
	390,5	> 10 000	7900	2300	
	346,5	> 10 000	18	4	25,2
	480,6	> 10 000	504	185	
	367,5	> 10 000	921	437	
	417,5	> 10 000	15000	4500	
	341,4		> 10 000		
	341,5		> 10 000		
	326,5		> 10 000		
	357,9		3700		
	402,4		7200		

Continuación

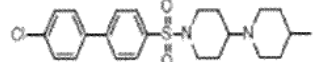
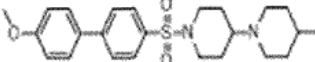
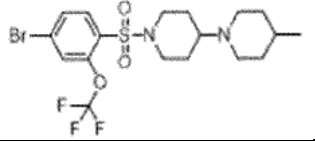
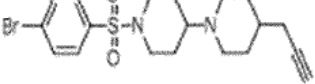
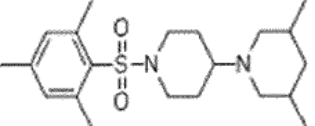
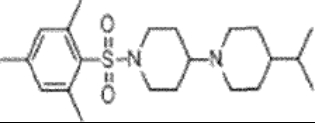
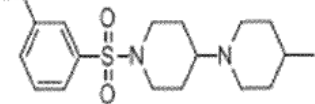
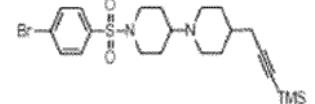
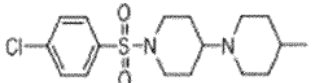
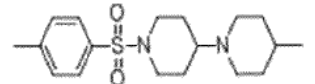
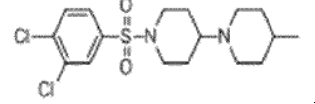
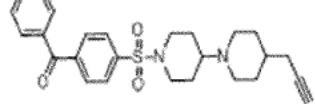
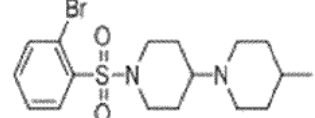
Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	384,5		> 10 000		
	387,5		5300		
	387,5		235		
	387,5		1900		
	365,5		1100		
	365,5		426		
	364,6		3300		
	357,9		> 10 000		
	326,5		> 10 000		
	378	> 10 000	1,6	1,5	
	350,5	> 10 000	2200		

65

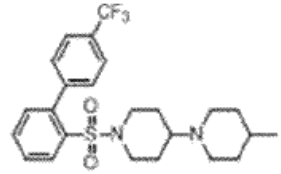
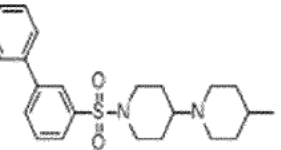
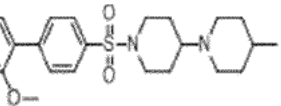
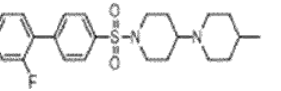
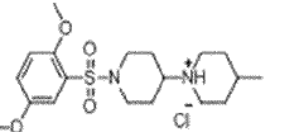
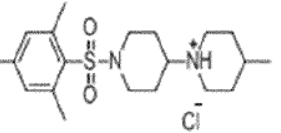
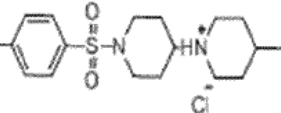
Continuación

Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	352,5	> 10 000	3100		
	426,6	> 10 000	865		
	403,6	> 10 000	7400		
	347,5	> 10 000	2800		
	424,9	> 10 000	63	79	
	323,5	> 10 000	2400	2.200	
	616,9	TBD	TBD		
	366,5	> 10 000	92	61	
	379,5	> 10 000	38	26	
	401,4	> 10 000	3,1	1,2	
	398,6	> 10 000	258	234	
	440,6	> 10 000	3,5	3	
	431,4	> 10 000	2	2	

Continuación

Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC ₅₀ (nM) en HCT-116	IC ₅₀ (nM) en DLD-1	IC ₅₀ (nM) en HT-29	S9 T _{1/2} (minutos)
	433	> 10 000	105	112	
	428,6	> 10 000	263	288	
	485,4	> 10 000	5	4	
	425,4	> 10 000	0,2	0,12	
	378,6	> 10 000	17	15	
	392,6	> 10 000	0,3	0,2	
	401,4	> 10 000	3,2	1,2	
	497,6	> 10 000	2,9	1,7	
	356,9	> 10 000	2,2	5,6	
	336,5	> 10 000	9,1	14	
	391,4	> 10 000	2,9	2,2	
	450,6	> 10 000	4,8	5,2	
	401,4	> 10 000	3	3	

Continuación

Análogos para el tratamiento del cáncer de colon. Los análogos con un IC50 por debajo de 100 nM en DLD-1 se indican en negrita .					
Estructura	PM	IC50 (nM) en HCT-116	IC50 (nM) en DLD-1	IC50 (nM) en HT-29	S9 T1/2 (minutos)
	466,6	> 10 000	122	57	
	398,6	> 10 000	2	2	
	428,6	> 10 000	26	19	
	416,6	> 10 000	5	6	
	419		45	7	
	401		908	2	
	389		494	6	

Ejemplo 3. El inhibidor selectivo de la APC truncada-1 (TASIN-1) destruye las líneas de CRC con truncamientos de la APC mientras que evita las células epiteliales de colon humano normales (HCEC) y otras células cancerosas con APC silvestre (WT), interfiere con la formación adecuada del huso mitótico e induce muerte celular apoptótica dependiente de JNK en células truncadas APC.

El análisis de la respuesta a la dosis en dos líneas celulares de CRC auténticas: HCT116 (WT APC) y DLD1 (APC truncada), condujo a la identificación del compuesto líder TASIN-1 (inhibidor selectivo de APC truncada) (Figura 7 (d)). Este compuesto exhibió una toxicidad potente y selectiva hacia las células DLD1 (IC₅₀ = 63 nM) pero no hacia las células HCT116 (IC₅₀ > 10 µM) (Figura 7 (e)). El tratamiento sostenido de TASIN-1 inhibió el crecimiento de agar blando en DLD1 pero no en células HCT116 (Figura 7 (f), 11)

Para validar la dependencia de truncamiento de la APC, se generaron dos líneas celulares DLD1 de desactivación estable independientes que expresan los shARN contra la APC truncada. La reducción de la expresión de APC truncada desensibilizó las células DLD1 a TASIN-1 con una reducción de la proteína de > 90 % (Figuras 8, 9), lo que soporta que la APC o una(s) proteína(s) en una ruta dependiente de la APC relevante sea el objetivo de TASIN-1. Se observaron efectos similares en las células HT29 sin la proteína APC truncada (Figura 9a). Además, la expresión ectópica de la APC truncada sensibiliza parcialmente las células nulas HCT116 y HCT116 p53 a TASIN-1 (Figura 9).

TASIN-1 se probó en un panel de líneas celulares CRC con un estado APC variado. A pesar de los antecedentes genéticos altamente heterogéneos, los resultados mostraron una correlación constante entre la sensibilidad de TASIN-1 y el estado de la APC (Figuras 9, 10). TASIN-1 no afectó la viabilidad de HCEC, la células epiteliales bronquiales humanas (HBEC) y las células de fibroblastos BJ que se derivan de los tejidos normales, así como otros tipos de

células cancerosas con WT APC. Sin embargo, DU4475, una línea celular de cáncer de mama que expresaba APC 15 truncada fue sensible a TASIN-1, una vez más apoyaba la dependencia de truncamiento de la APC (Figura 9', Tabla de datos 1).

Línea celular	Estado de APC	Tipo de tumor
DU4475	aa1577	Carcinoma de mama
MCF7	WT	Carcinoma de mama
MDA231	WT	Carcinoma de mama
HTB126	WT	Carcinoma de mama
U2OS	WT	Osteosarcoma
DU145	WT	Carcinoma de próstata
Hela	WT	Carcinoma cervical
A549	WT	Carcinoma de pulmón
HCC366	WT	Carcinoma de pulmón
HCC44	WT	Carcinoma de pulmón
HCC4017	WT	Carcinoma de pulmón
HCC95	WT	Carcinoma de pulmón
H1819	WT	Carcinoma de pulmón
H1993	WT	Carcinoma de pulmón
H2073	WT	Carcinoma de pulmón
H2009	WT	Carcinoma de pulmón
H2122	WT	Carcinoma de pulmón
H1395	WT	Carcinoma de pulmón

Tabla de datos 1. Estado de APC y origen de otros tipos de cáncer.

TASIN-1 causó la escisión de la poli (ADP ribosa) polimerasa 1 (PARP1), la liberación del citocromo c de las mitocondrias y la actividad de caspasa 3/7 inducida en las células DLD1 pero no en las células HCT116 (Figuras 12, 12' (a-c), 13), indicativo de inducción de apoptosis. Además, el tratamiento con TASIN-1 condujo a la activación de JNK después de 48 horas en células DLD1 pero no en las células HCT116 y esta activación persistió durante 72 horas (Figura 12'(d)). El tratamiento conjunto con el inhibidor de JNK SP600125 (Millipore) atenuó los efectos de TASIN-1 e inhibió eficientemente la activación de JNK y abolió la escisión de PARP1, así como la activación de la caspasa 3/7 (Figura 12' (e-g)). En conjunto, estos datos demuestran que TASIN-1 induce la muerte celular apoptótica dependiente de JNK en las células DLD1.

Ejemplo 4. Actividad antitumoral in vivo de TASIN-1 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

La actividad antitumoral in vivo de TASIN-1 se examinó en un modelo de xenoinjerto de ratón. Los ratones desnudos con tumores DLD1 establecidos se inyectaron intraperitonealmente con disolvente (control) o 40 mg/kg de TASIN-1 dos veces al día durante 18 días. El tratamiento con TASIN-1 redujo el tamaño de los xenoinjertos tumorales (Figuras 17, 17') y redujo las velocidades de crecimiento tumoral (Figura 17' (b)) en comparación con los ratones control. No se observó toxicidad manifiesta ni diferencias estadísticamente significativas en los pesos corporales de los ratones entre el grupo control y el grupo tratado con TASIN-1 (Figura 20 (a)). Se observó una actividad antitumoral similar en xenoinjertos HT29, que además alberga la APC truncada y demostró una sensibilidad similar a DLD1 in vitro (Figura 17'(c)). Sin embargo, TASIN-1 no inhibió el crecimiento tumoral en los xenoinjertos HCT116 (WT APC) (Figura 19), lo que demuestra que TASIN-1 mantiene la selectividad in vivo. El análisis de la inmunohistoquímica de los tumores extirpados mostró que TASIN-1 indujo un aumento significativo en el marcador apoptótico, la caspasa 3 escindida en tumores DLD1 tratados con TASIN-1 en comparación con los tumores de control (Figura 20 (b)). La inducción de la apoptosis se confirmó mediante la detección de PARP1 escindido en lisados tumorales de control y xenoinjertos DLD1 tratados con TASIN-1 (Figura 20 (c)).

Ejemplo 5. Efectos antitumorales de TASIN-1 en CPC; ratones *Apc*

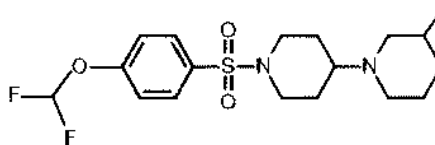
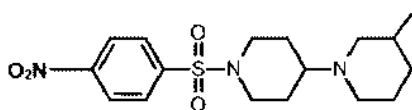
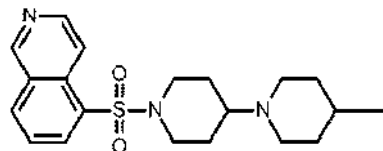
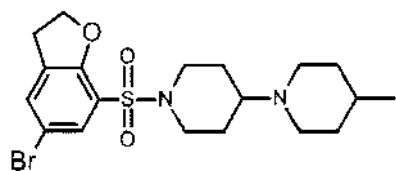
Teniendo en cuenta que TASIN-1 tiene un largo tiempo de retención en el tejido del intestino grueso del ratón (Figura

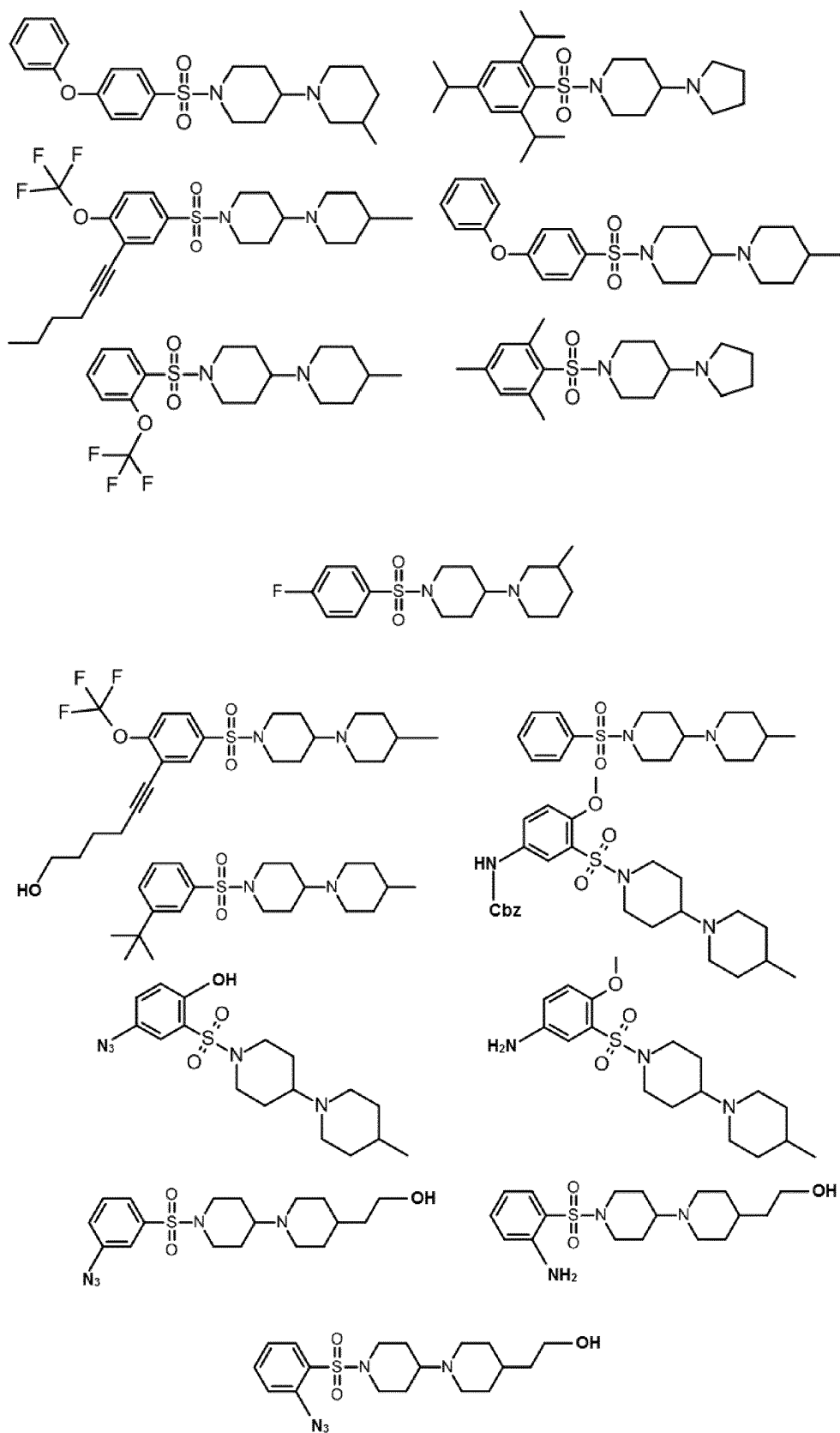
19'), los efectos antitumorales en *CPC*; ratones *Apc*, un modelo de ratón genéticamente modificado que desarrolla principalmente tumores colorrectales, se probaron además. Estos ratones llevan un *transgén CDX2P-NLS Cre* recombinasa y un alelo *Apc* dirigido por *P lox* que elimina el exón 14, lo que conduce a un cambio de marco en el codón 580 y una proteína APC truncada (Hinoi, T. y otros. Mouse model of colonic adenomacarcinoma progression based on somatic *Apc* inactivation. *Cancer Res* 67, 9721-9730 (2007)). A los ratones de 110 días de edad se les inyectó intraperitonealmente con solvente o 20 mg/kg/inyección de TASIN-1 dos veces por semana durante 90 días. Los pesos se midieron cada 15 días durante el período de tratamiento. Estos estudios se realizaron de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de UT Southwestern.

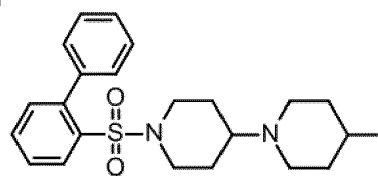
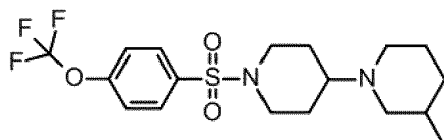
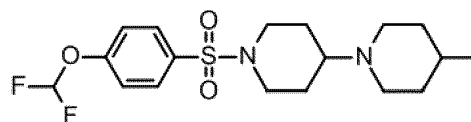
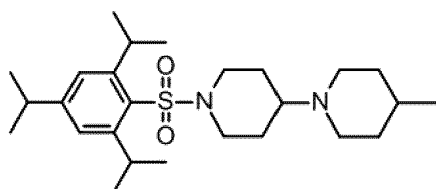
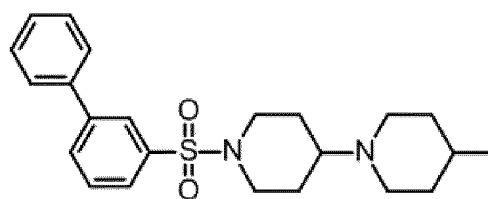
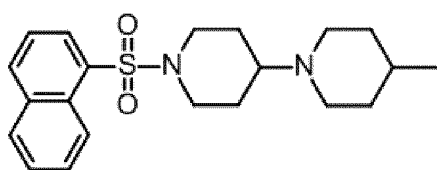
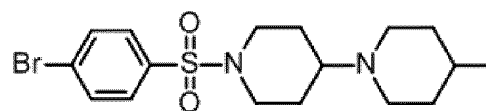
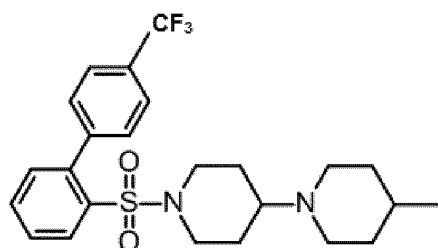
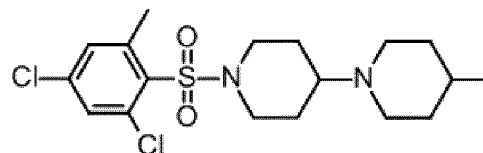
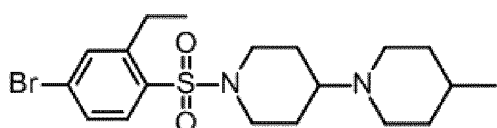
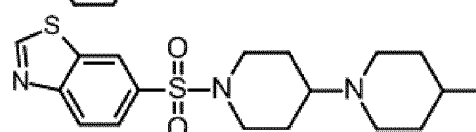
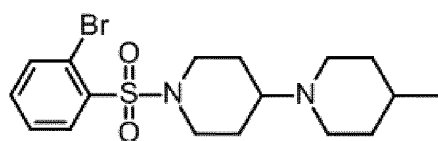
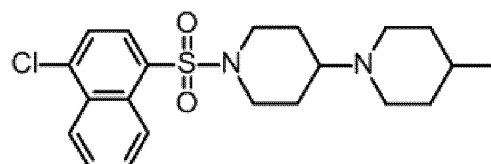
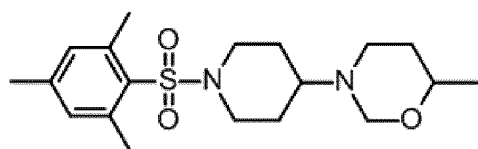
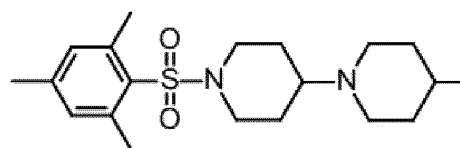
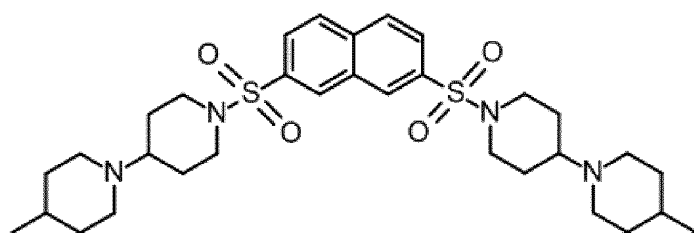
El tratamiento con TASIN-1 resultó en una reducción significativa en la formación de tumores en el colon de *CPC*; ratones *Apc* (Figuras 17', 19'). Tumores benignos (pólipos) que se desarrollaron en ratones *Apc CPC* tratado con TASIN-1; fueron mucho más pequeños en comparación con el grupo control (Figura 3f). Además, los ratones tratados con TASIN-1 con menos carga tumoral ganaron peso a un nivel similar a los ratones WT durante el tratamiento de 90 días (Figura 17'). Finalmente, los ratones tratados con TASIN-1 mostraron una expresión suprimida de un panel de genes de respuesta inflamatoria (Figura 19') y una tinción reducida para Ki67 y ciclina D1, acompañada de una mayor tinción para la caspasa 3 escindida en secciones de tumor de colon. En conjunto, estos experimentos *in vivo* muestran que TASIN-1 atenúa eficientemente la tumorigénesis tanto en los xenoinjertos humanos como en los modelos de ratones CRC genéticamente modificados sin toxicidad notable.

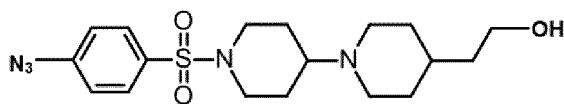
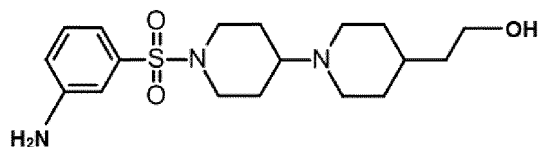
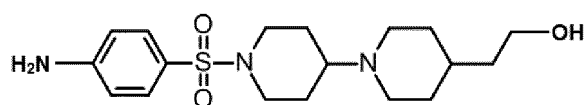
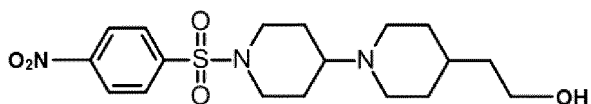
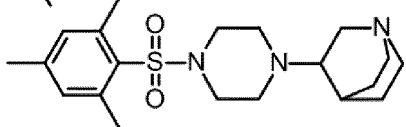
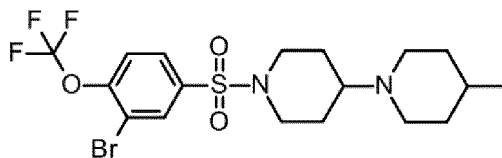
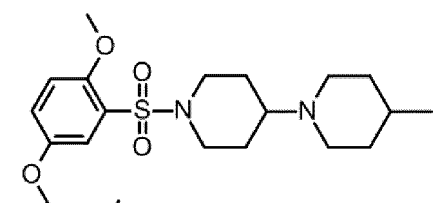
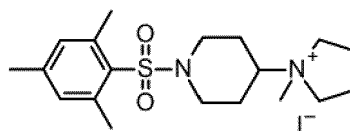
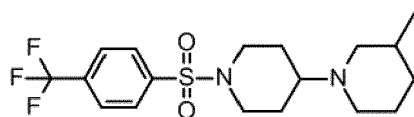
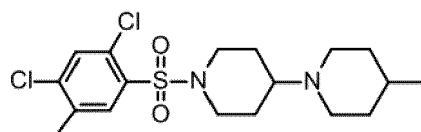
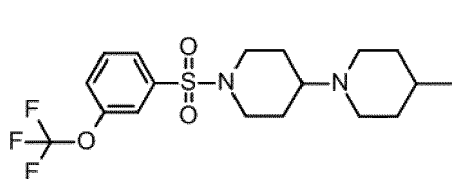
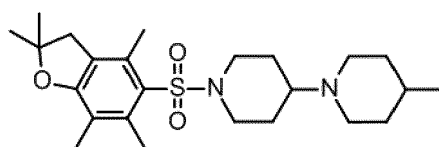
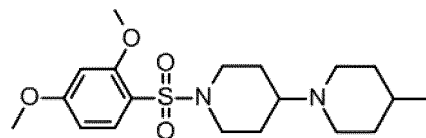
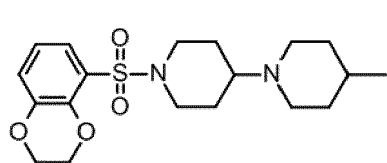
REIVINDICACIONES

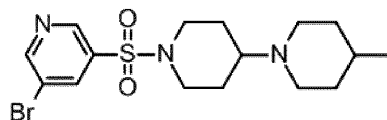
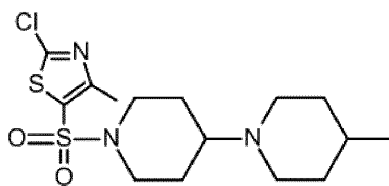
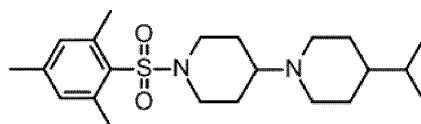
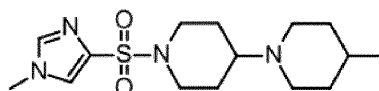
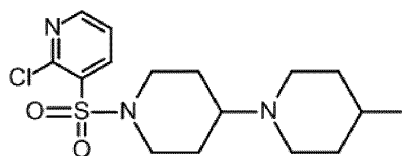
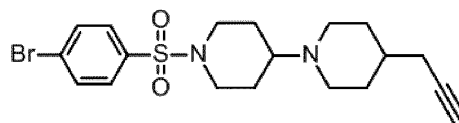
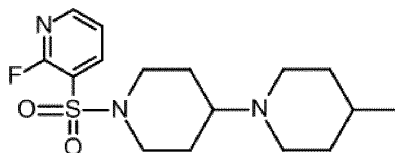
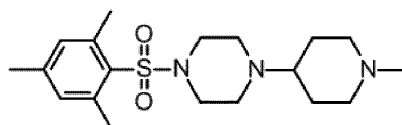
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



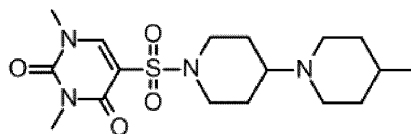
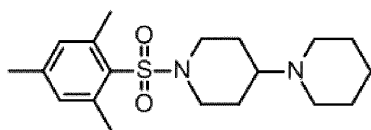




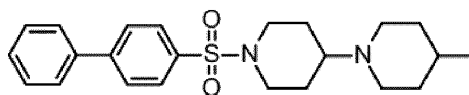
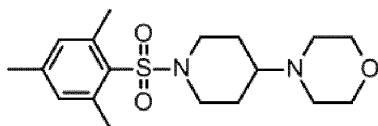




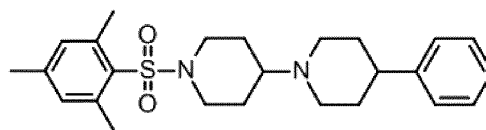
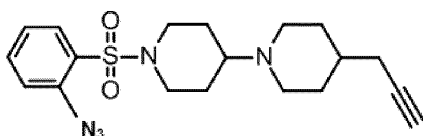
5



10

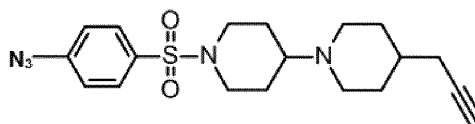
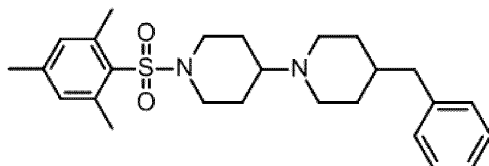


15

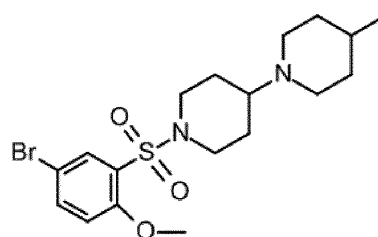
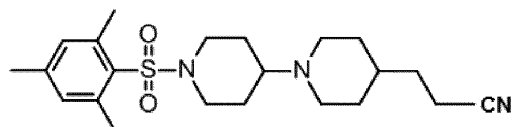


20

25

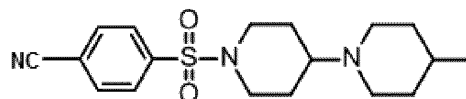
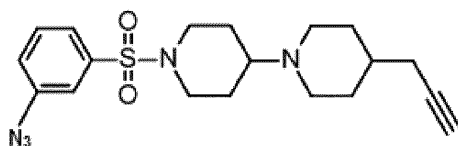


30

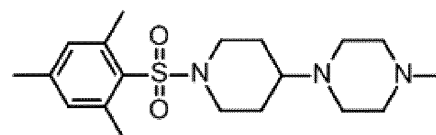
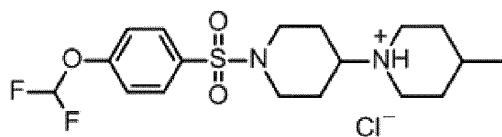


35

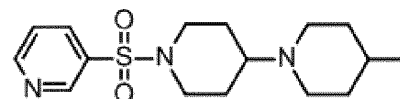
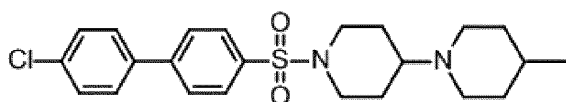
40



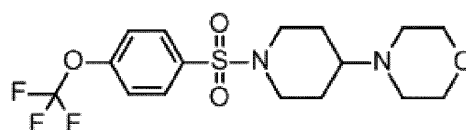
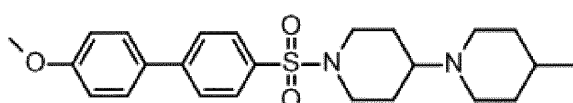
45



50



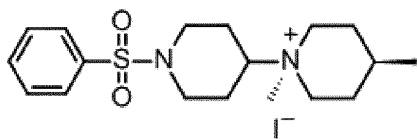
55



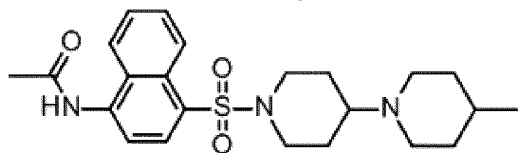
60

65

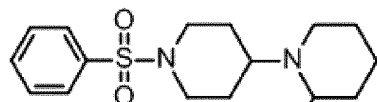
5



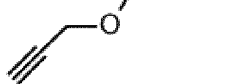
10



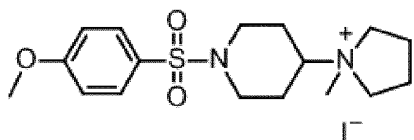
15



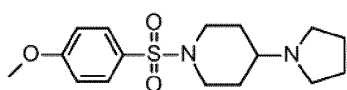
20



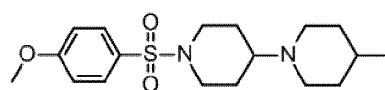
25



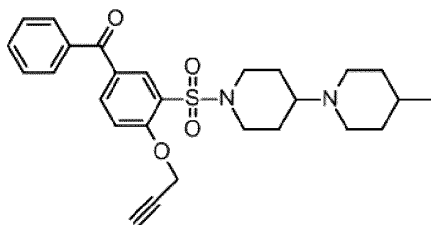
30



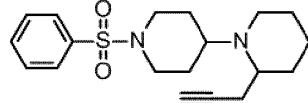
35



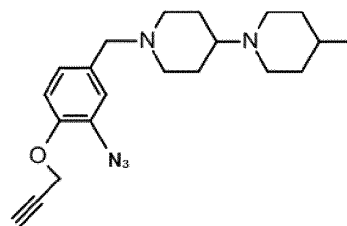
40



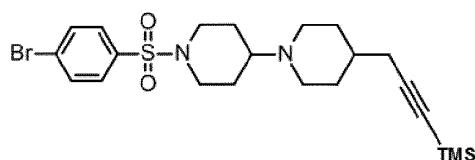
45



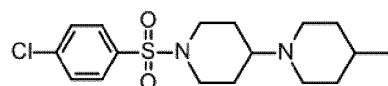
50



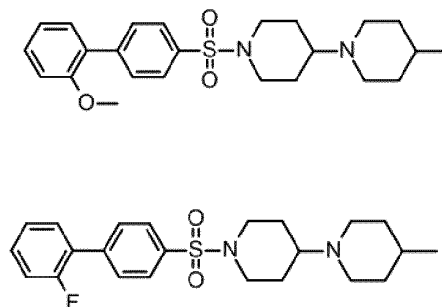
55



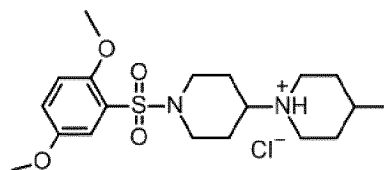
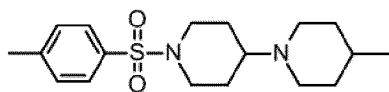
60



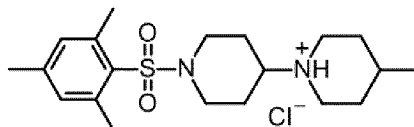
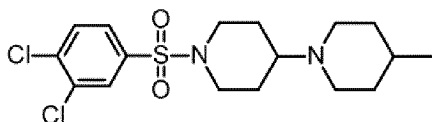
65



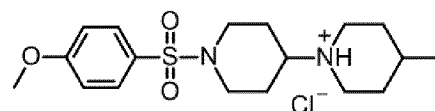
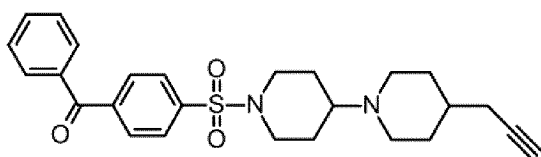
5



10



15



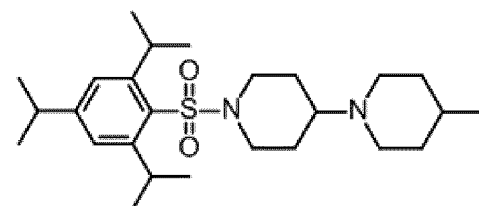
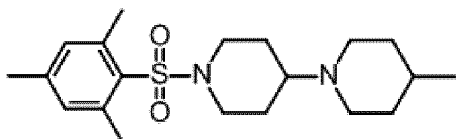
20

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

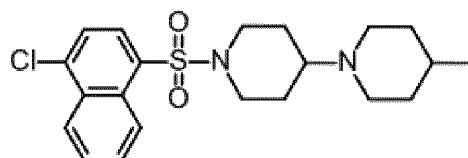
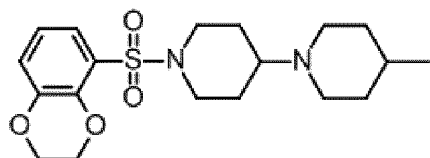
25

2. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

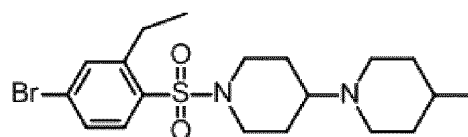
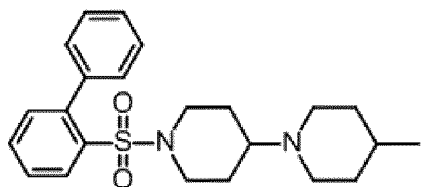
30



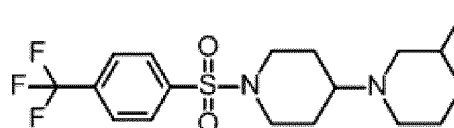
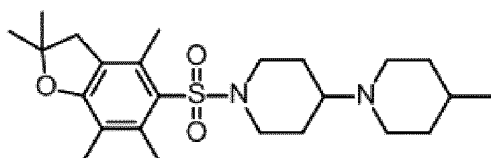
35



40



45

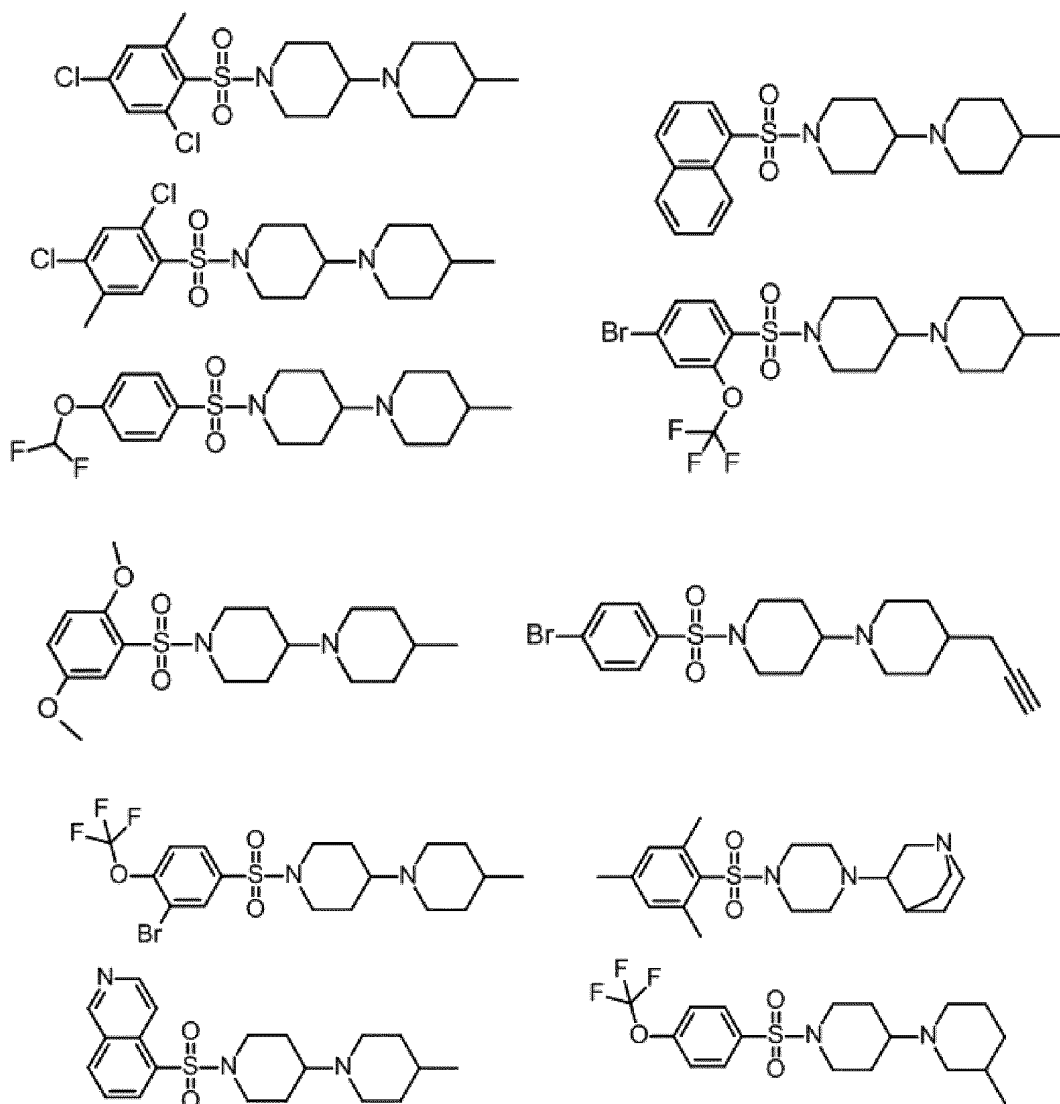


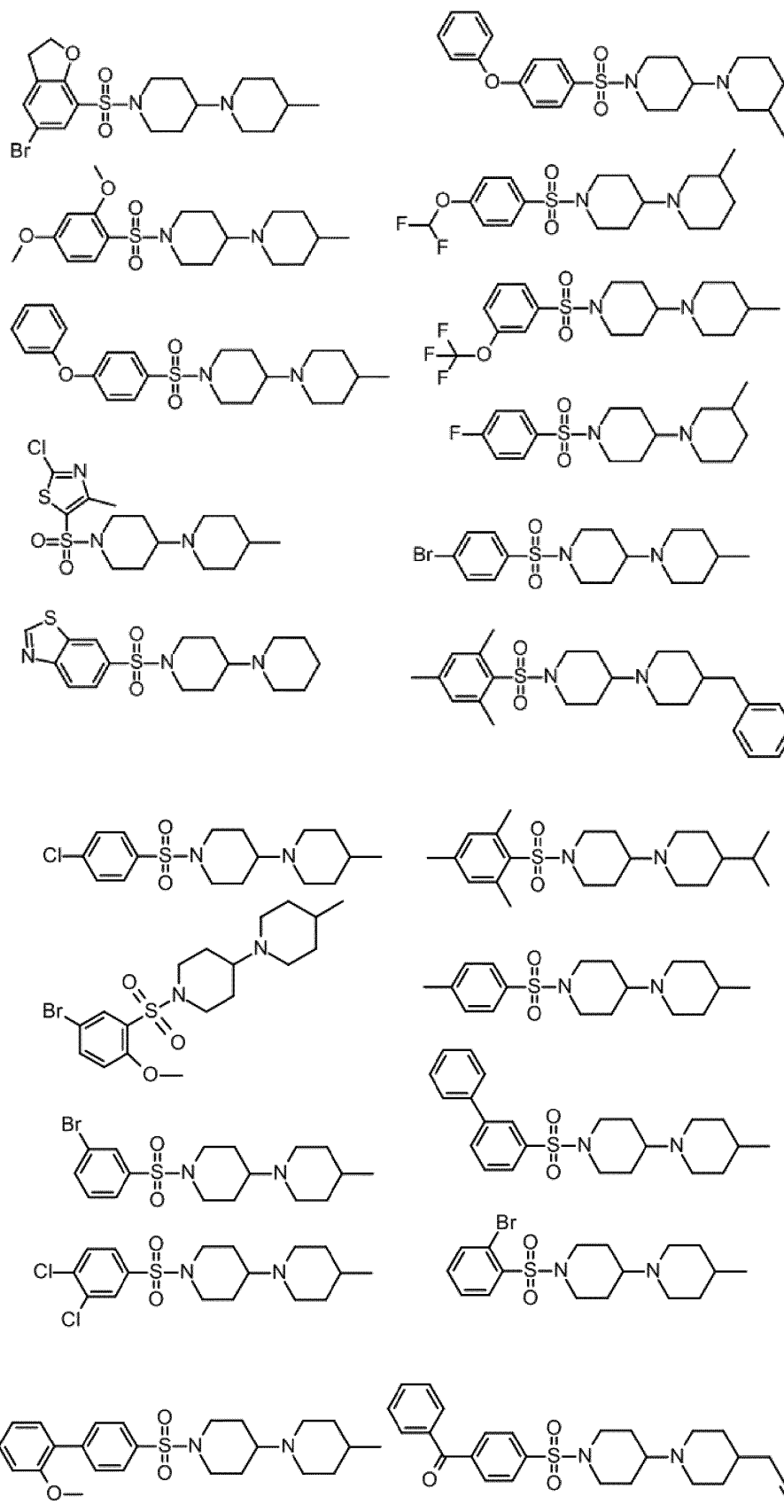
50

55

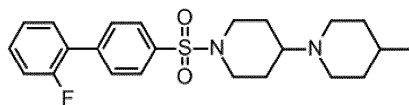
60

65





5



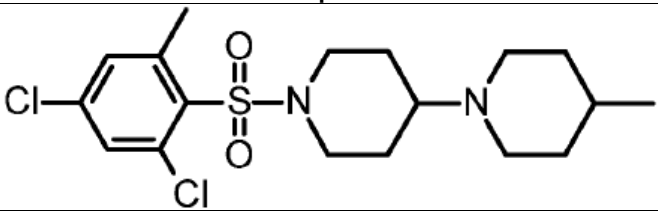
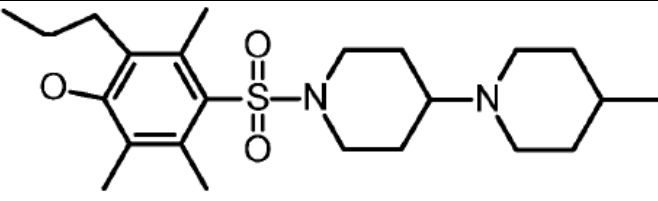
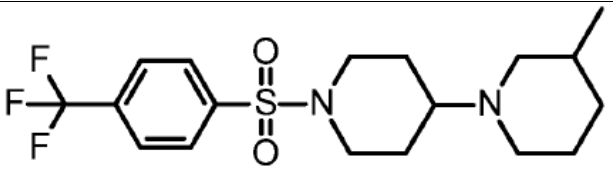
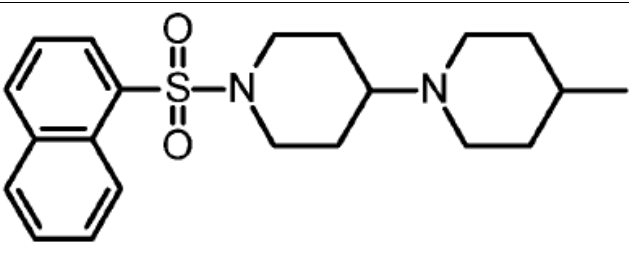
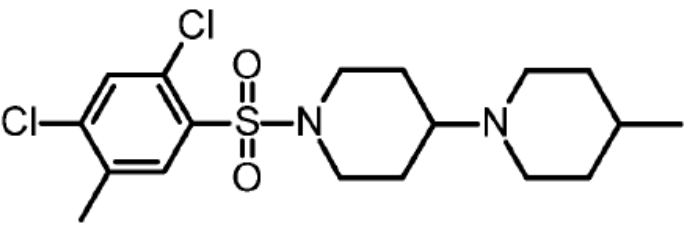
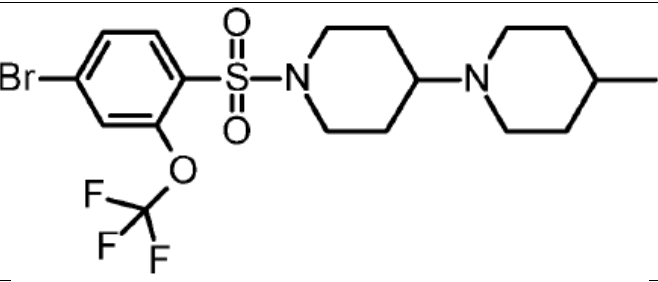
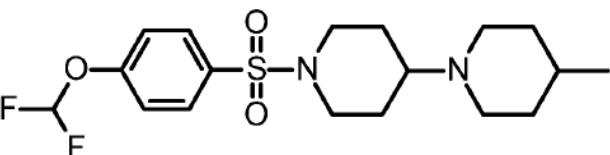
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 10 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el valor de IC_{50} del compuesto en las células DLD-1 es:

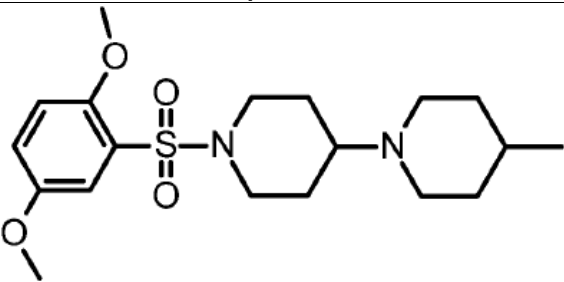
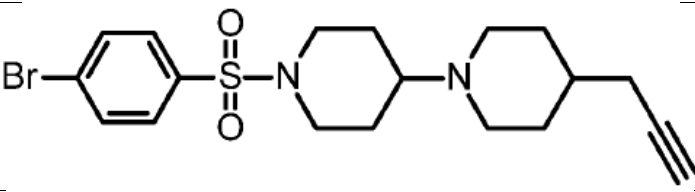
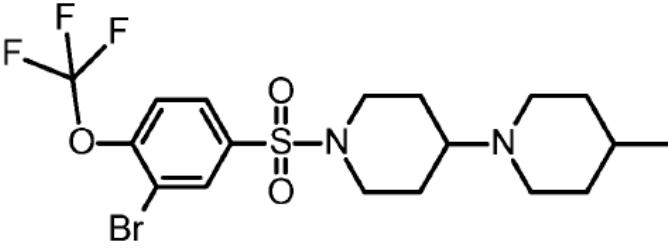
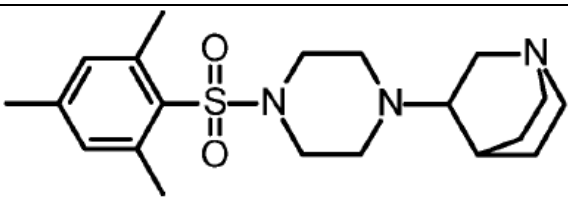
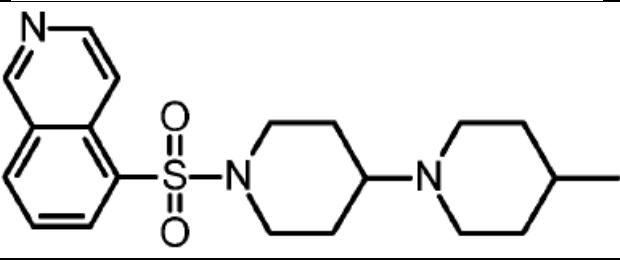
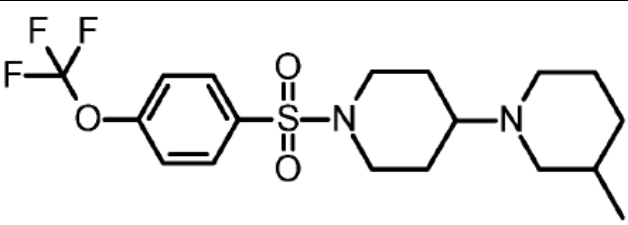
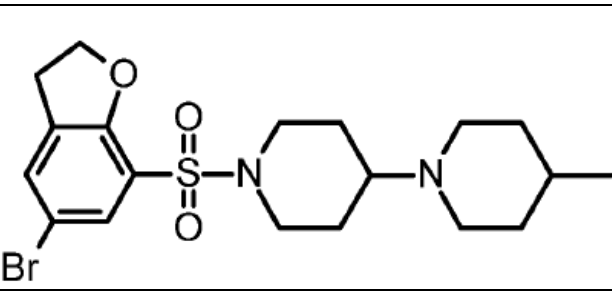
Compuesto	$IC_{50}(nM)$
	0,03
	0,7
	10
	0,1
	0,96
	0,6

65

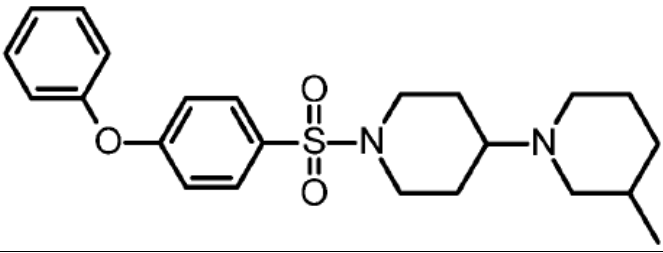
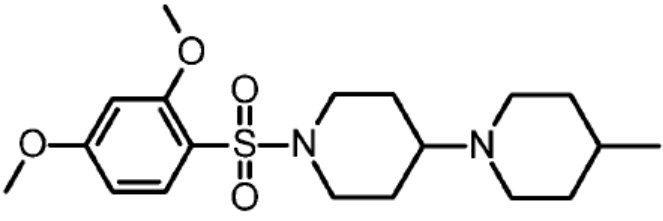
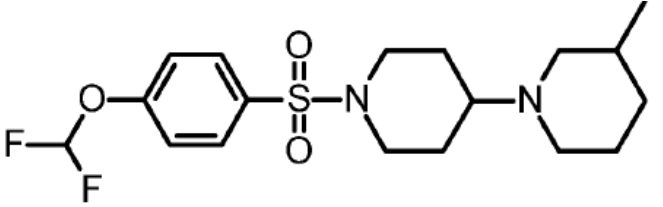
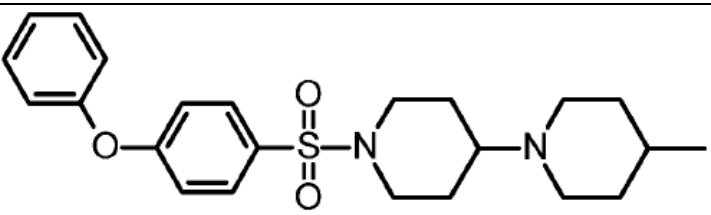
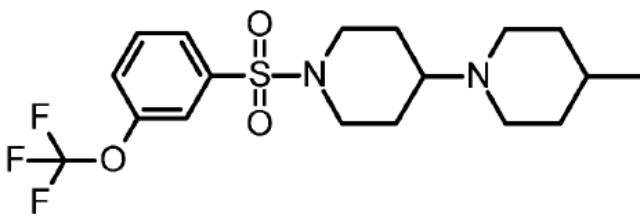
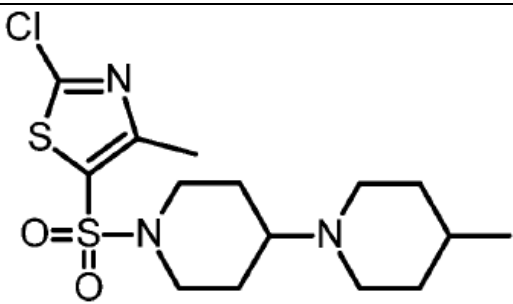
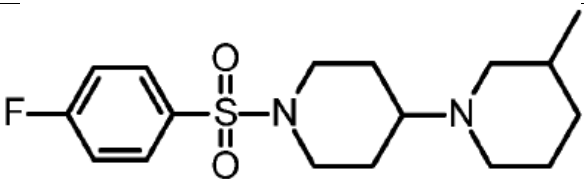
Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	0,6
	1,2
	29
	0,65
	2
	5
	4,8

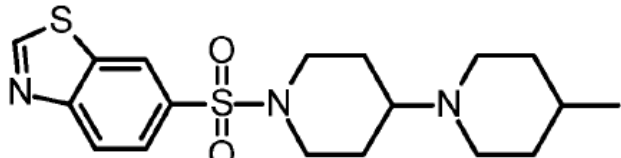
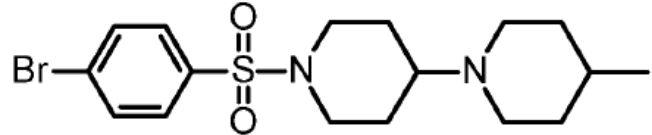
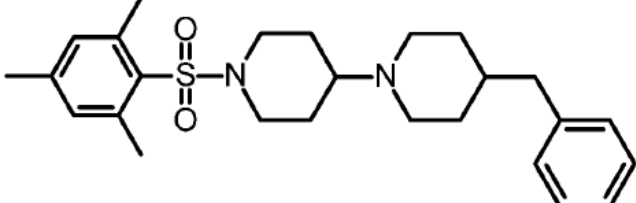
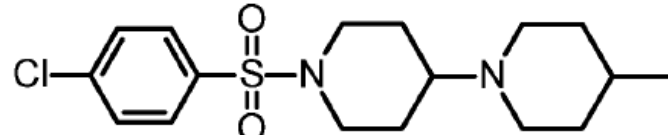
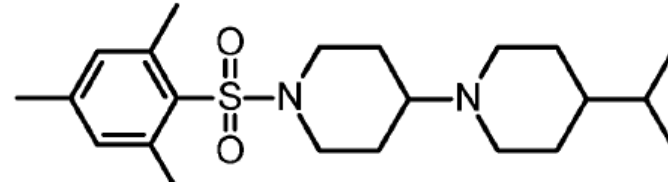
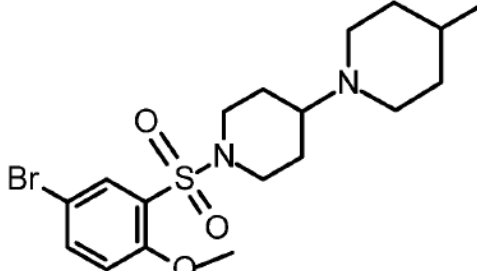
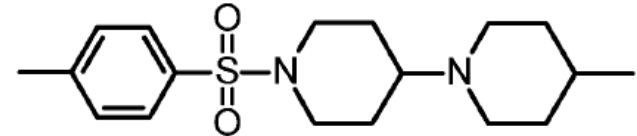
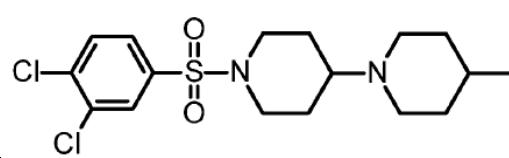
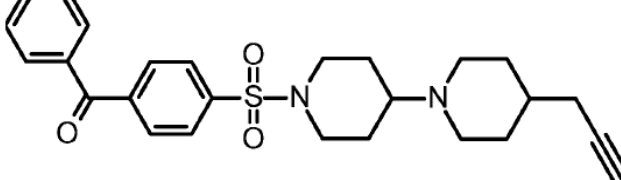
Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	4,5
	0,2
	29
	0,03
	225
	31
	96

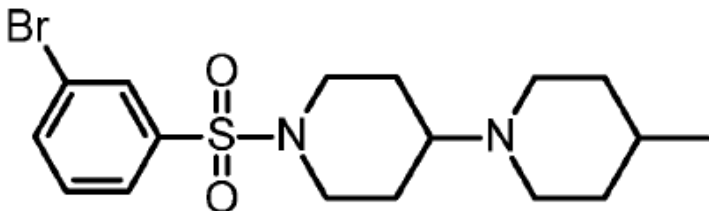
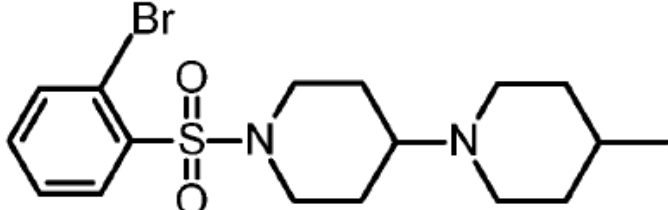
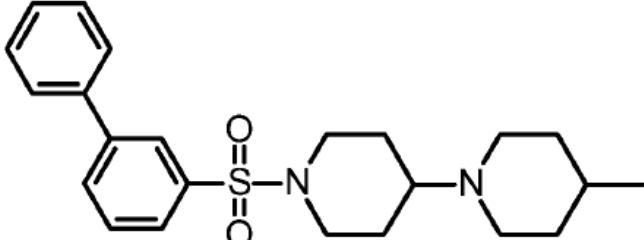
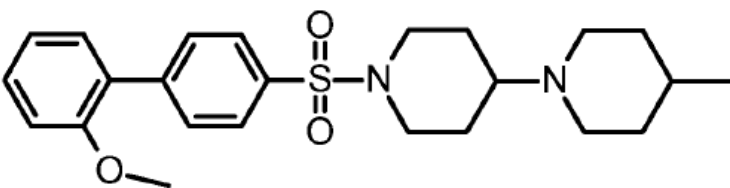
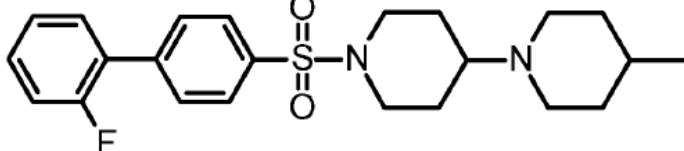
Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	244
	41
	105
	253
	56
	1,6
	255

Continuación

	Compuesto	IC ₅₀ (nM)
5		38
10		3,1
15		3,5
20		
25		2,2
30		0,3
35		
40		2
45		
50		9,1
55		2,9
60		4,8
65		

Continuación

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
	3,2
	3
	2
	26
	5

4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para usar para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación tumoral, inducir la muerte celular o una combinación de estos.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en el tratamiento del cáncer colorrectal en un sujeto cuyas células epiteliales del colon expresan al menos una proteína APC truncada.

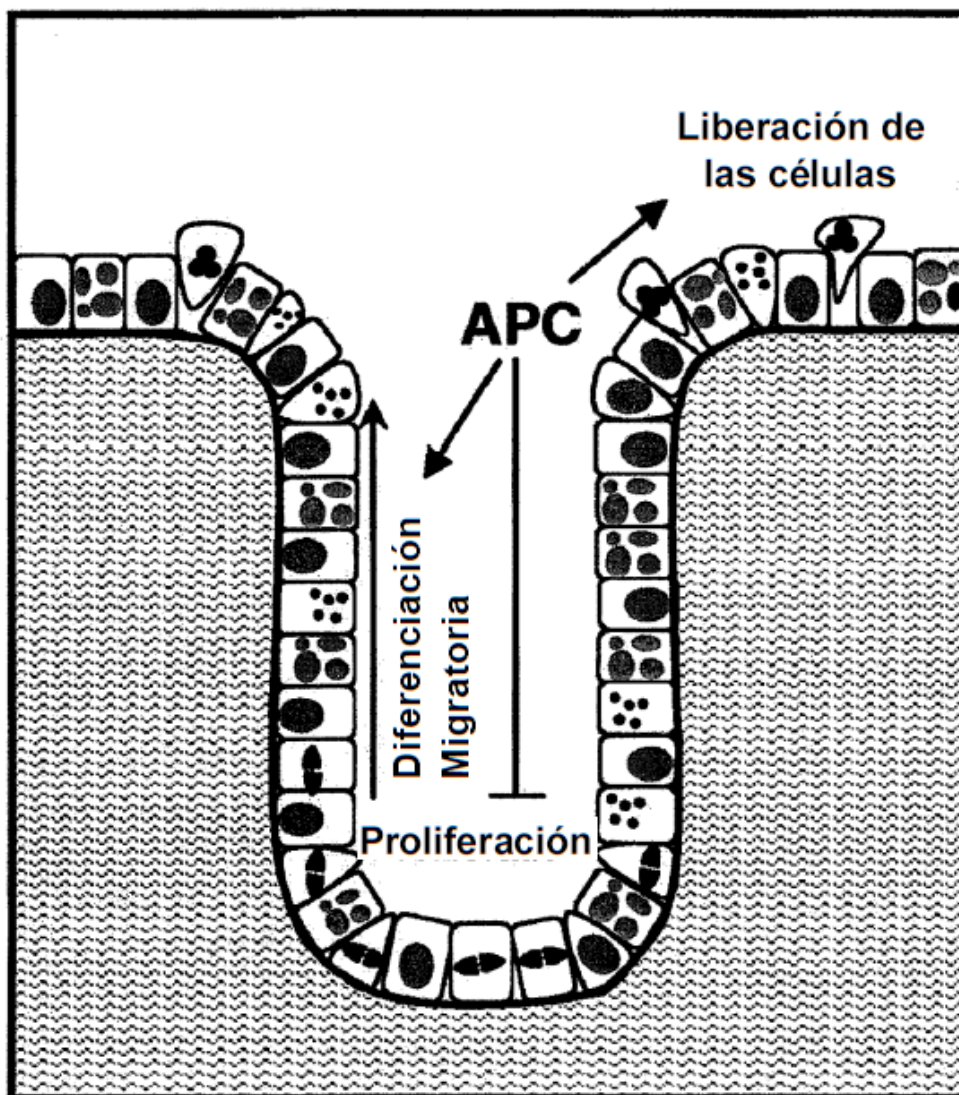


Figura 1

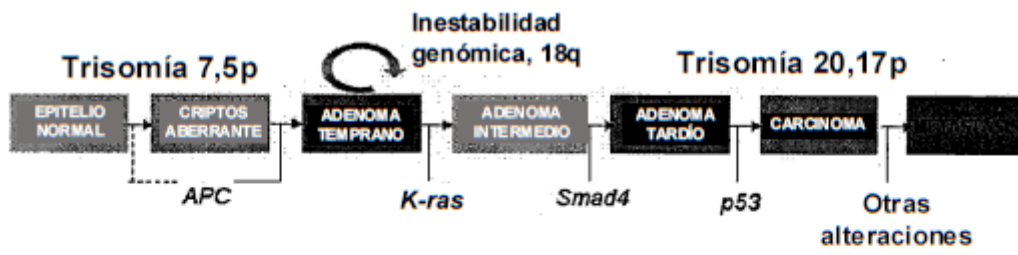


Figura 2

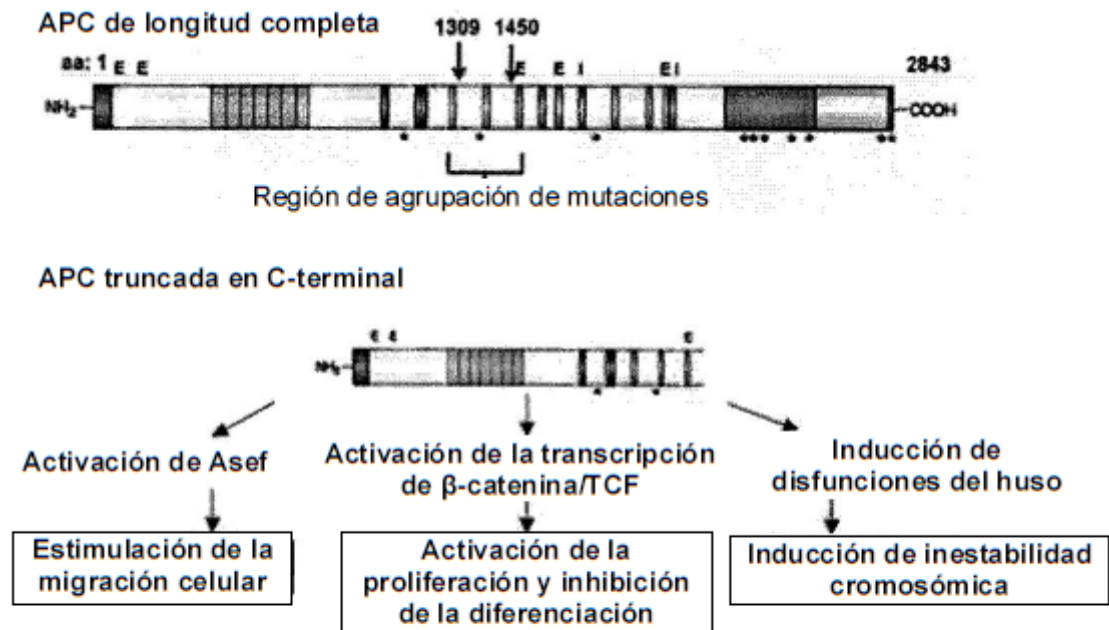


Figura 3

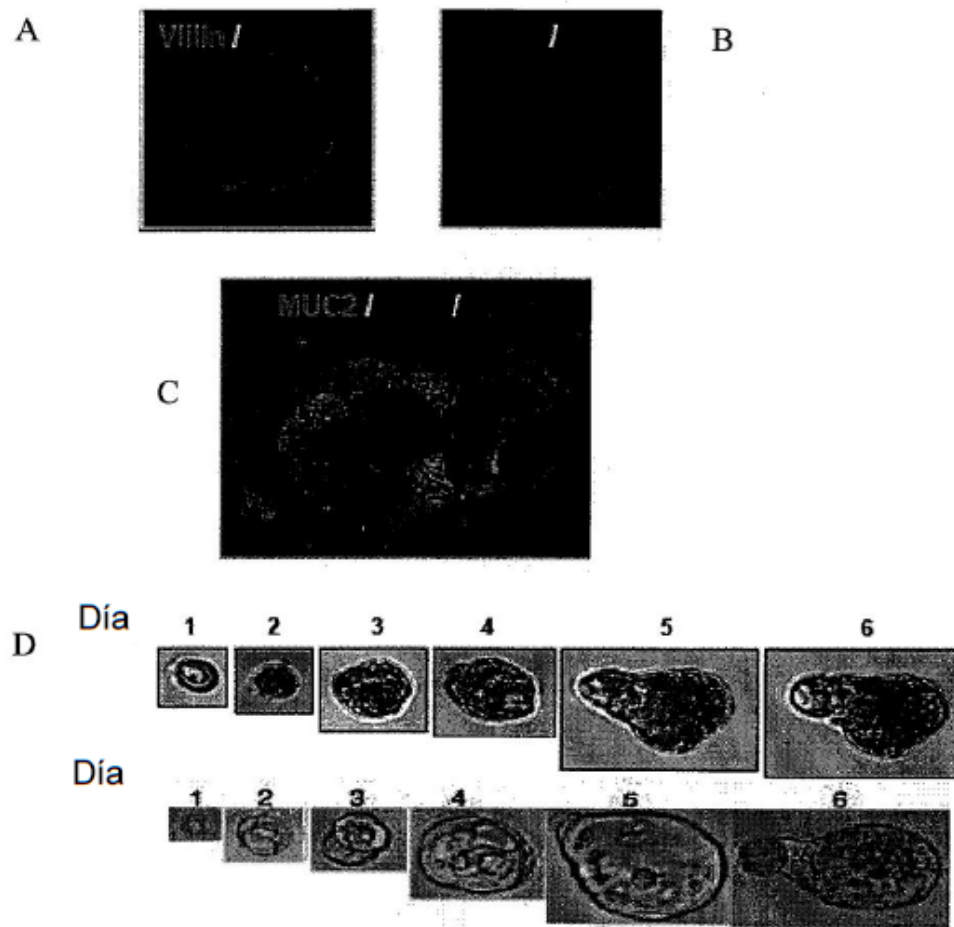


Figura 4

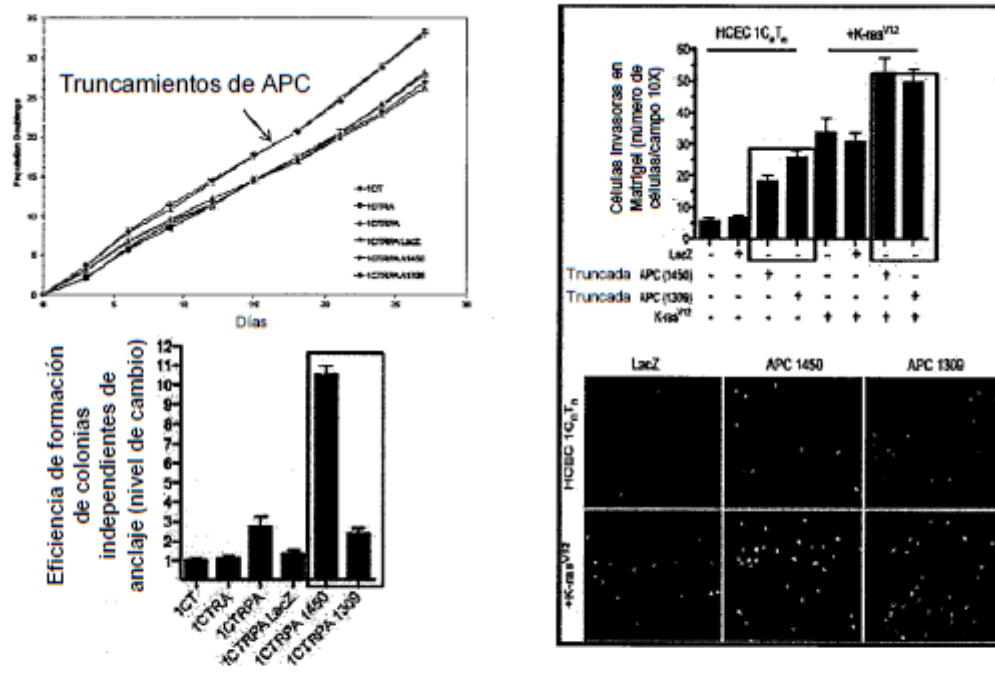


Figura 5

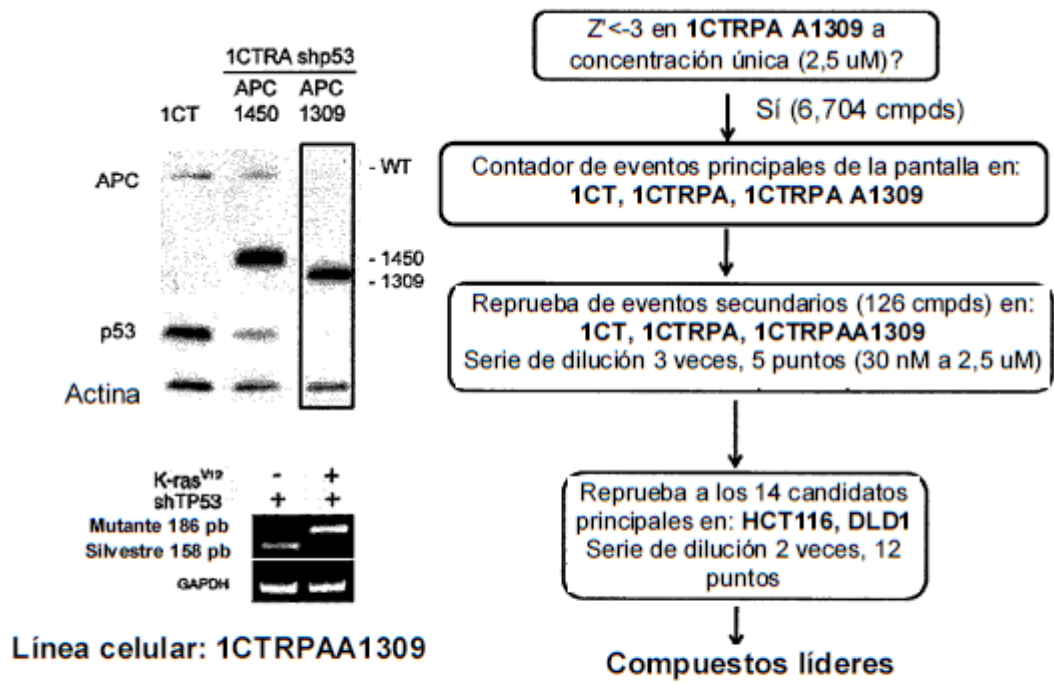


Figura 6

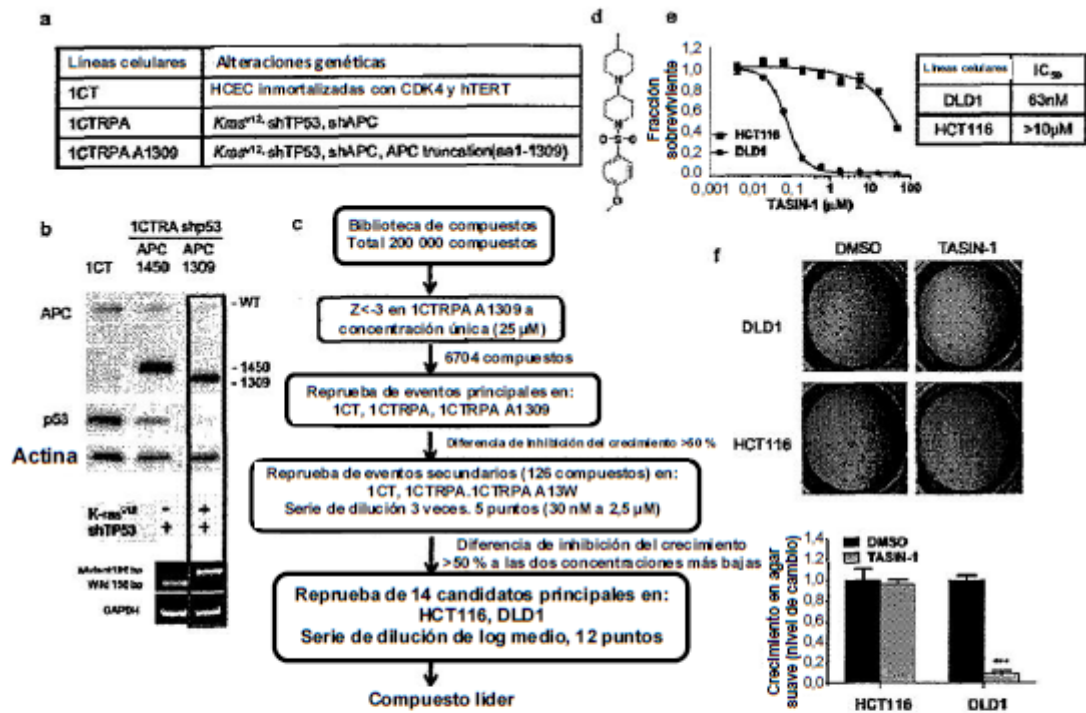


Figura 7

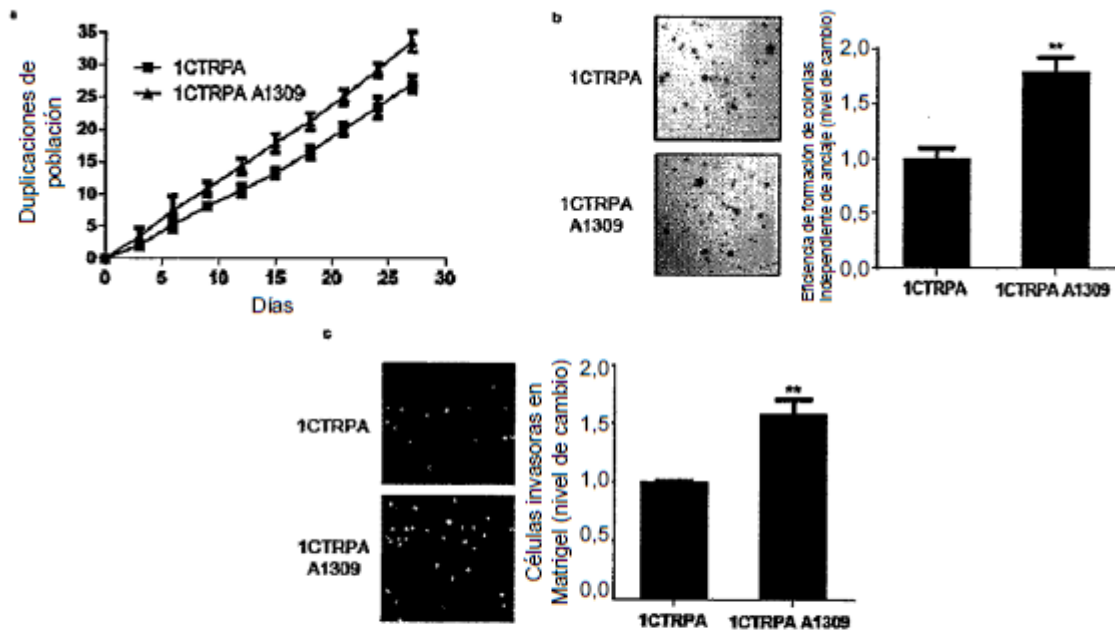


Figura 8

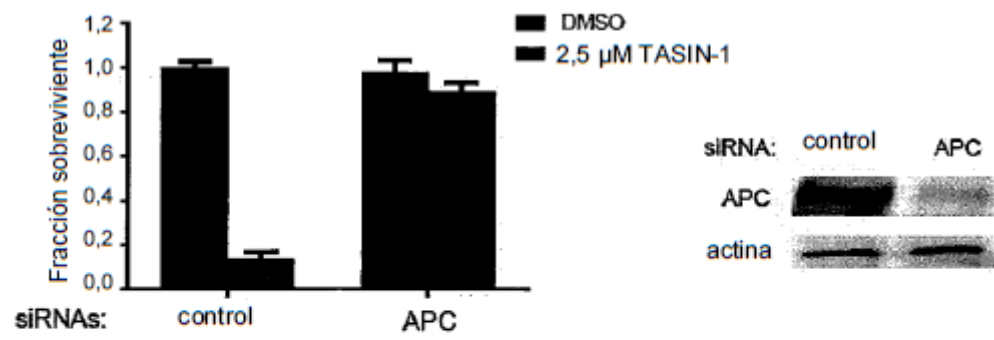


Figura 9

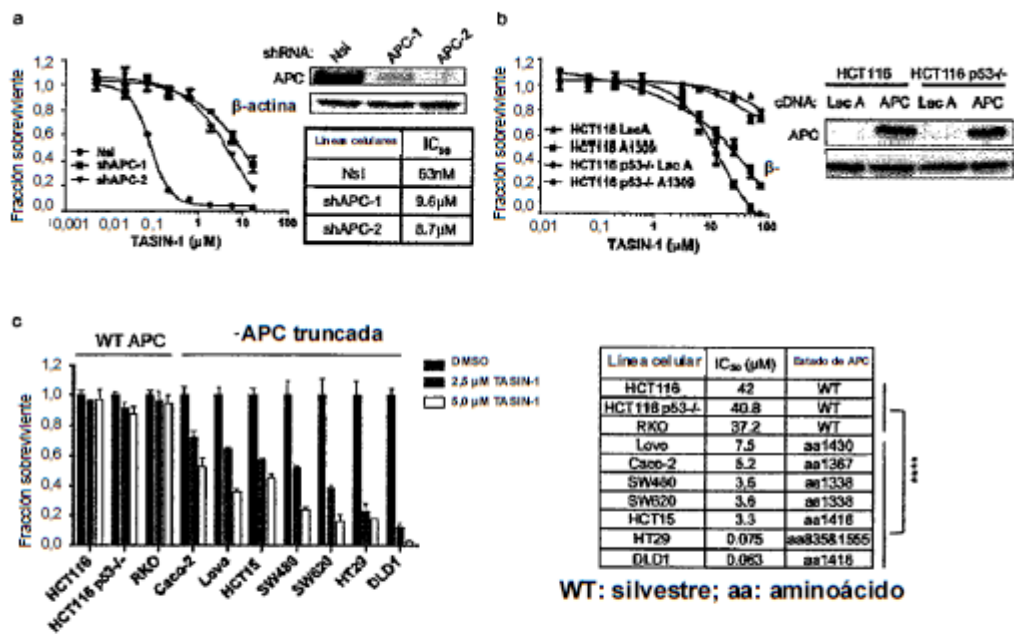


Figura 10

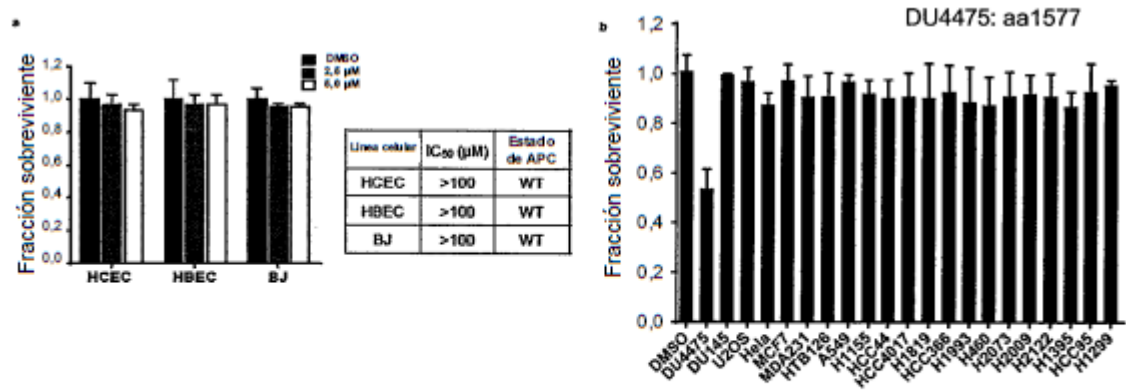


Figura 11

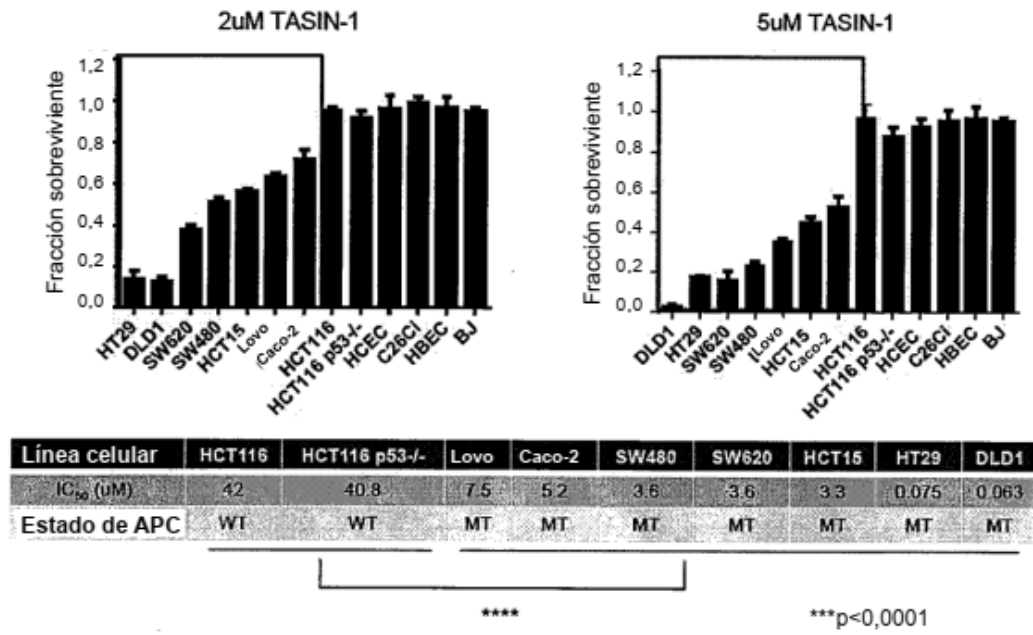


Figura 12

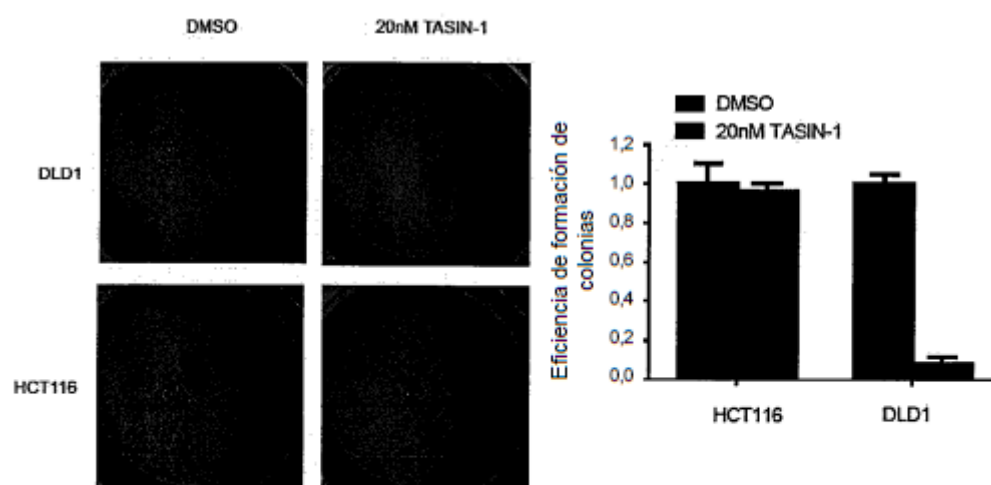


Figura 13

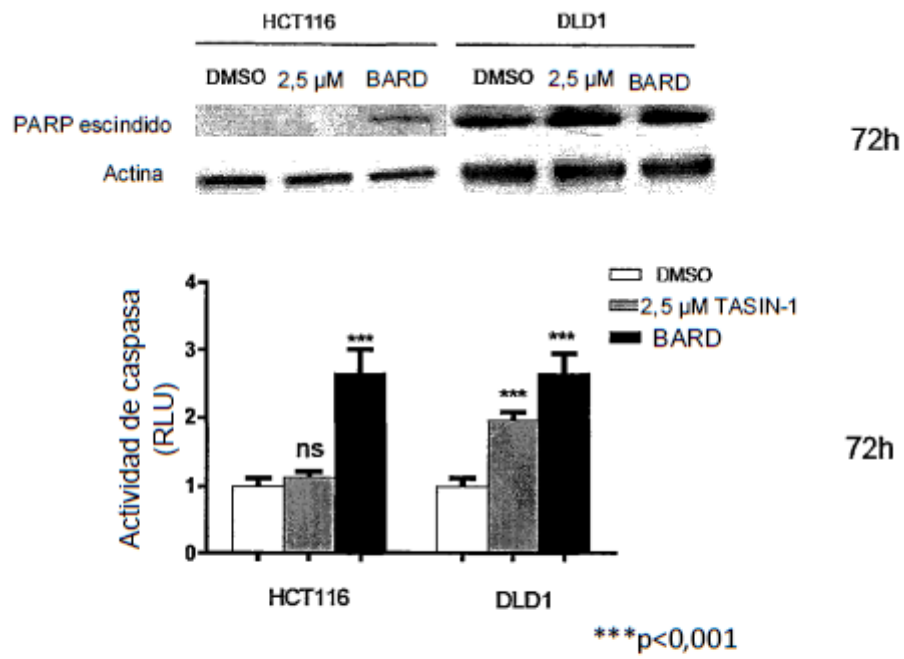


Figura 14

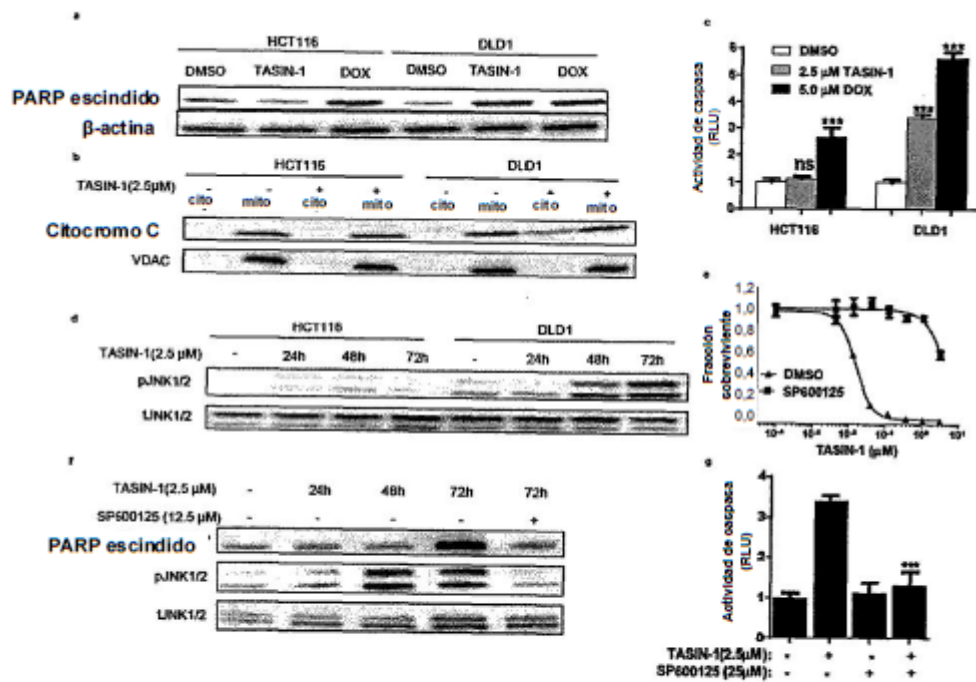
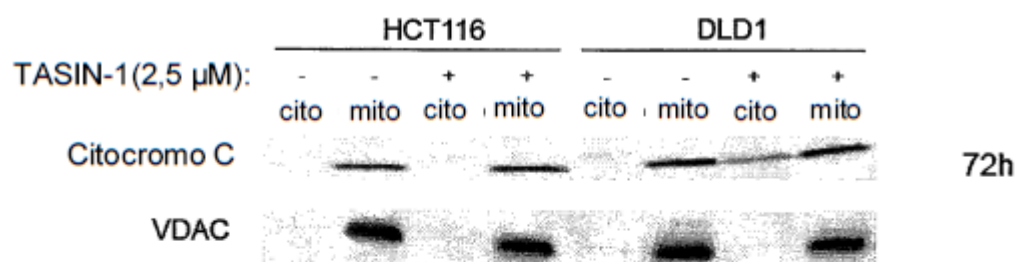


Figura 15



cito: citoplasma mito: mitocondria

Figura 16

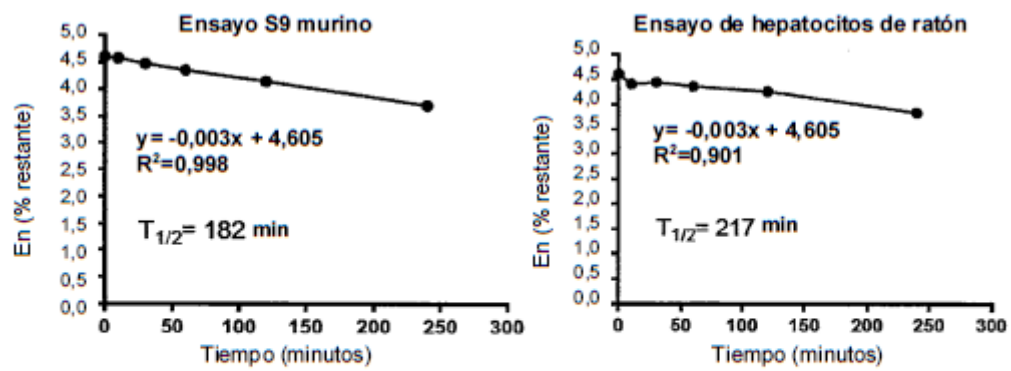


Figura 17

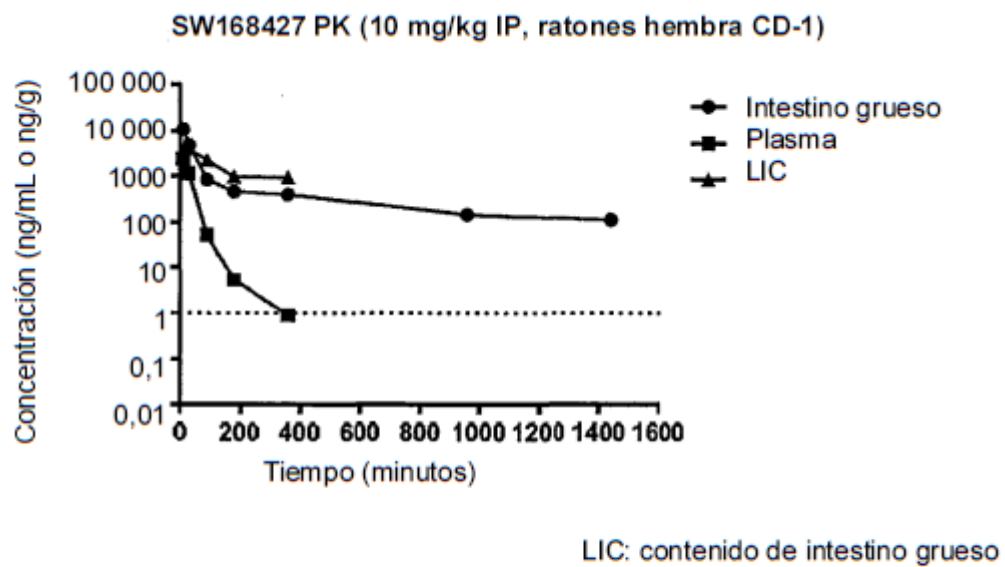


Figura 18

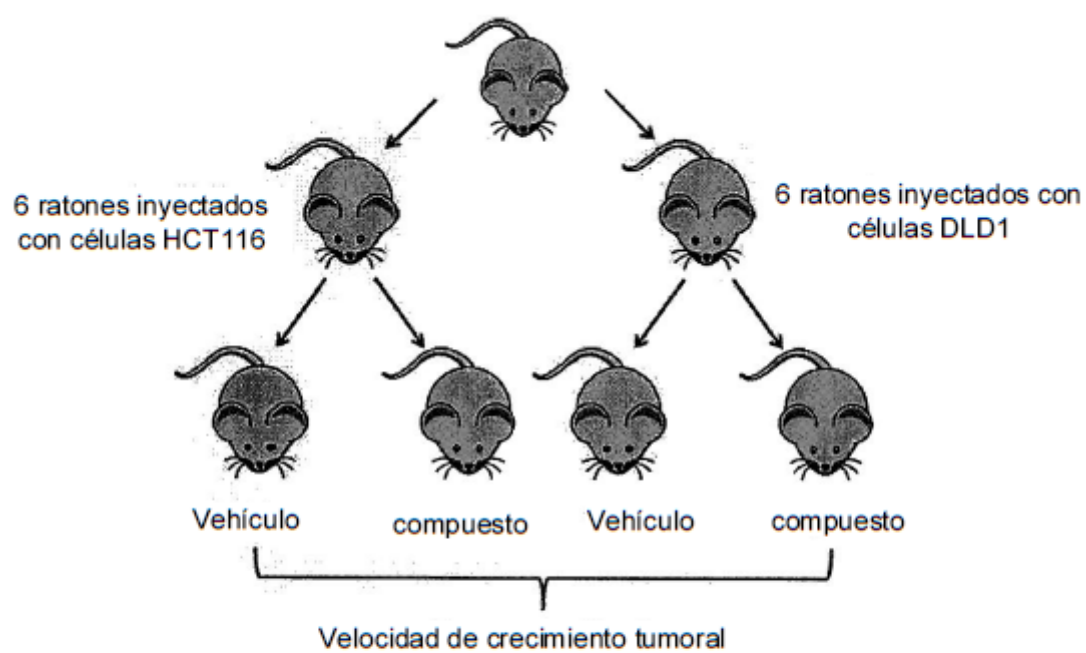


Figura 19

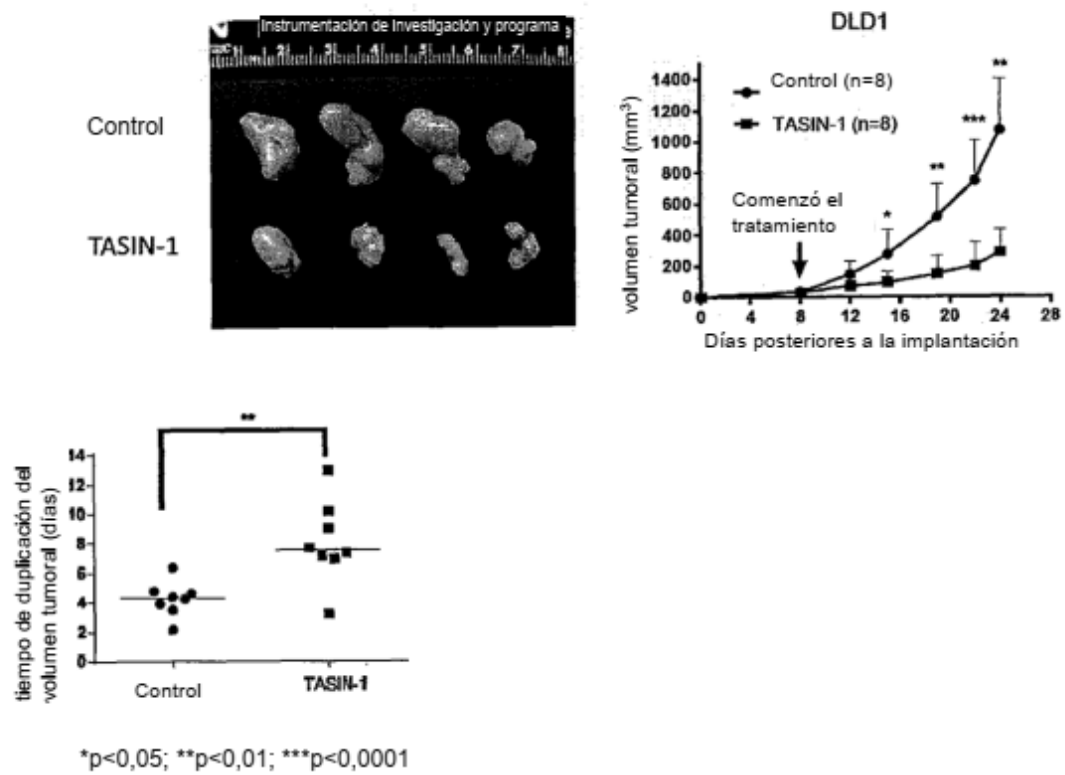


Figura 20

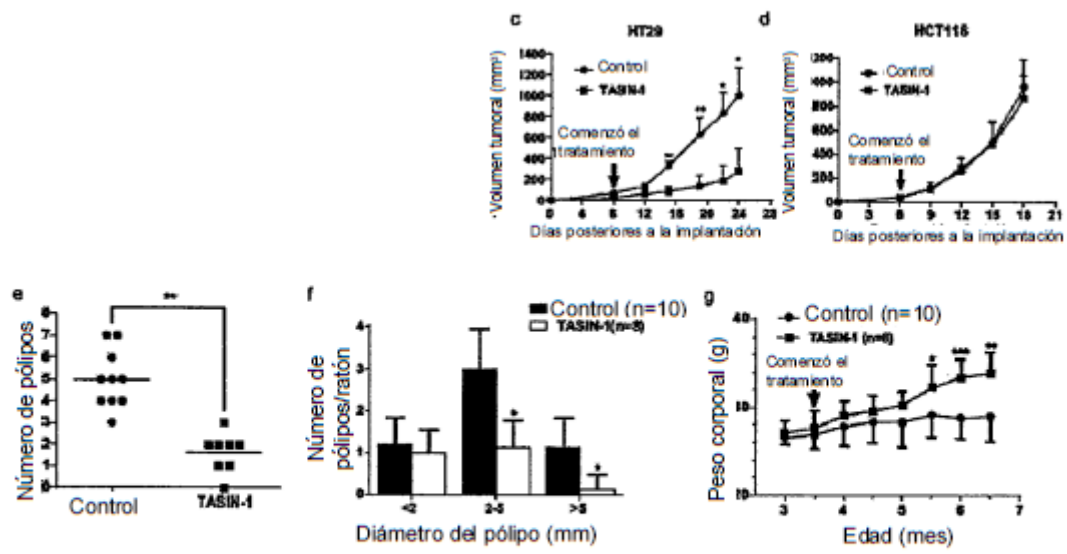


Figura 21

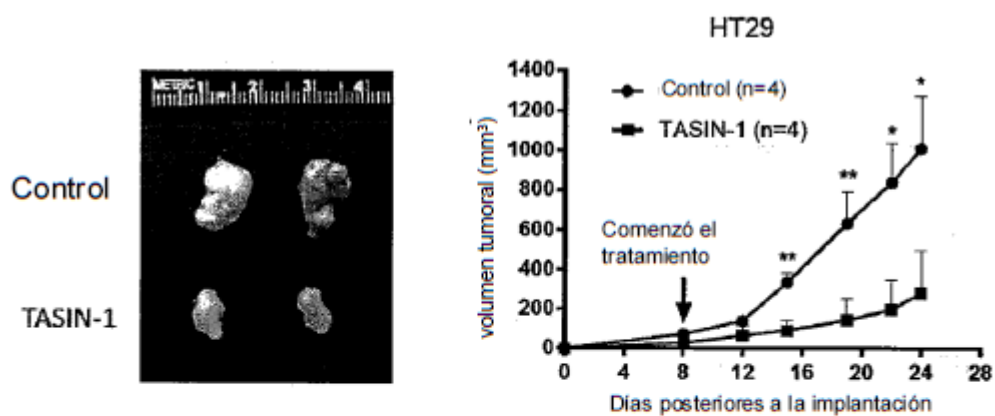


Figura 22

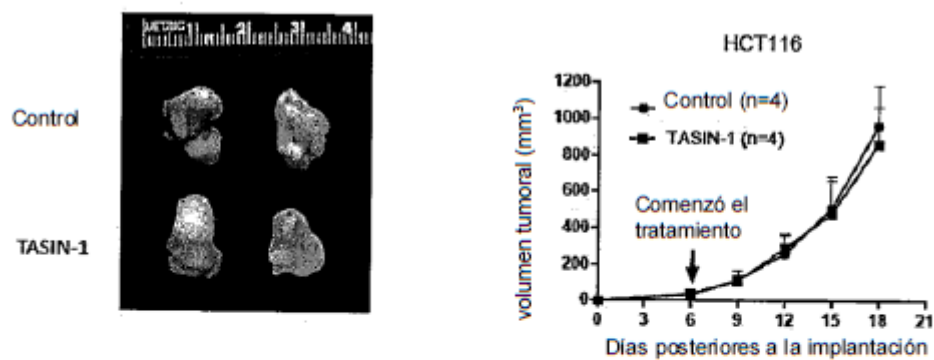


Figura 23

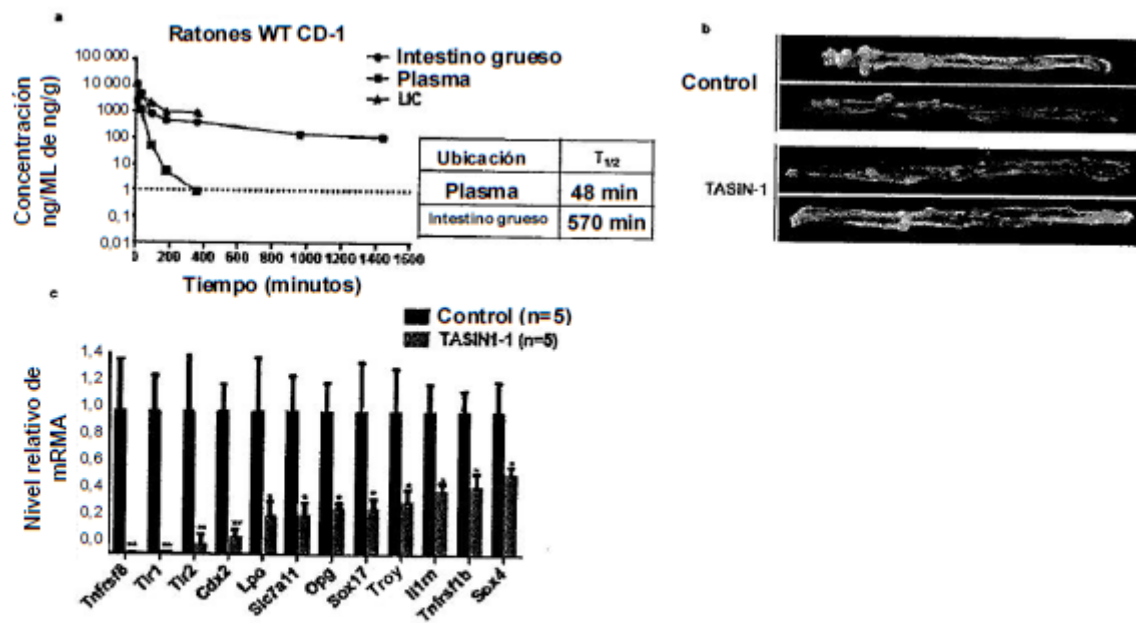


Figura 24

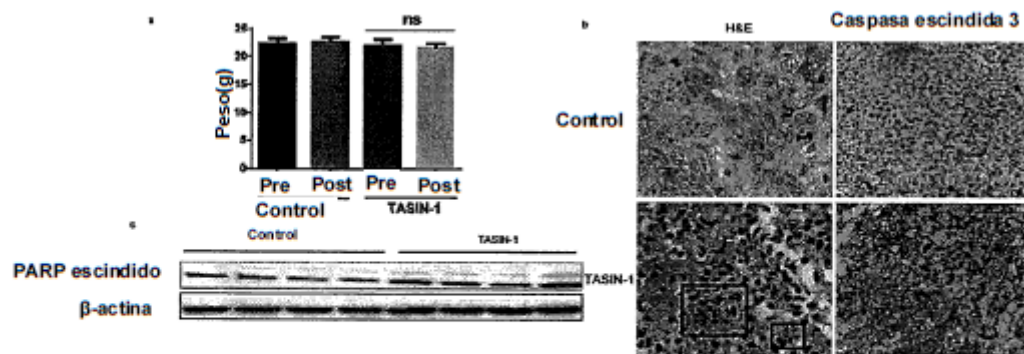


Figura 25

Análogo	TASIN-1	#2	#7	#10	#11	#13	#14	#12	#17	#18	#19	#20
IC ₅₀ (nM)	63	31	29	4.5	0.7	0.65	0.03	41	23	4.8	10	29

Análogo	#22	#23	#37	#42	#43	#44	#31	#43	#46	#48	#51	#53
IC ₅₀ (nM)	56	19	4.7	8	39	28	1.2	0.6	0.6	0.96	0.1	2

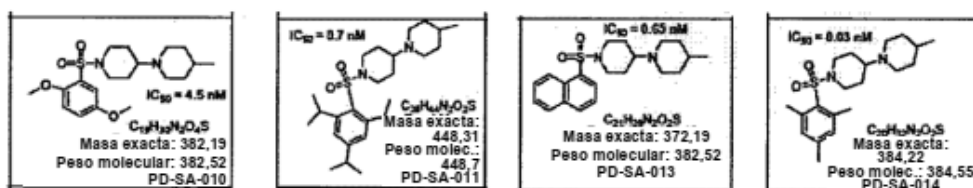


Figura 26

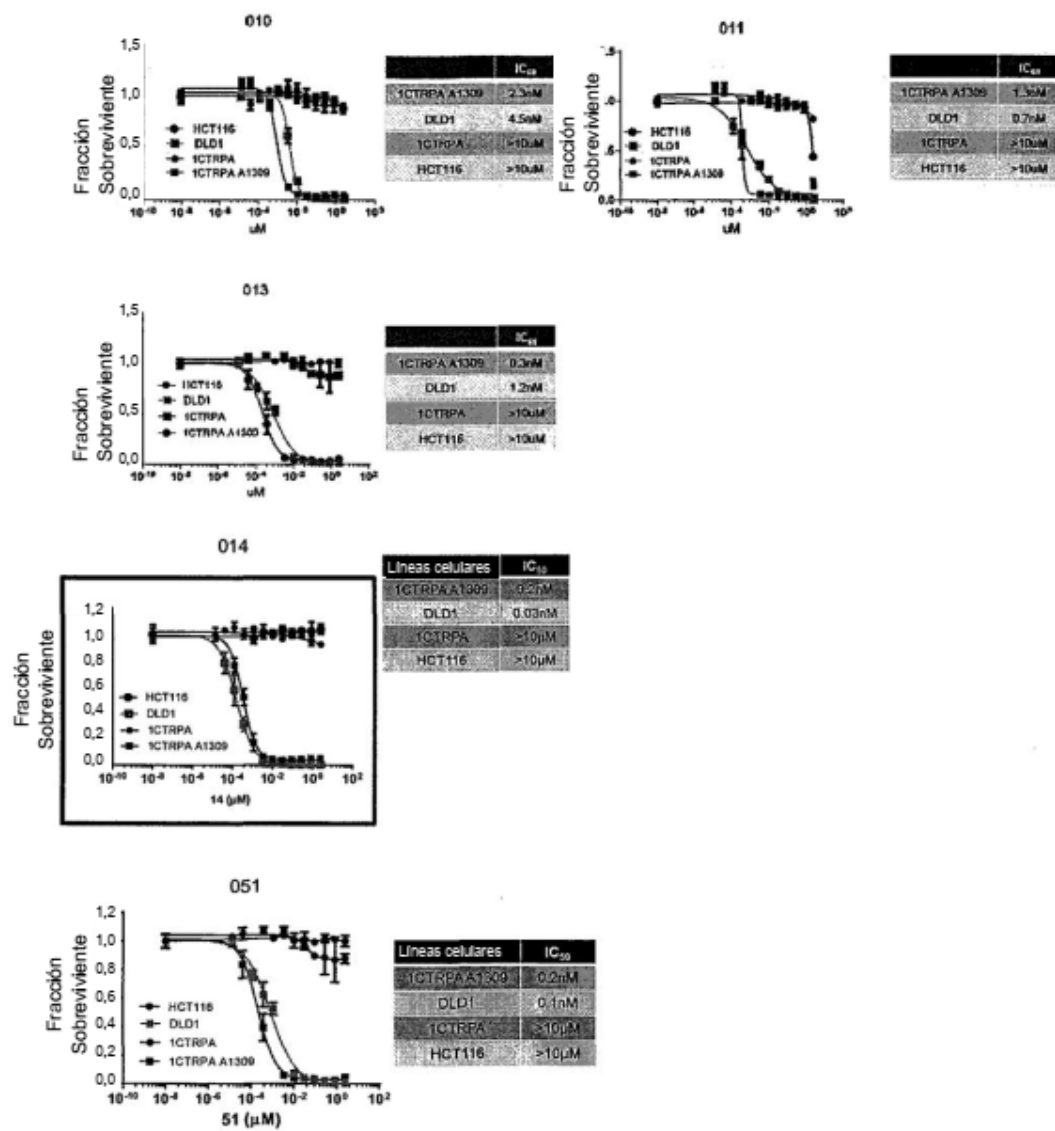


Figura 27

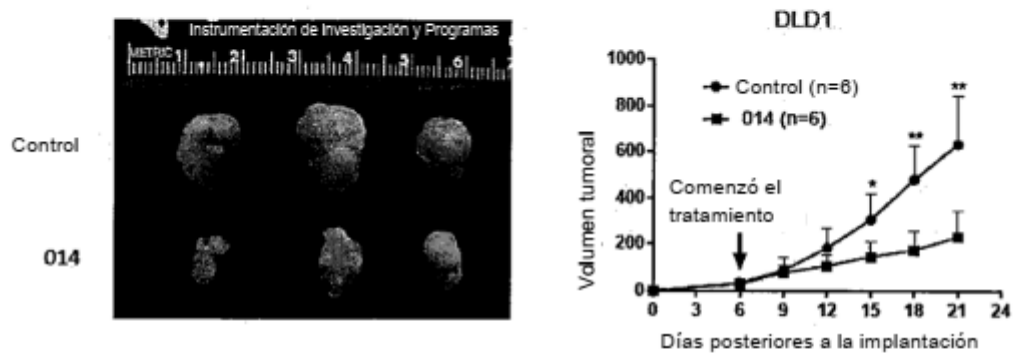


Figura 28

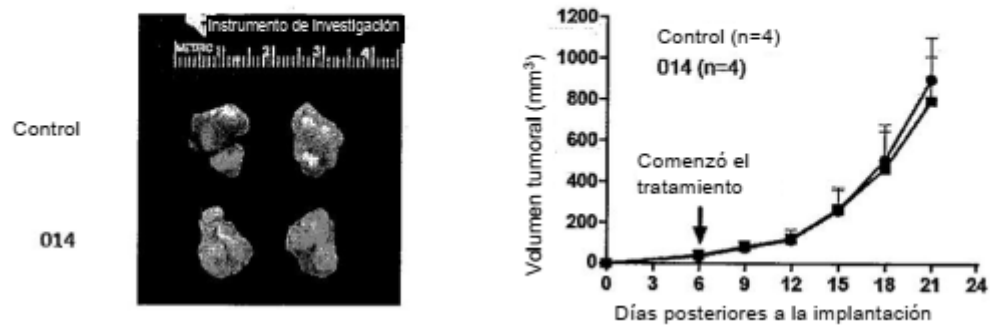
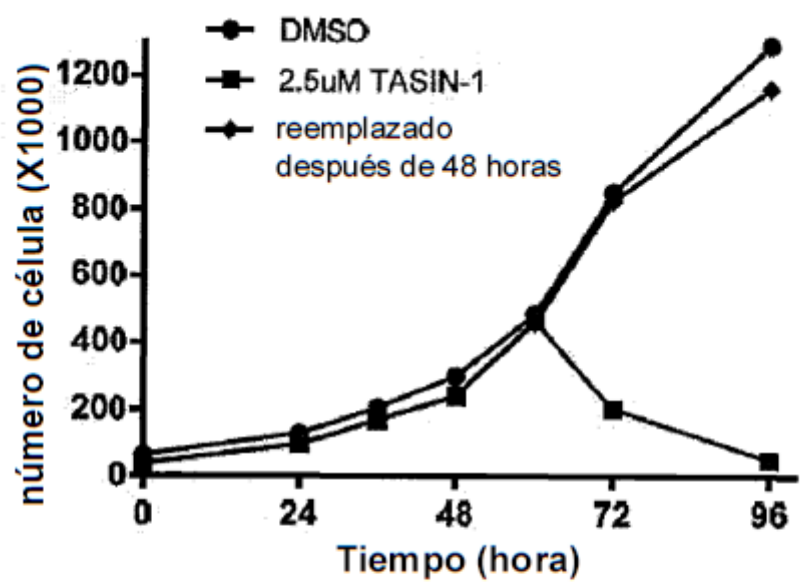


Figura 29



DLD1

Figura 30

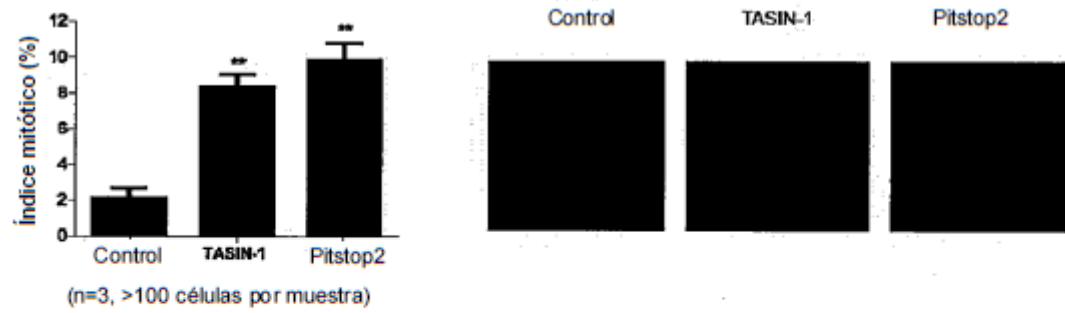


Figura 31

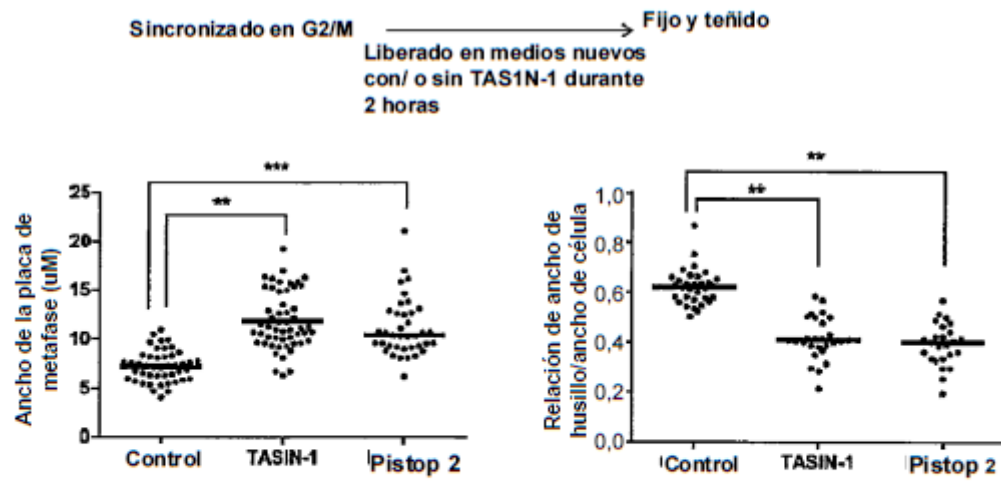


Figura 32

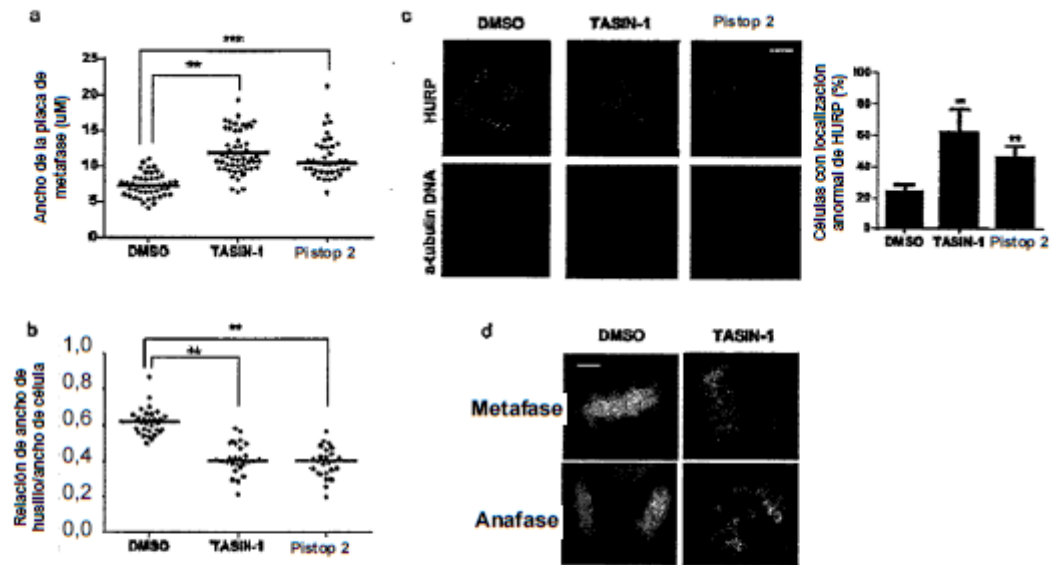


Figura 33

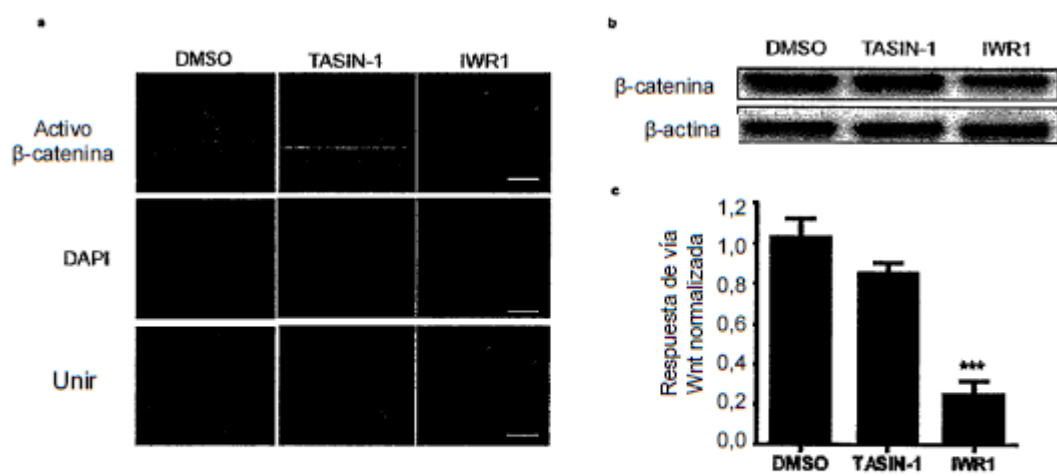


Figura 34

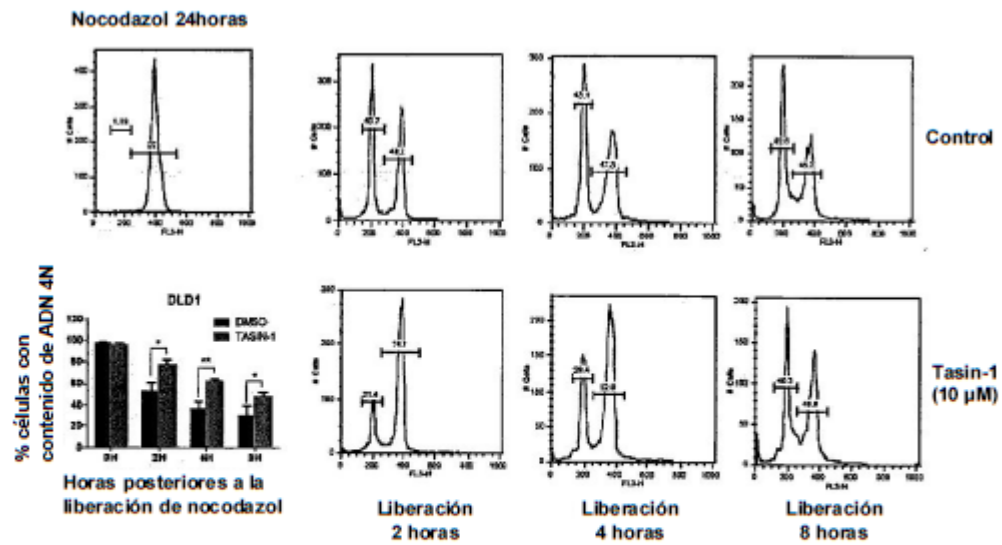


Figura 35

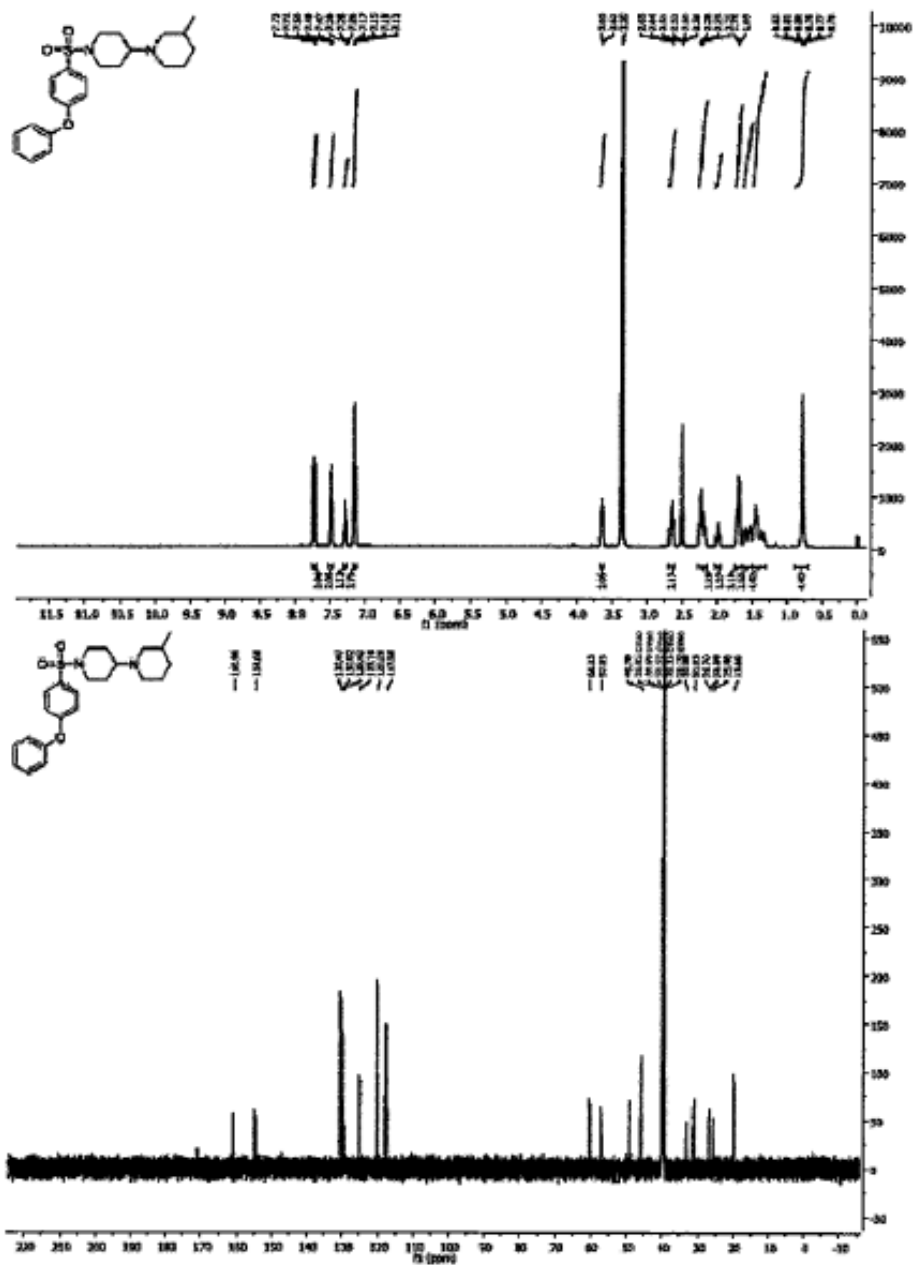


Figura 36(a)

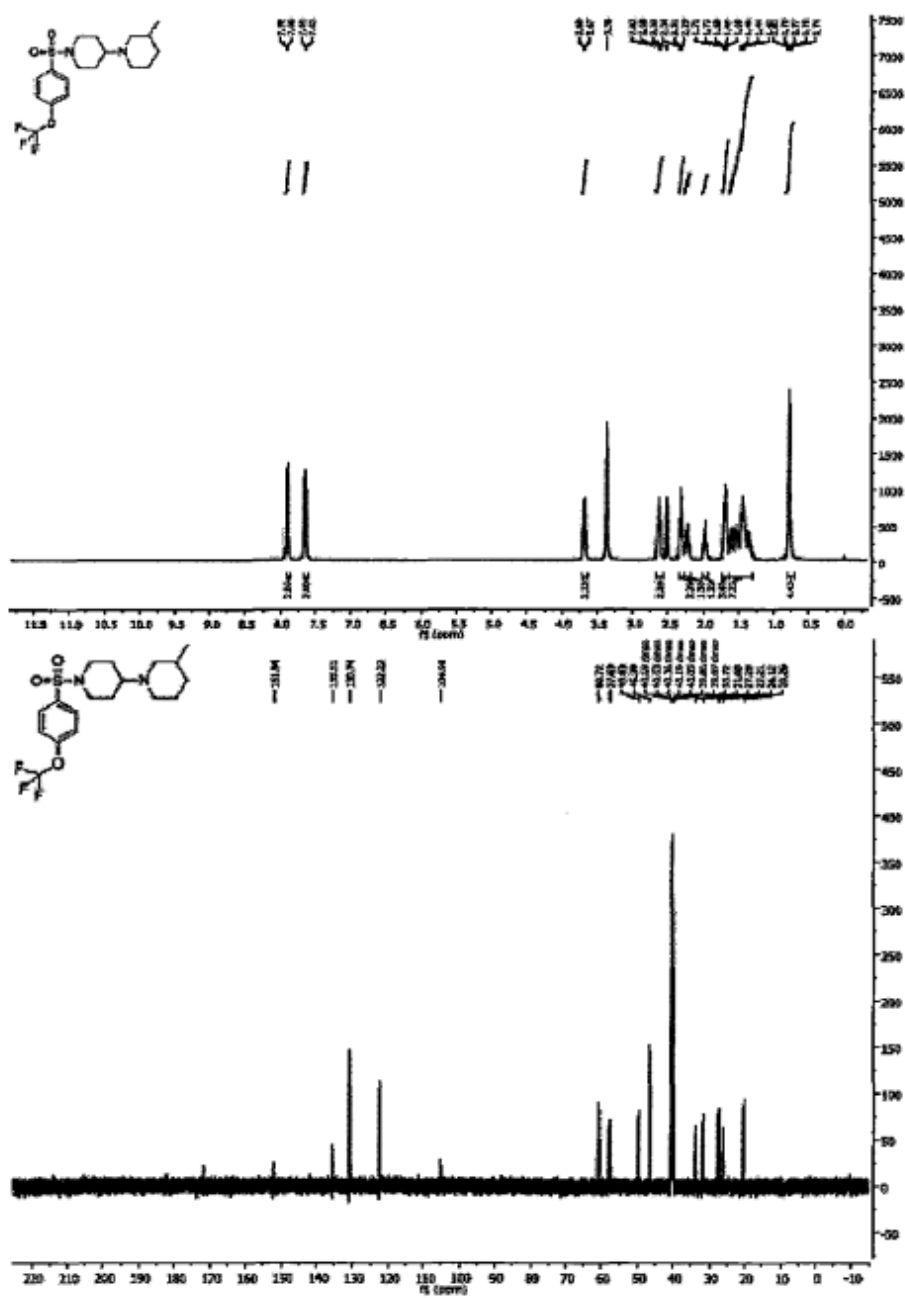


Figura 36(b)

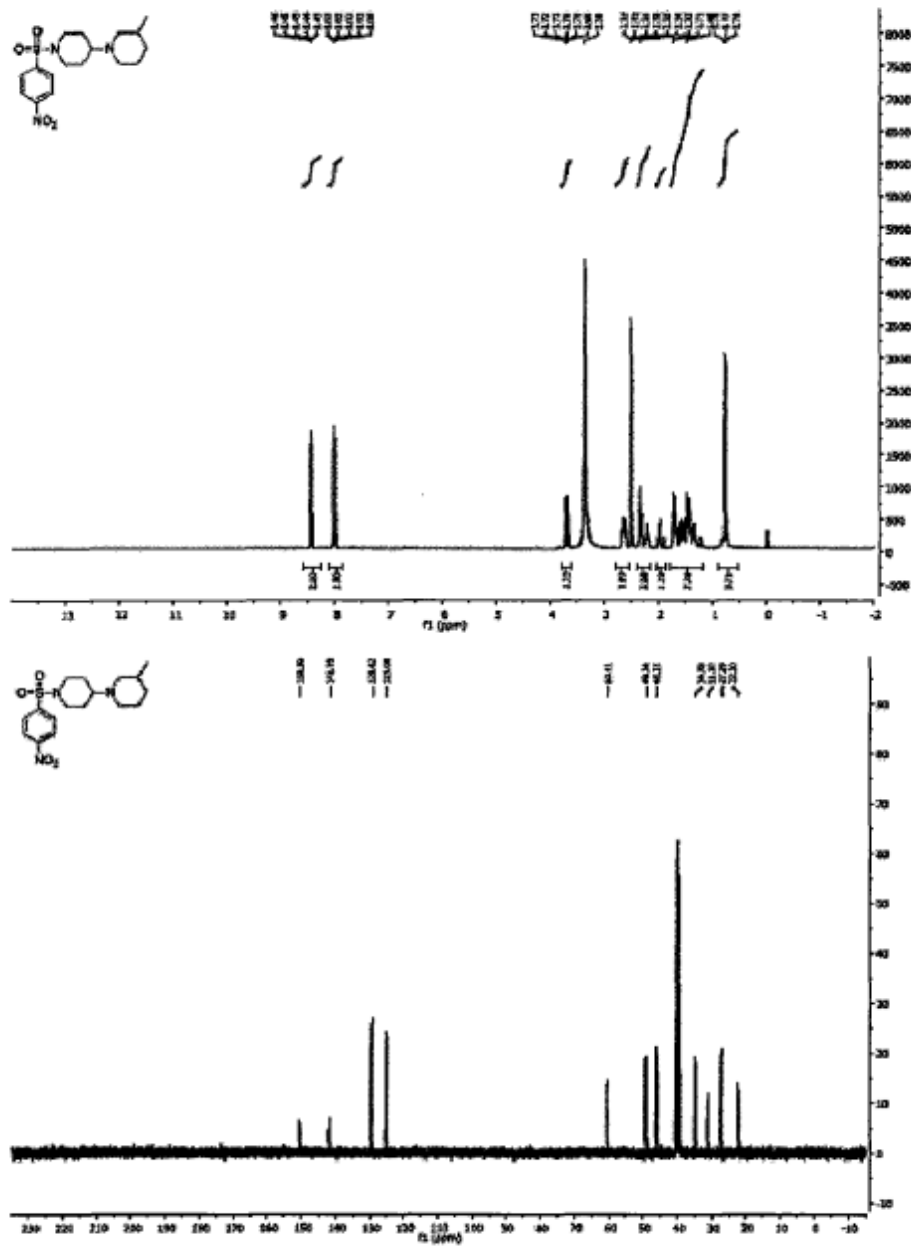


Figura 36(c)

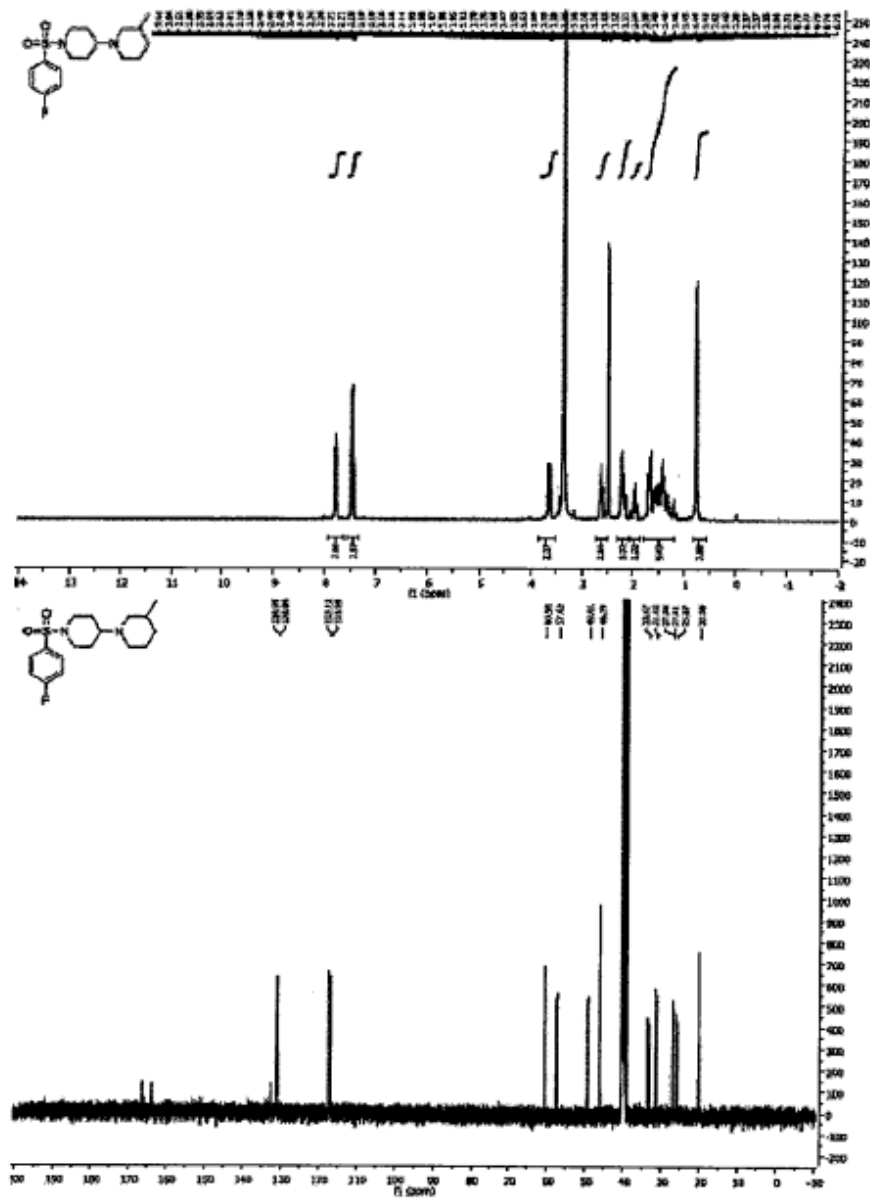


Figura 36(d)

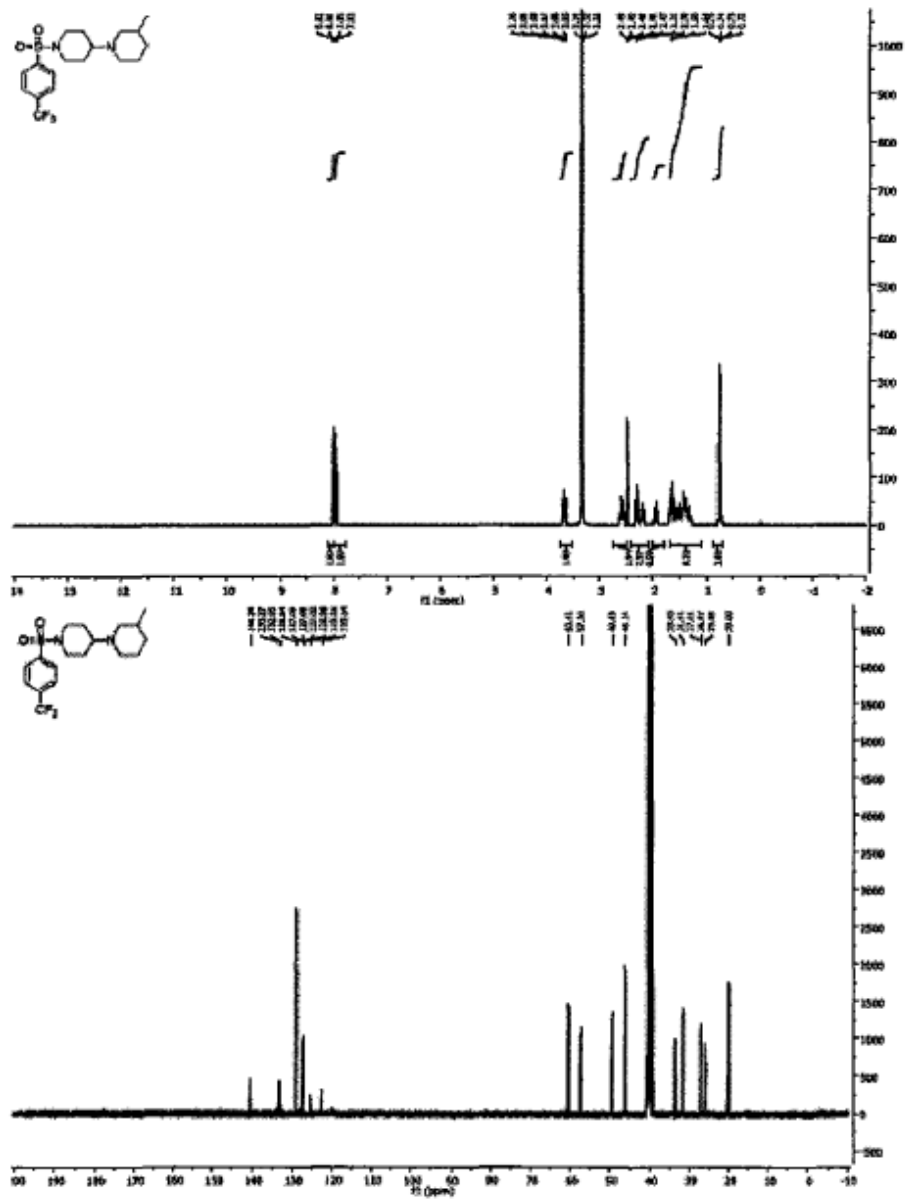


Figura 36(e)

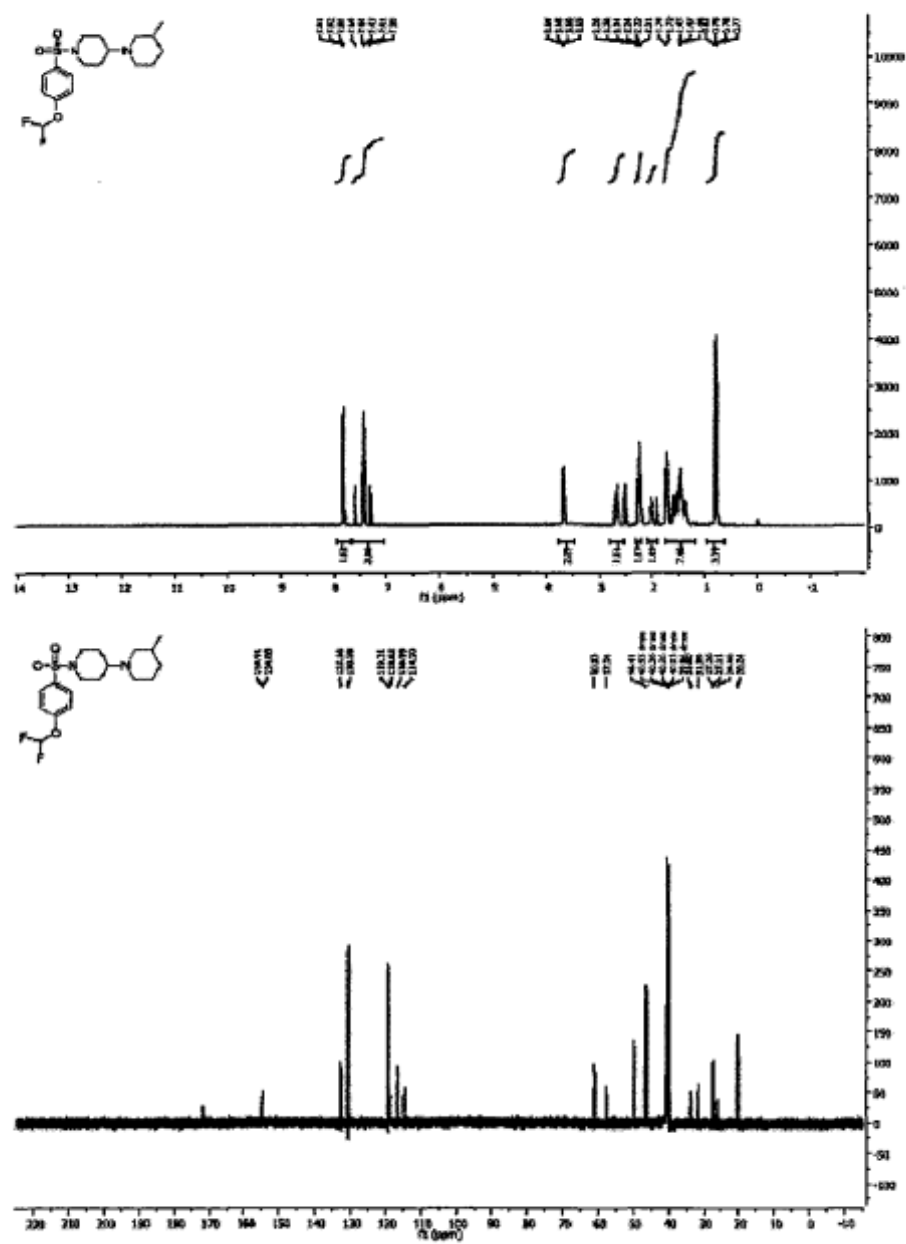


Figura 36(f)

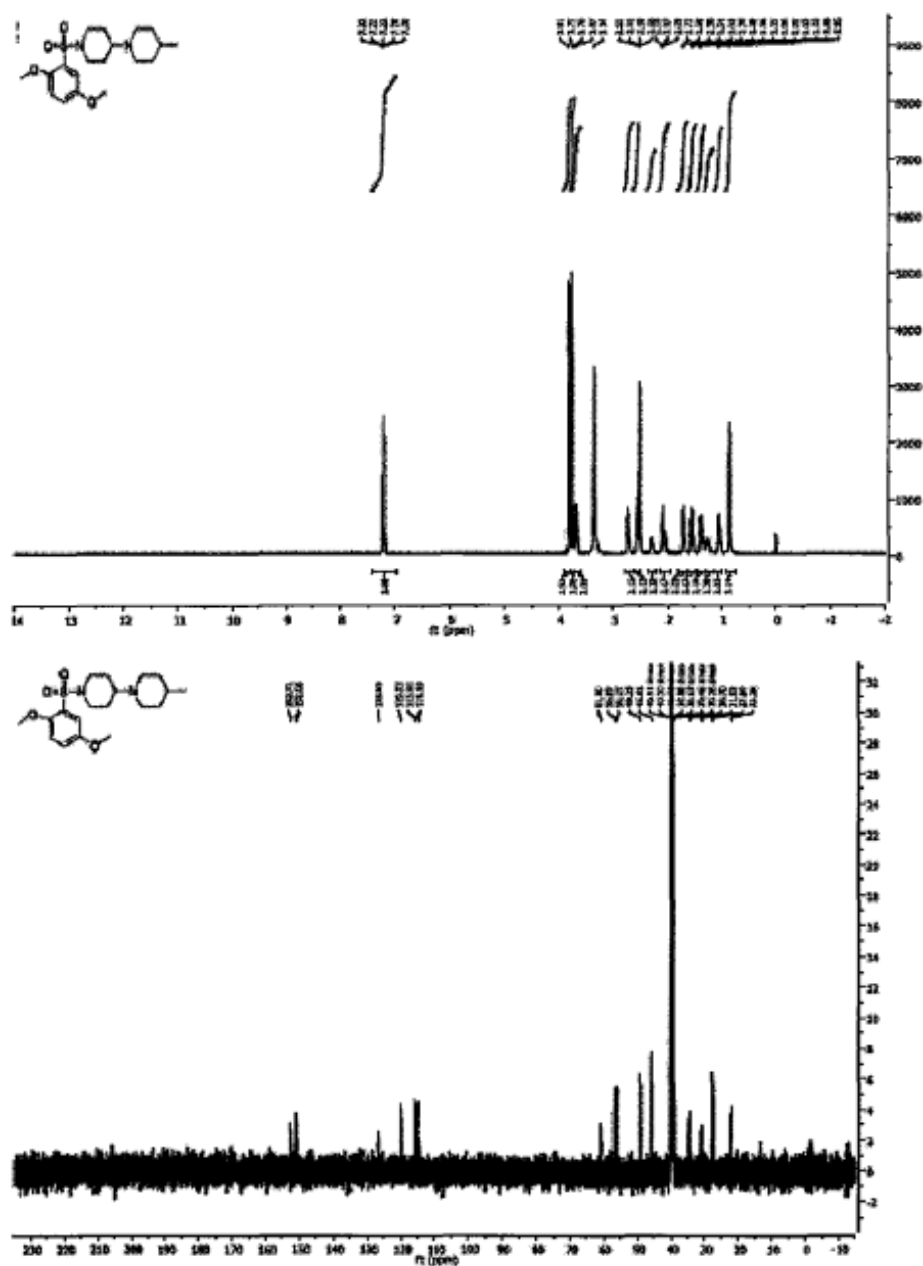


Figura 36(g)

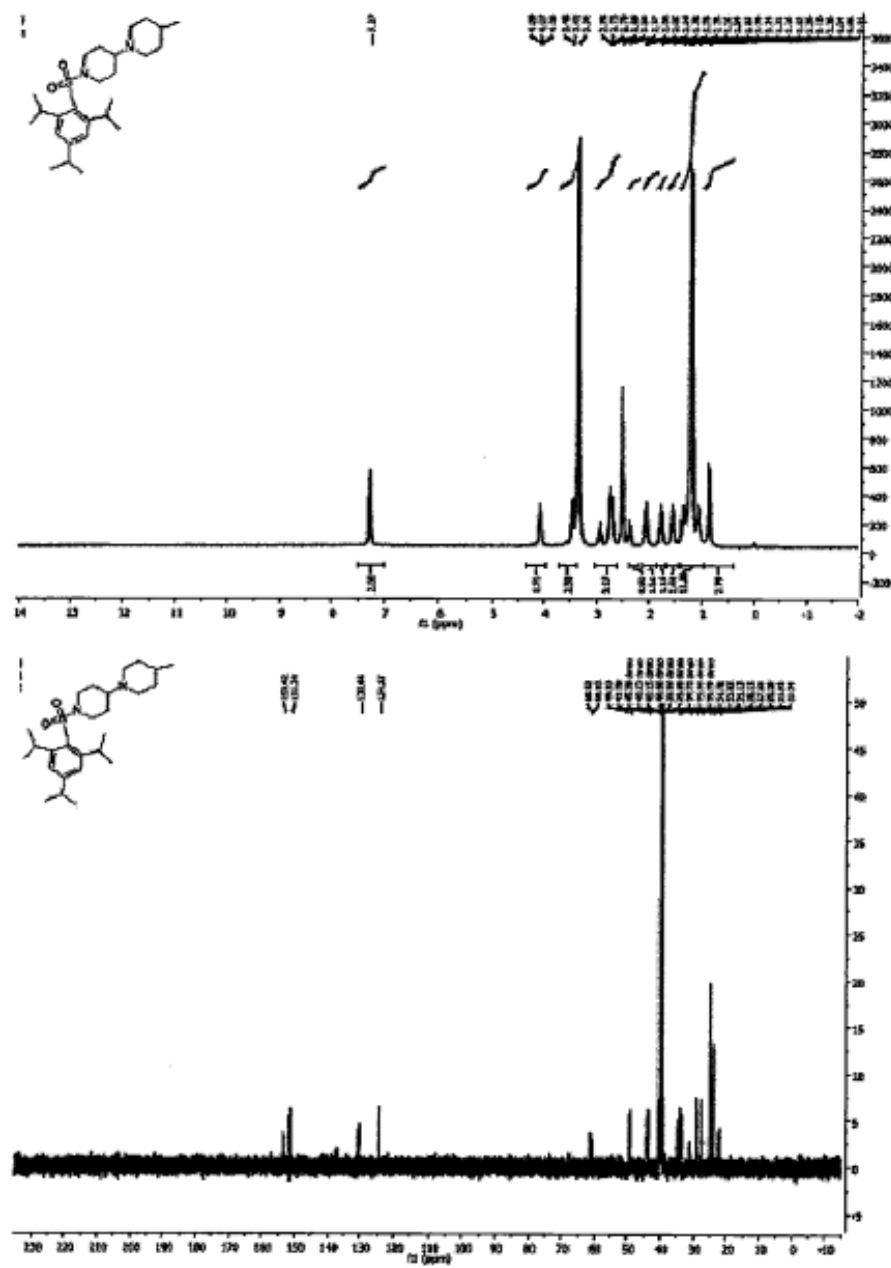


Figura 36(h)

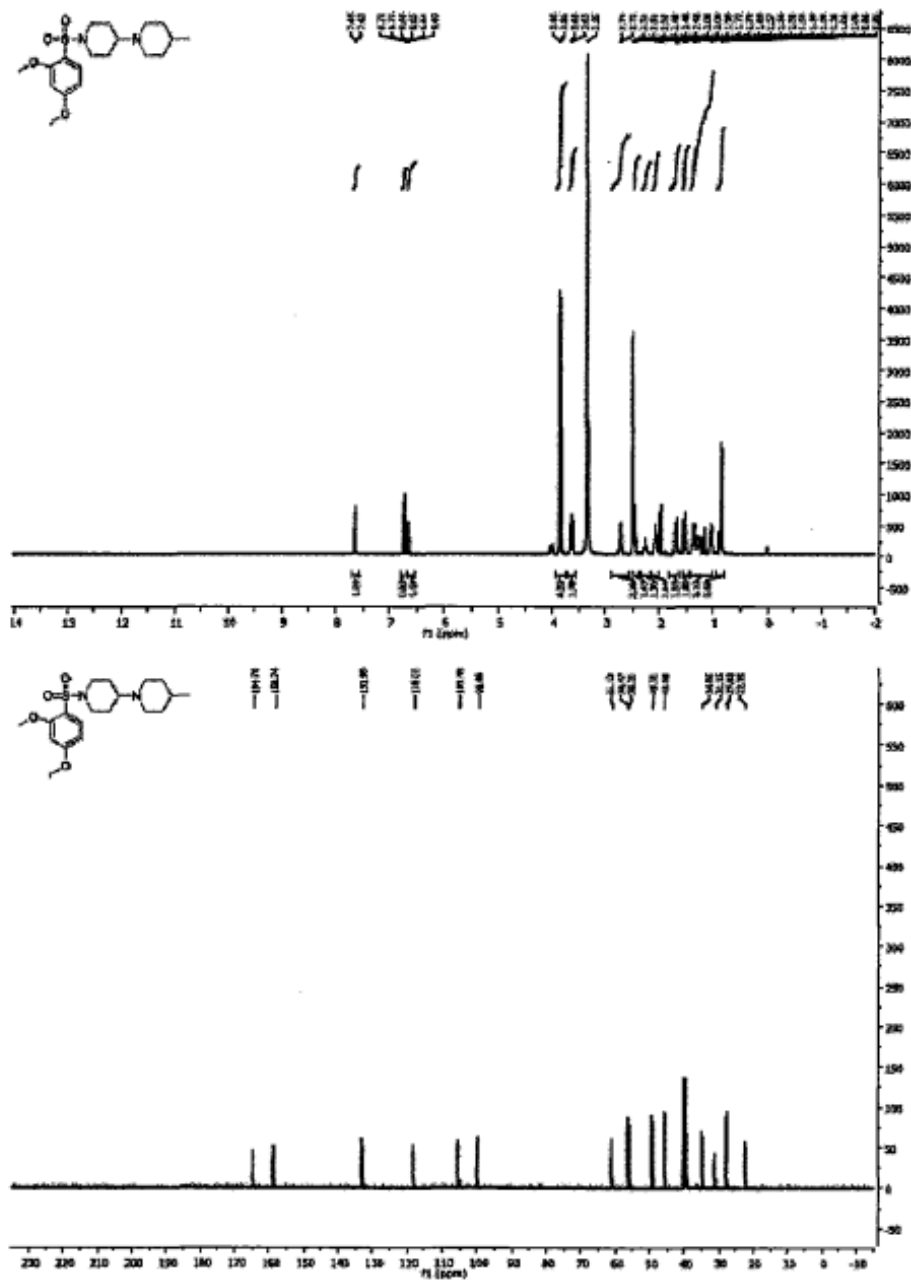


Figura 36(i)

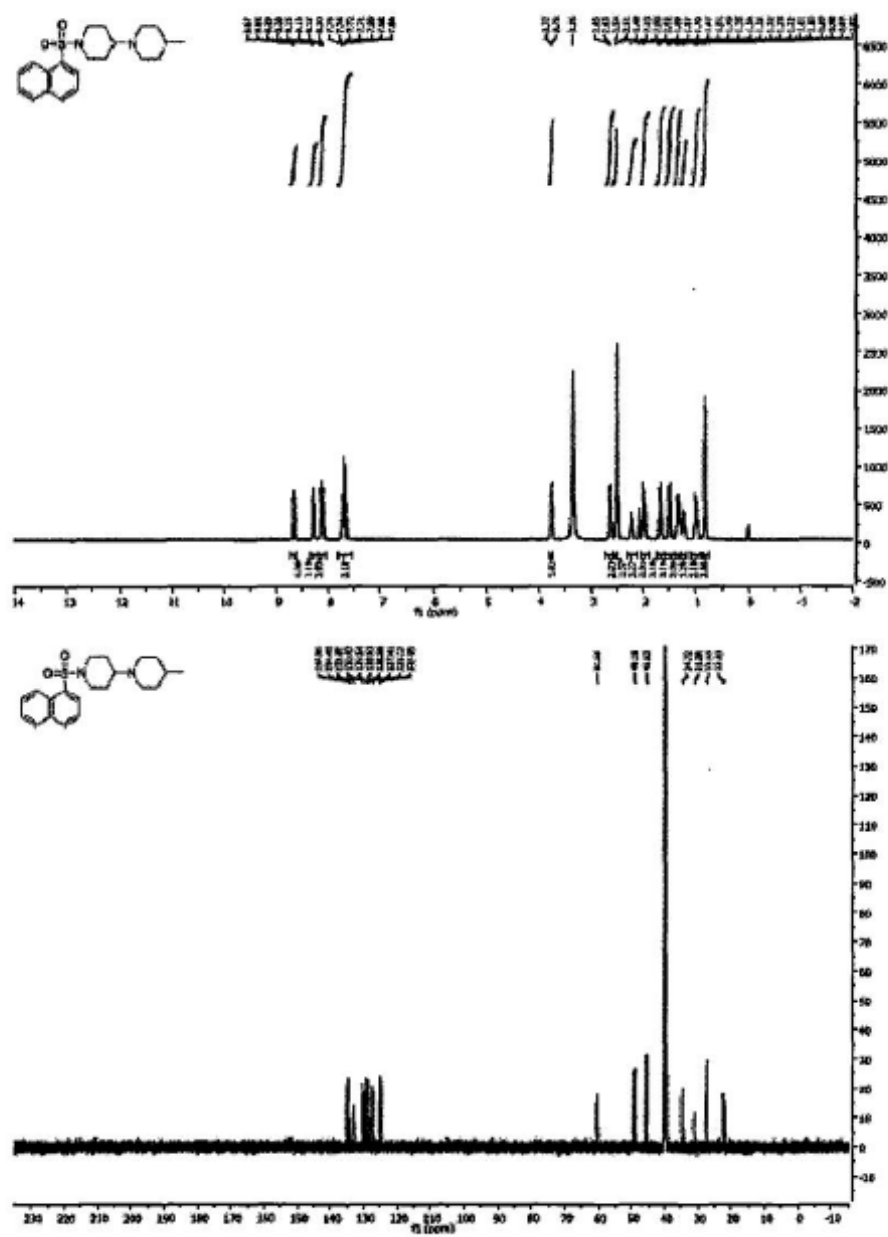


Figura 36(j)

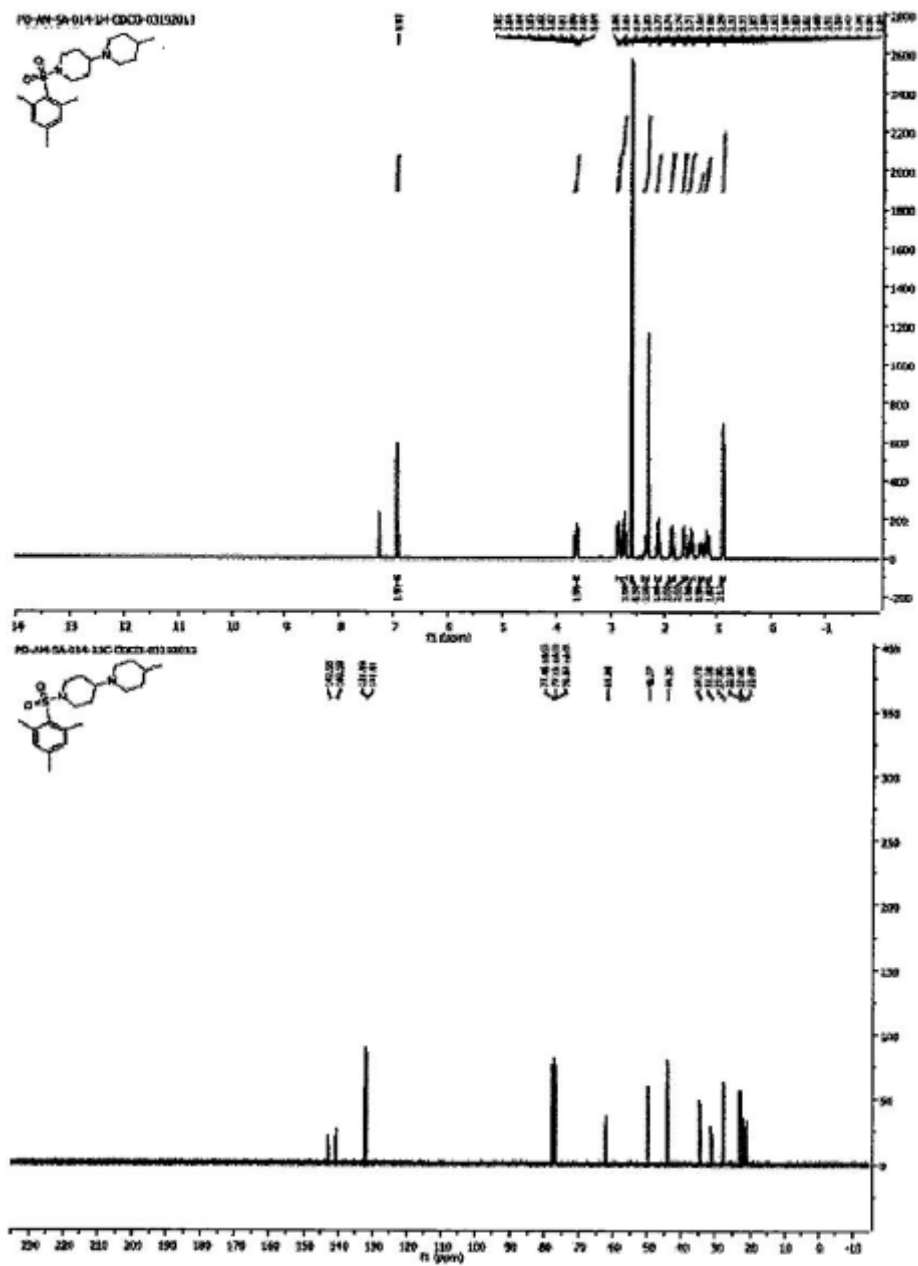


Figura 36(k)

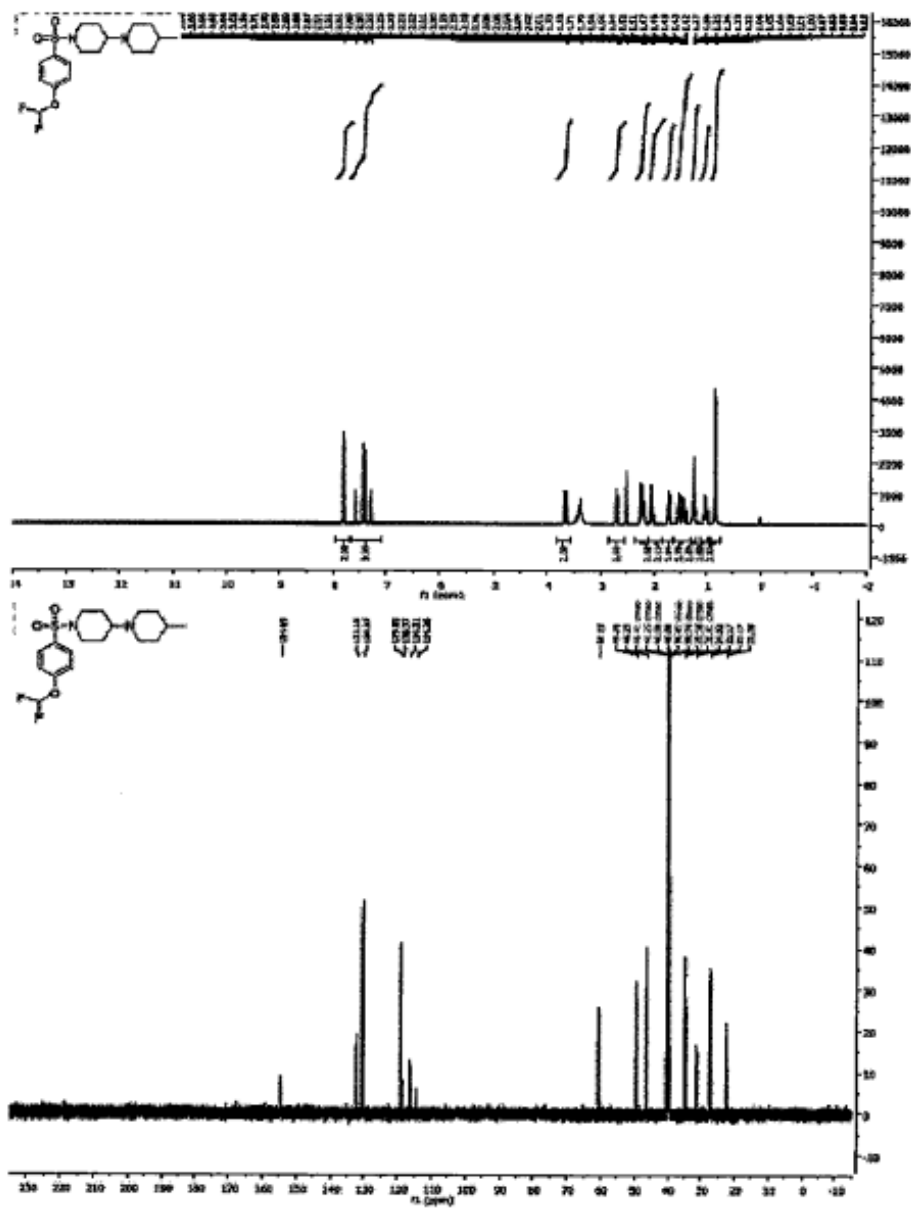


Figura 36(I)

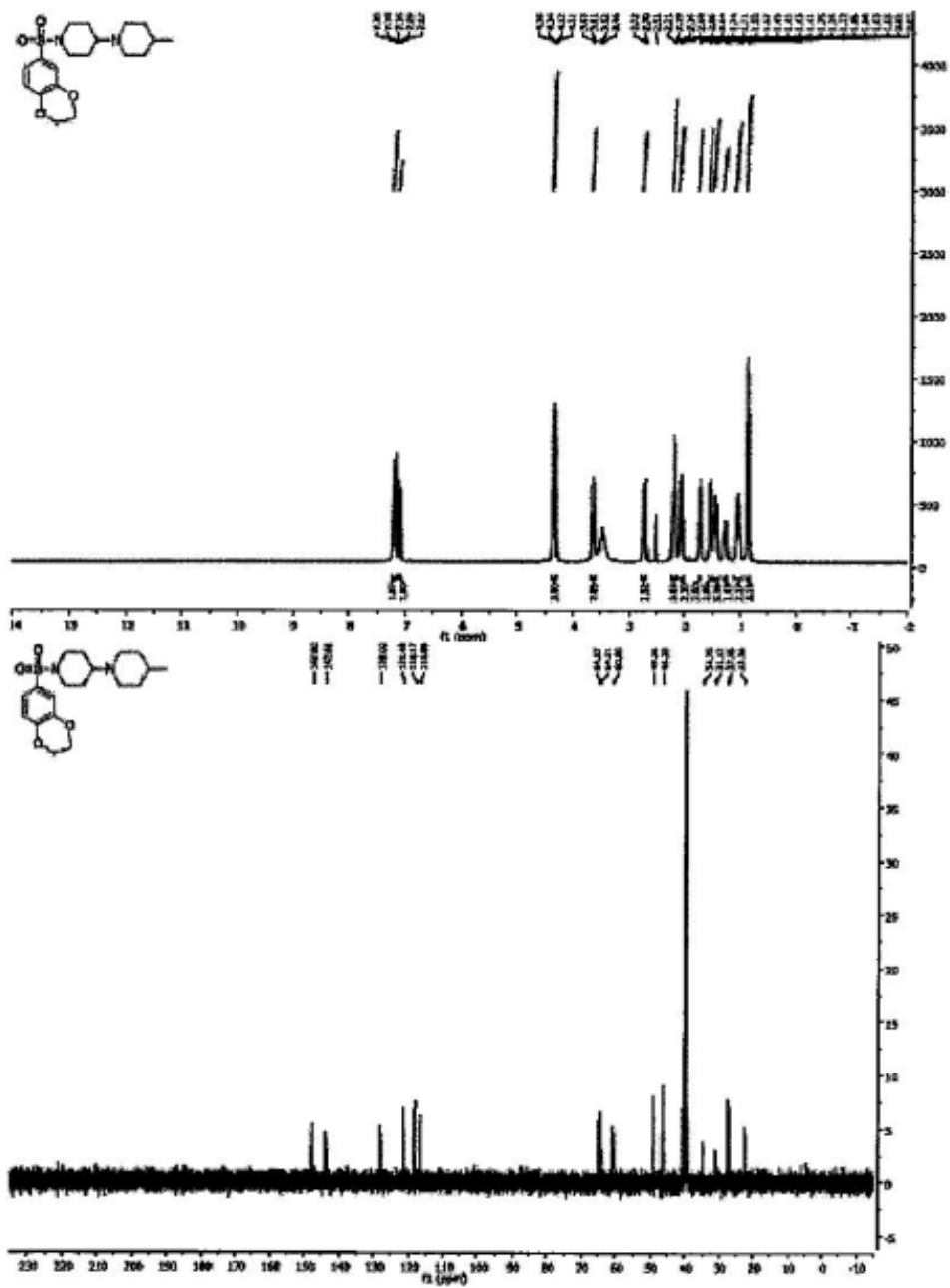


Figura 36(m)

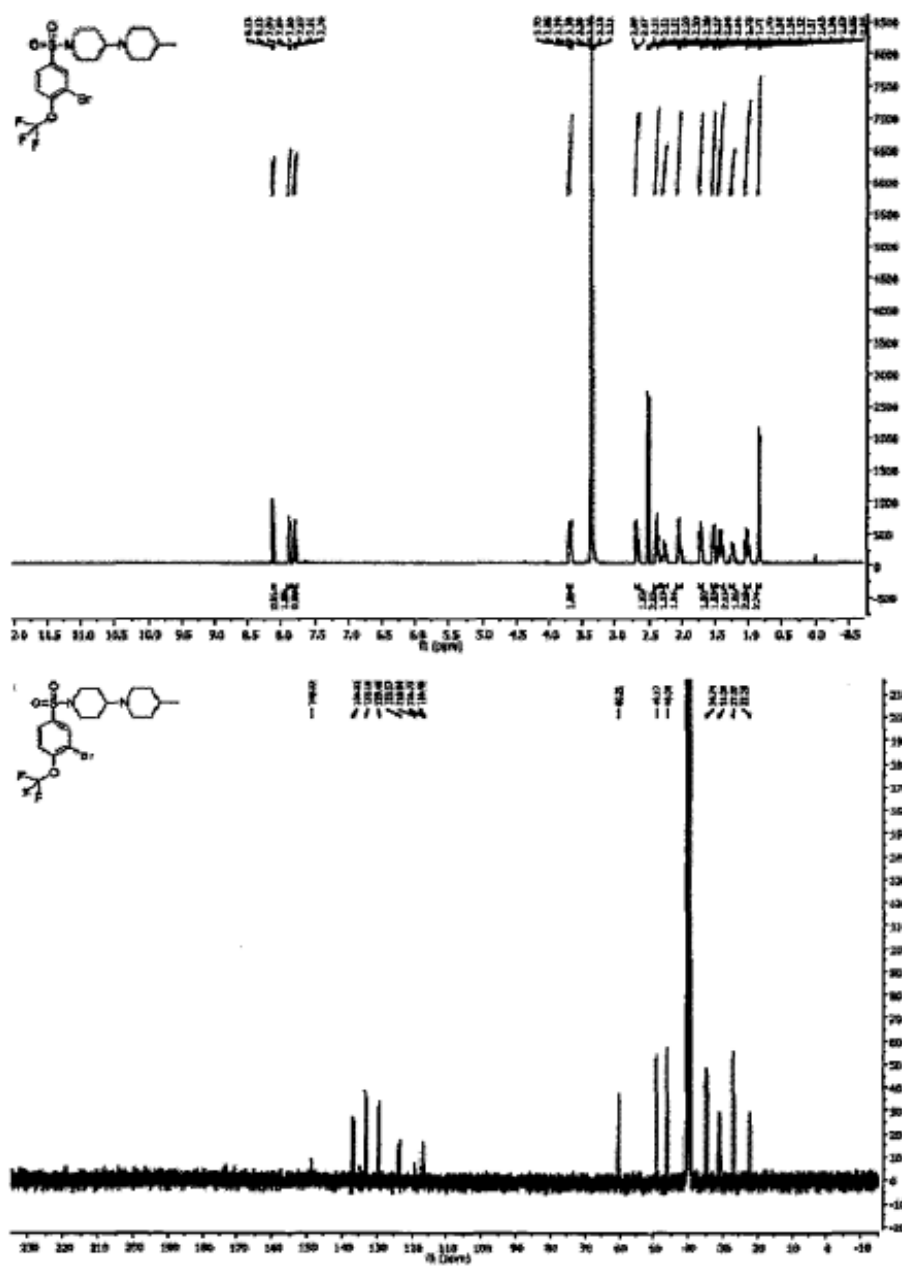


Figura 36(n)

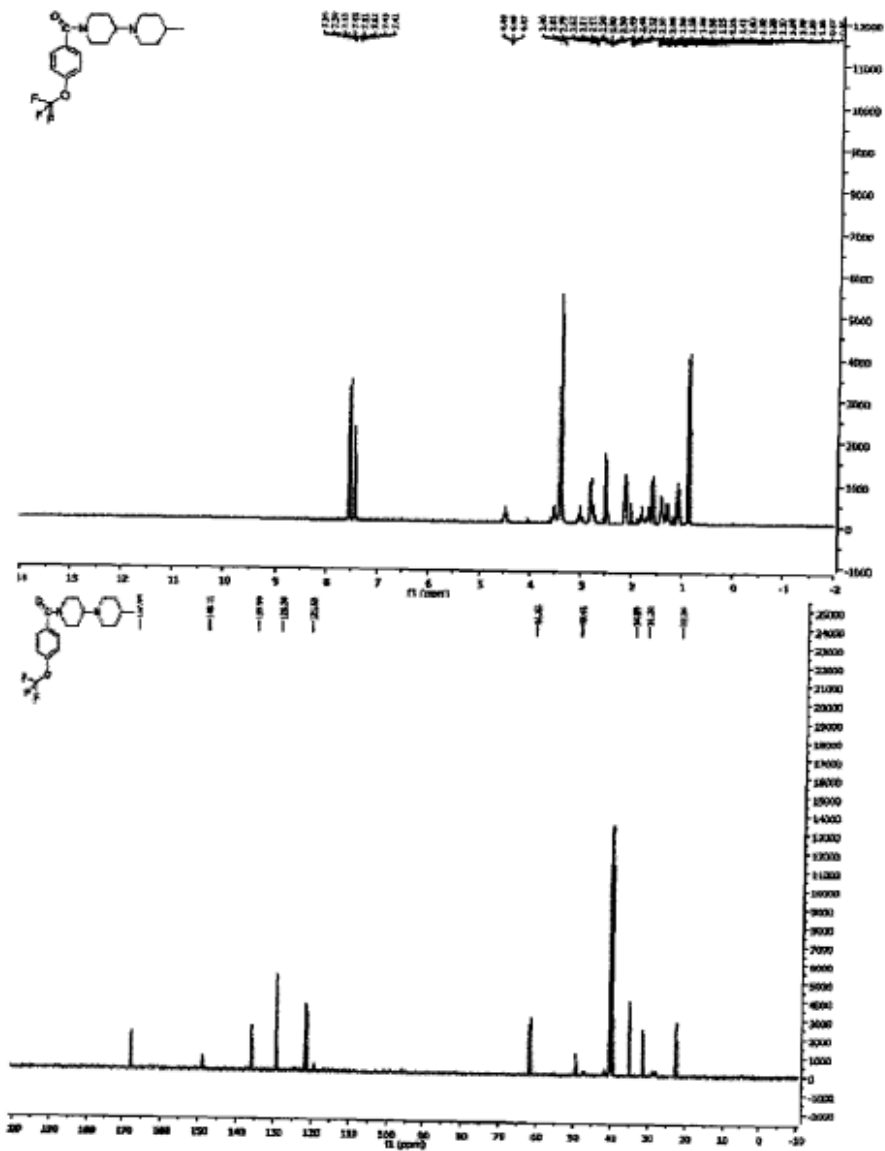


Figura 36(o)

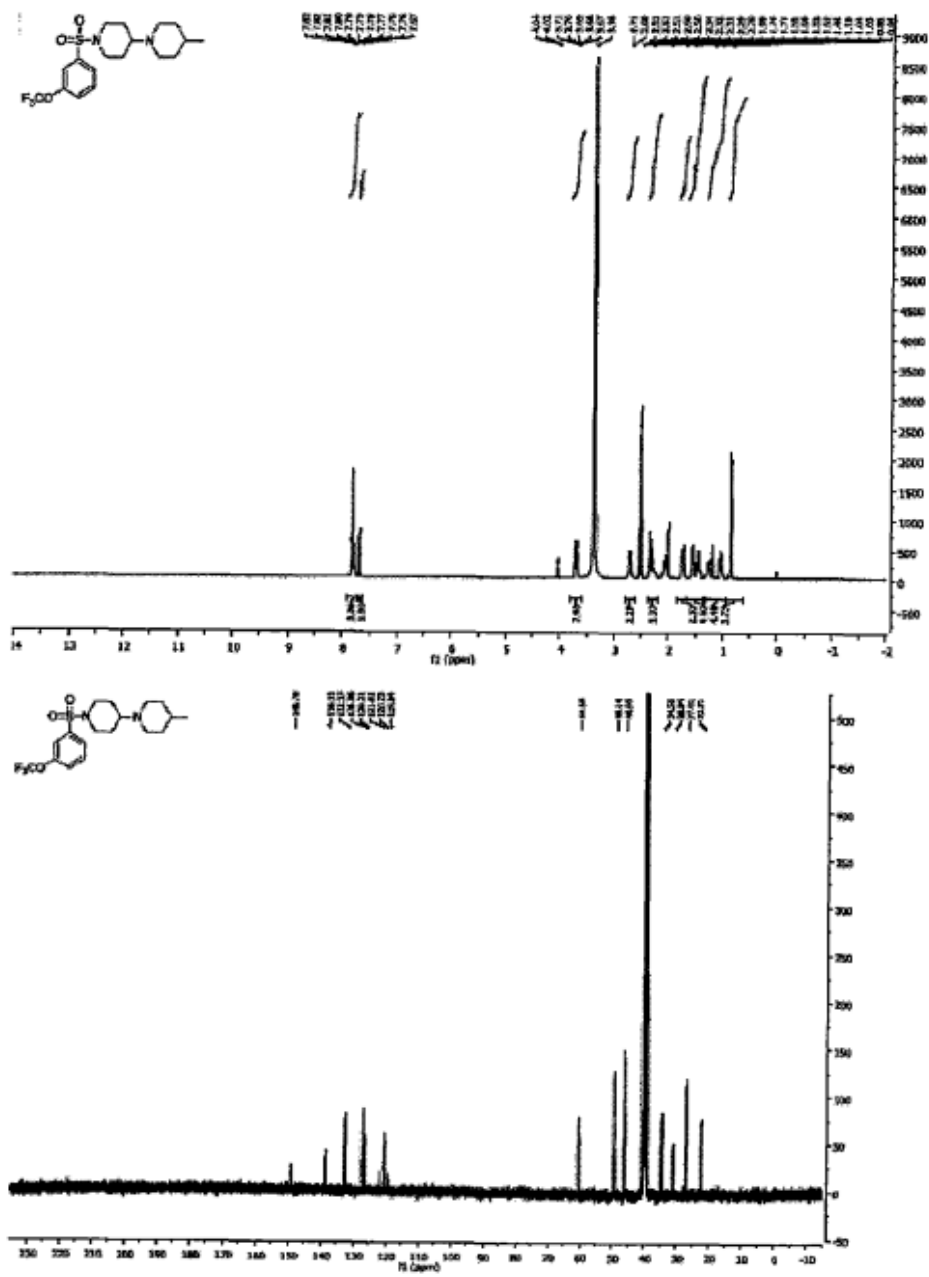
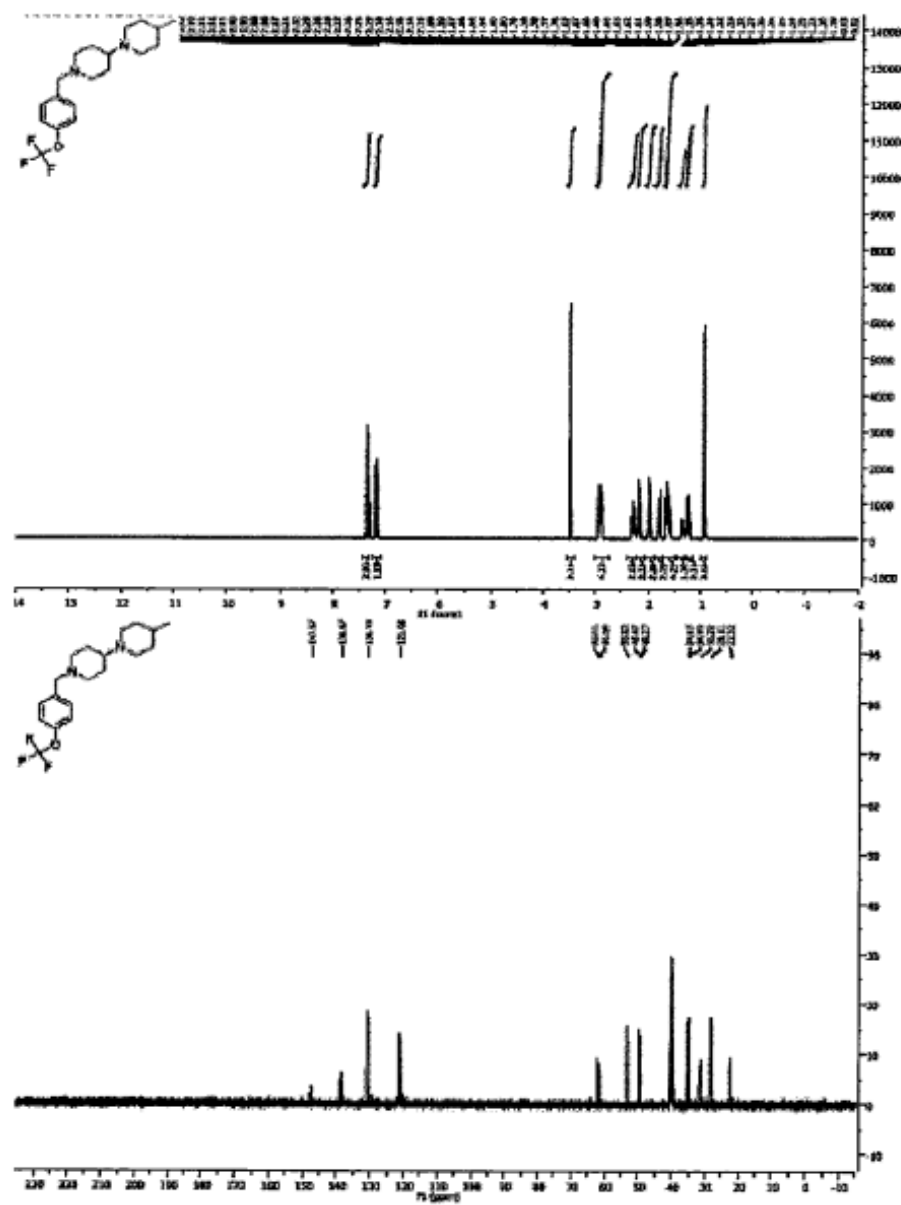


Figura 36(p)



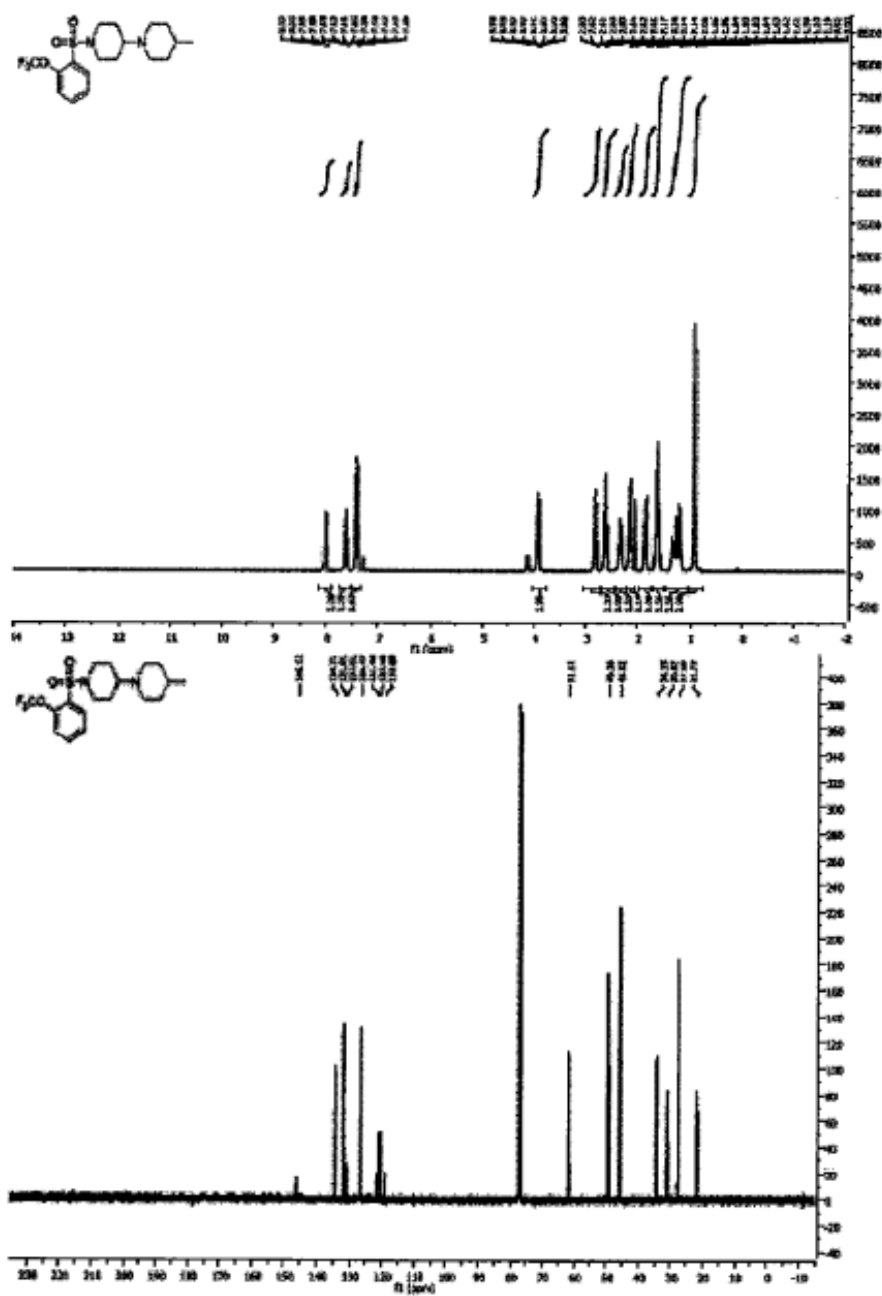


Figura 36(r)

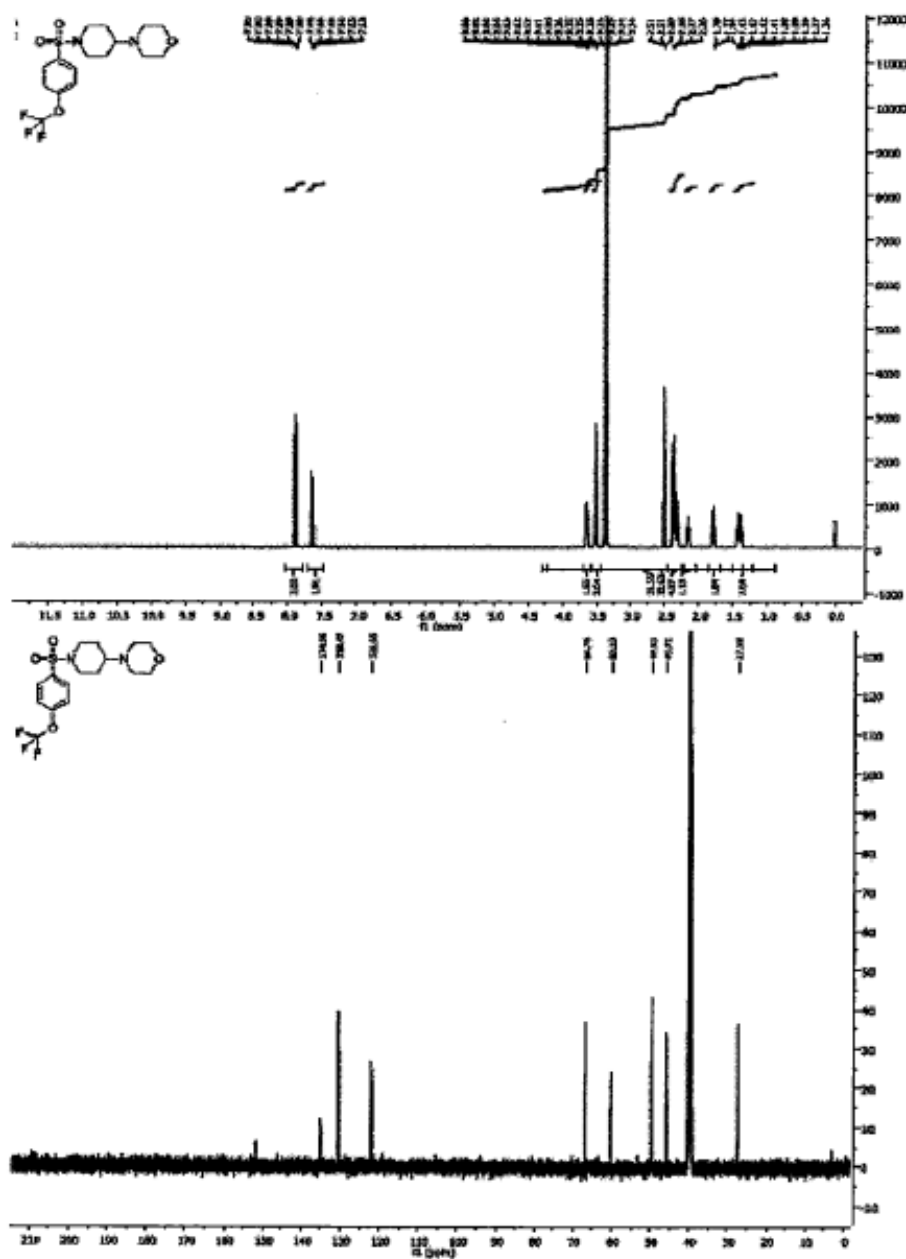


Figura 36(s)

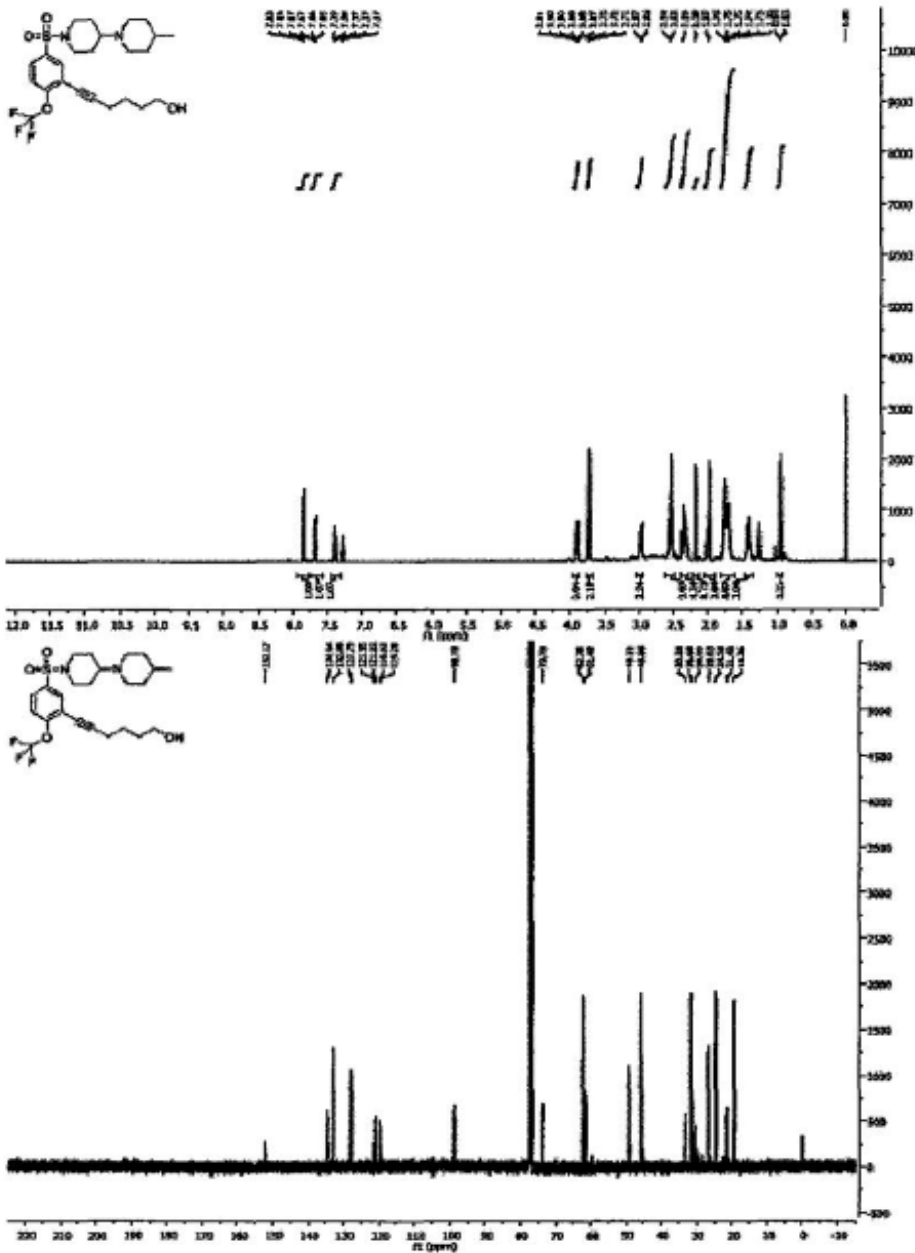


Figura 36(t)

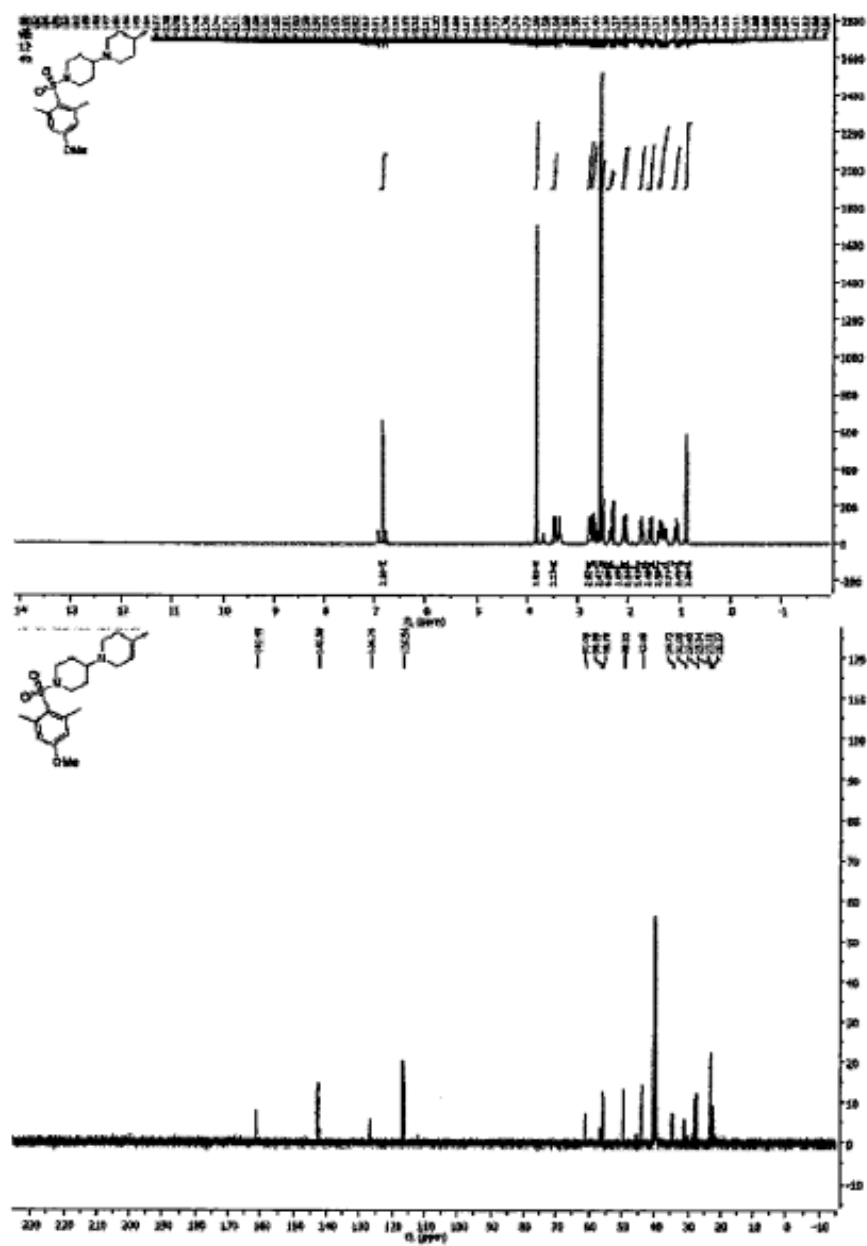


Figura 36(u)

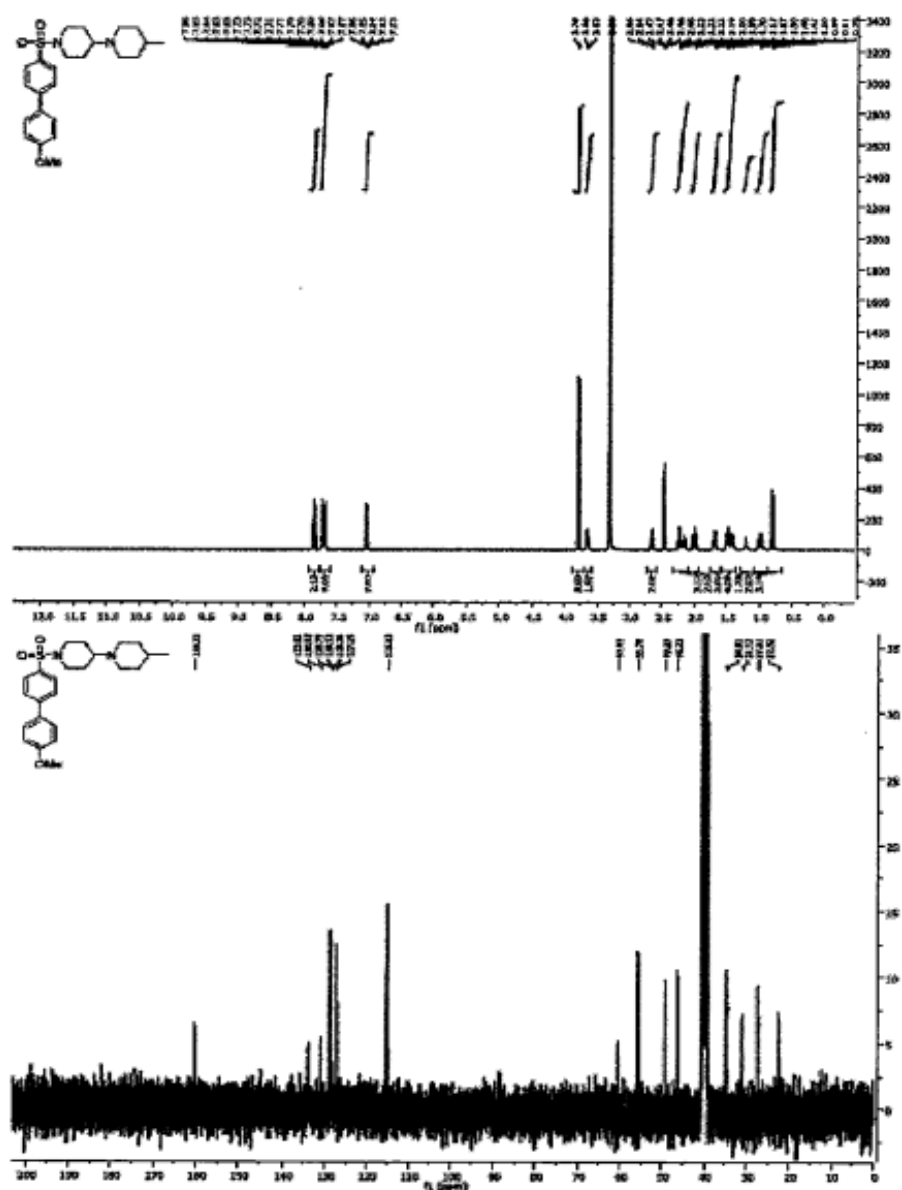


Figura 36(v)

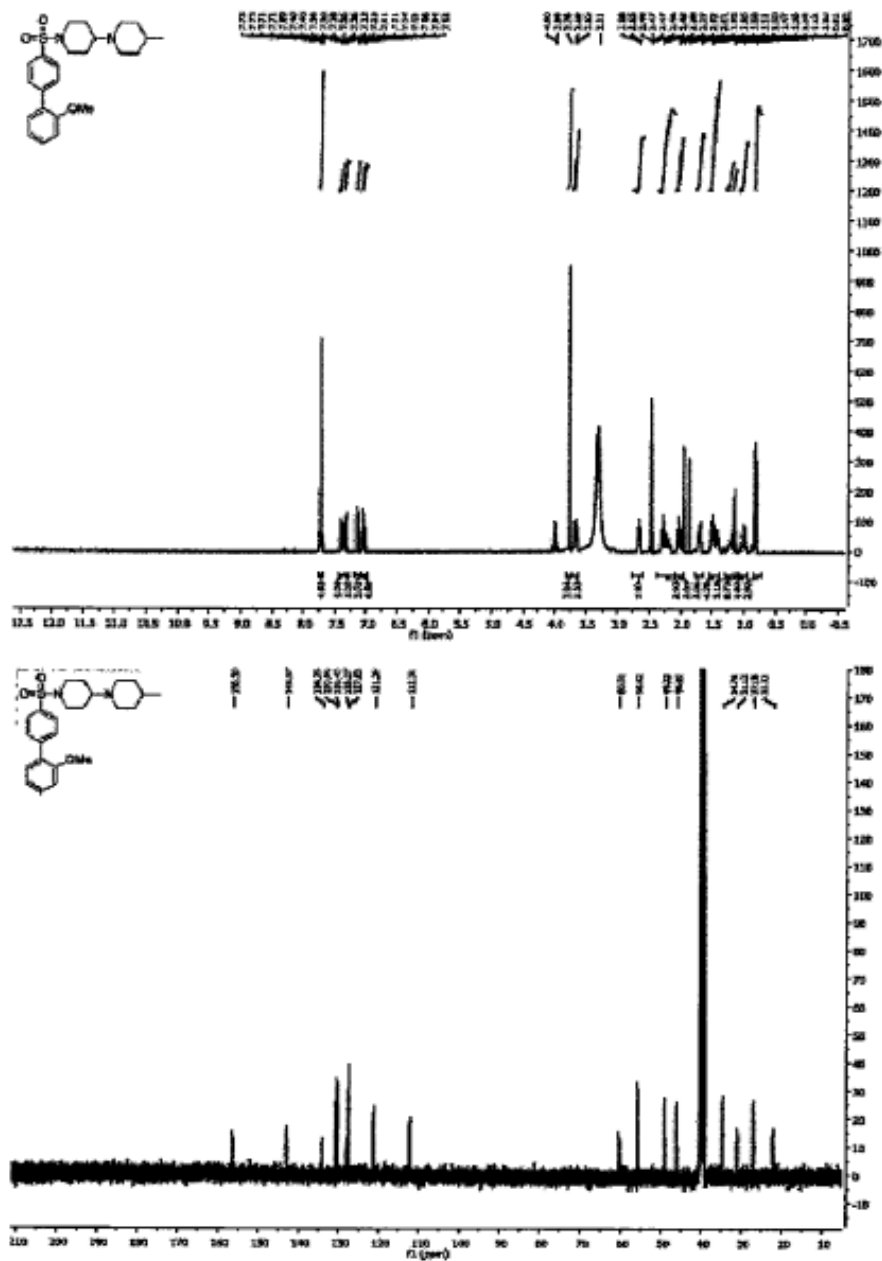


Figura 36(w)

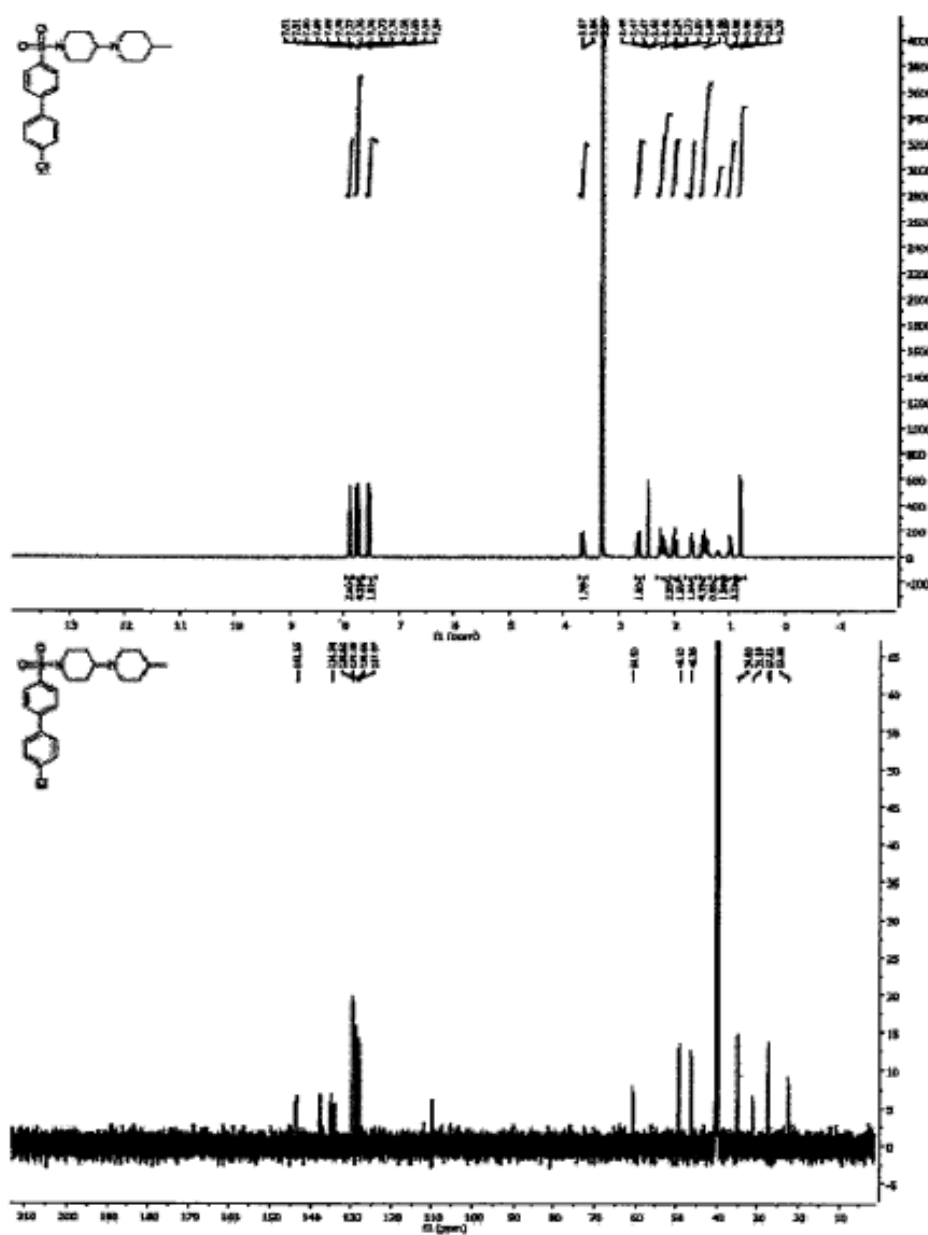


Figura 36(x)

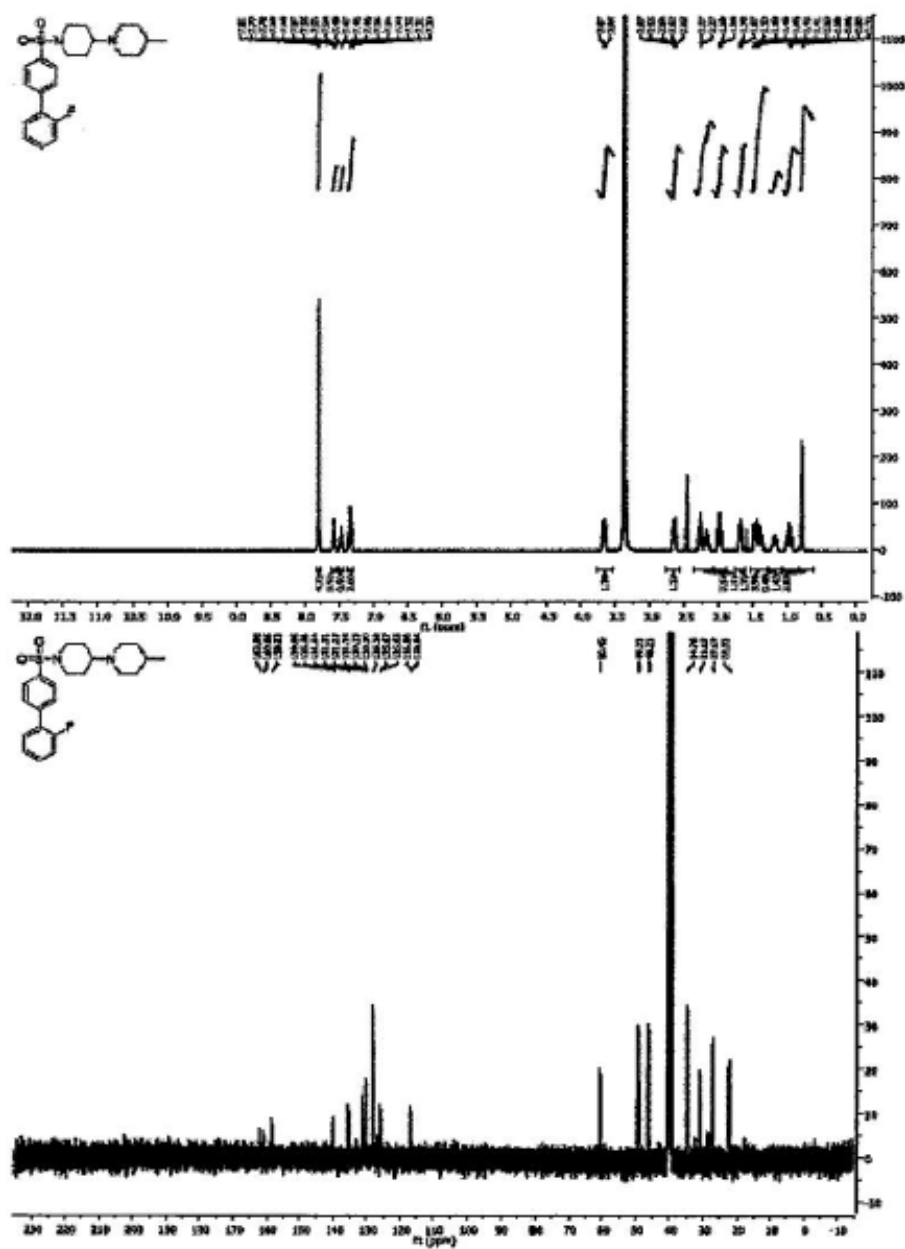
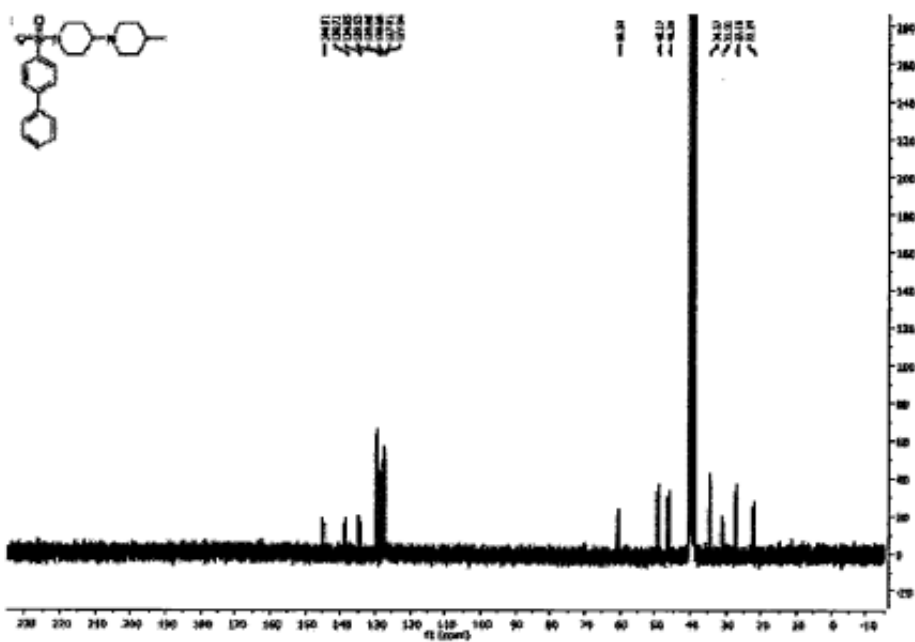


Figura 36(y)



170

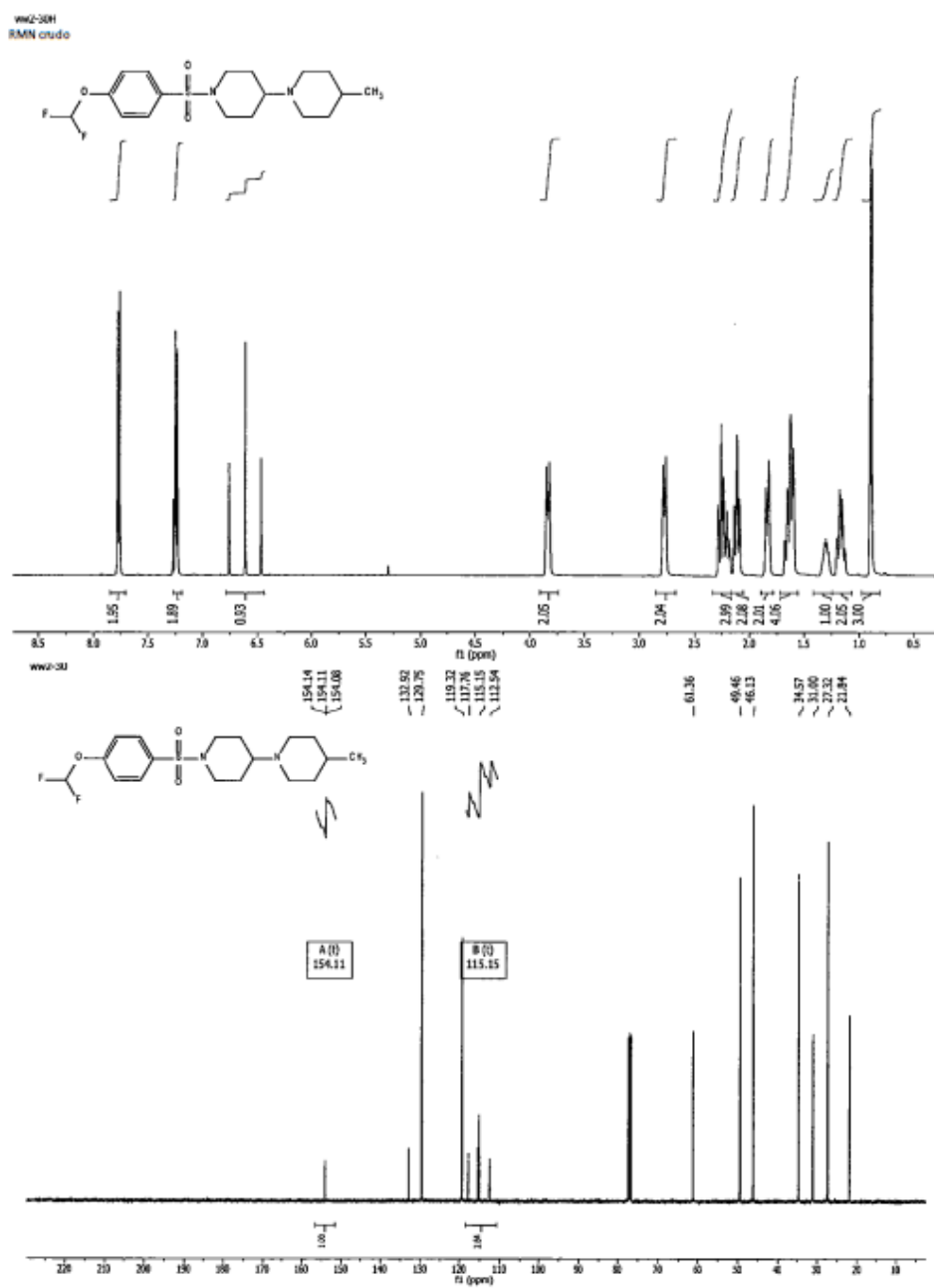


Figura 36 (aa)