



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 463**

51 Int. Cl.:
C07D 221/14 (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03718511 .3**
86 Fecha de presentación : **22.04.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1499595**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Sales de amonafide.**

30 Prioridad: **22.04.2002 US 128129**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Xanthus Pharmaceuticals, Inc.**
2020 University Street, Suite 2000
Montreal QC H3A 2A5, CA

72 Inventor/es: **Ajami, Alfred, M. y**
Barlow, David

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

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

Sales de amonafide.

5 Antecedentes de la invención

La tecnología tradicional del proceso farmacéutico para la manipulación de las propiedades físicas y la solubilidad en agua de estos importantes restos de fármacos anti-cancerígenos es volverlos solubles en agua con ácidos minerales fuertes. La formación de sal se reserva como el paso final en la síntesis, como esta descrito por *Brana y asociados* (Patente de EE.UU. 5.420.137; **1995**) más como un pensamiento con propósitos de formulación que como un componente estratégico esencial o incluso, de la síntesis de reacción. Tales sales de ácidos minerales divalentes y monovalentes conservan higroscopicidad, y las especies divalentes, que forman hidratos, han sido también encontradas incompatibles con muchas de los auxiliares farmacéuticos requeridos para la preparación de inyectables estériles, pastillas o cápsulas de gelatina.

En contraposición al estado anterior de la técnica y la práctica aceptada, hemos encontrado que la temprana incorporación de ácidos orgánicos en la elaboración sintética de amonafida y sus restos análogos de aminoalquilos, permiten un aislamiento más rápido y la purificación de intermediarios, altas concentraciones de reactivos durante el proceso de síntesis, y más propiedades deseables, como la densidad en granel, floculencia y compresibilidad.

Además, las sales orgánicas resultantes indican mayor solubilidad en agua, así como en soluciones de electrolitos balanceados osmóticamente, las que de lo contrario serían incompatibles por vía efectos ión común con sales de ácidos minerales inorgánicos, como los hidroclouros y los metilsulfonatos que se usan en lo adelante rutinariamente. Aún más, las sales de ácidos orgánicos de la presente invención conservan un alto grado de compatibilidad tanto con disolventes próticos y apróticos de polaridad diferente, proporcionando por tanto un rango amplio de condiciones de cristalización para a los propósitos de purificación y aislamiento que proporcionarían las sales del ácido mineral correspondiente.

El análisis de la química del proceso para amonafida ilustra fácilmente la deficiencia del estado anterior de la técnica y las propiedades adversas de las sales minerales resultantes que son evitadas con la presente invención. Entre las aproximaciones sintéticas descritas en la patente y la literatura profesional, el denominador común es la acilación de 1-amino-2,2-N,N-dimetilamino etileno diamina o sus homólogos sustituido similarmente con un anhídrido aril sustituido policíclico como se muestra la figura 1. Por lo tanto, para amonafida, de acuerdo con el método de *Brana y Sanz* (*Eur. J. Med. Chem* **16**: 207, **1981**) los compuestos I y II en la figura 1 se combina con etanol para proporcionar un precipitado de mitonafida, que tiene que recrystalizarse varias veces en un volumen más grande de etanol para liberarse de los subproductos negros semejantes al alquitrán, o marrones.

Mientras la acilación puede se conducir a una concentración de 1 gramo de precursor anhídrido en 25 ml de solvente, la recrystalización de mitonafida requiere tres recrystalizaciones a una concentración de 1 g en 75 ml para proporcionar un material de color crema ligero, libre de las sustancias alquitranadas y presentando una ablandamiento continuo. Aunque los rendimientos iniciales según este proceso fluctúa dentro del 60-80 por ciento, la purificación siguiente reduce el rendimiento neto al 30% del material con la pureza suficiente para la conversión subsiguiente en un producto final farmacéuticamente aceptable.

Estas condiciones de aislamiento y purificación también son aplicable a la síntesis de los análogos de mitonafida en tolueno, seguidas de la precipitación con un exceso del ácido hidroclorehídrico gaseoso, como lo descrito por *Zee-Cheng y Cheng* (Patente EE.UU. 4.665.071.; **1987**). El hidrocloreuro de mitonafida, de estequiometría e hidratación no especificada, obtenido por esta reacción, es un precipitado marrón rojizo que contiene 12% en peso del alquitrán sin solubilidad diferencial entre el agua y el alcohol, requiere de nuevo de recrystalizaciones múltiples para lograr un material de sal hidrocloreuro de calidad apropiada para el uso farmacéutico.

En la presente invención, como muestra la Figura 1, el aislamiento del resto de mitonafida (III) de la mezcla de reacción etanólica se facilita por mezcla y disolución completa de un compuesto de ácido de carboxílico orgánico apropiado, que por enfriamiento proporciona un complejo de inclusión incoloro próximo a la cristalización desde un licor madre que retiene impurezas coloreadas las que pueden por otra parte cocrystalizar como en el caso de la técnica anterior. En contraste con el enfoque de síntesis de *Brana y asociados* (*Eur. J. Med. Chem* **16**: 207, **1981**; Patente EEUU 4.204.063; **1980**), descrito más adelante, la mitonafida es obtenida directamente como una sal orgánica, en el primer paso de la síntesis para el objetivo compuesto de amonafida, mucho más que después acuerdo con enseñanzas alternativas como en la Patente EE UU 5,420,13: **1995**) relacionadas con las sales de monometilsulfato o monoclorhidrato de amonafida obtenidas por la valoración controlada de amonafida misma al final de la secuencia de reacción.

Los expertos en la técnica también reconocerán que la formación de sal de mitonafida como un paso de aislamiento como enseñó la patente de los EE.UU. 4.665.071 (**1987**) no puede ser interpretados como un precedente obvio para la invención inmediata en la medida en que ácidos orgánicos, que son los reactivos formadores de sales en esta invención son conocidos como insolubles en tolueno, y en disolventes similares no polares, incluso a reflujo. A diferencia del HCl gaseoso usado de acuerdo con la técnica anterior sobre el aislamiento de la sal de mitonafida, los ácidos orgánicos de esta invención son sólidos que pueden ser medidos con exactitud para conseguir una valoración estequiométrica precisa, un objetivo fugaz cuando la administración de ácidos gaseosos es propuesta como alternativa predominante.

La novedad de la invención descrita en la presente solicitud, cuando se compara con la técnica anterior, se ratifica por la conclusión inesperada con respecto a la hidrogenólisis catalítica de los sustituyentes nitro en el esqueleto estructural de mitonafida.

5 En la técnica anterior sobre la formación de sales de amonafida, lo cogenérico con la estructura IV en la Figura 1, *Brana y asociados* Patente EE UU 5,420,137; **1995**) falla al describir las propiedades del precursor de mitonafida, ni describen el método de hidrogenación para la base libre de la monafida resultante. Sin embargo, en revelaciones previas (Patente Española 533,542; **1983**) sobre un método para la producción industrial específicamente de amonafida, estos mismos autores demuestran que la nitroreducción de la base libre precursora de mitonafida es provocada con paladio al
10 10% sobre carbón (Pd/C) vía hidrogenación por transferencia en presencia de un exceso de hidracina bajo condiciones de etanol a reflujo. Este procedimiento también es resumido como el enfoque preferido en la revisión de literatura química por los mismos autores (*Ars Farmaceutica* **36**: 377-415, **1995**).

15 Los expertos en la técnica reconocen que estos enfoques no pueden ser practicados si el precursor de mitonafida estuviese compuesto de una sal ácida preformada. Bajo estas circunstancias, uno podría razonablemente esperar que el reactivo donante de hidracina sea neutralizado por intercambio iónico y no esté disponible como sustrato para la formación de diimida, que es la especie reductora activa catalizada por Pd/C. En efecto, cualquiera de los seguidores de las enseñanzas de *Brana y asociados* podrían considerar solamente el uso de precursores de base libre mucho más que recurrir a la opción menos obvia, concretamente la reducción directa de una sal de mitonafida como enseña esta
20 patente.

Dentro del alcance más grande de las transformaciones de grupos funcionales orgánicos, los expertos reconocen que la hidrogenación catalítica de compuestos aril nitro de las correspondientes anilinas sustituidas usualmente se realizan en etanol, mezclas de etanol y agua, o en los llamados solventes universales (por ejemplo, dimetilformamida y dimetilacetamida) las cuales son resistentes a la hidrogenación. Monografías respetadas y clásicas sobre el tema por P.N. Rylander (*Catalytic Hydrogenation in Organic Synthesis*, New York: Academic Press, **1979**) and M. Freifelder (*Practical Catalytic Hydrogenation*, New York: Wiley, **1971**) reconocen que la solubilidad de compuestos aril nitro en general impiden el uso del agua como medio de hidrogenación.

30 Estos expertos también indican que la fuente preferida de protones para provocar la supresión de la imina y la oxima por subproductos de hidrogenación incompleta es conseguida por mezcla del sustrato con ácido clorhídrico. Incluso en presencia de ácidos minerales, la hidrogenación está pobremente documentada y considerada idiosincrásico en ambos, tanto el laboratorio de hidrogenación tradicional como el actual, y en la práctica industrial. El uso de ácidos orgánicos, como ácido acético o ácido fórmico, ha sido descrito, pero con la advertencia de que la acilación dehidrativa ocurrirá,
35 proporcionando tanto las correspondientes N-acil-aril aminas como contaminantes que provocan la disminución de los rendimientos.

Por lo tanto, en el contexto de esta invención, ni la literatura específica sobre la síntesis de amonafida ni tampoco los métodos de hidrogenación pueden ser citados como el precedente a unas manipulaciones químicas no obvias que
40 resultan ser ventajosas en la presente solicitud. Primero, el uso de compuestos ácidos carboxílicos orgánicos para provocar la purificación y aislamiento de mitonafida y sus análogos no ha sido descrito hasta ahora. Segundo, la puesta en práctica de sales ácidas carboxílicas orgánicas de mitonafida y sus análogos como precursores directos para la hidrogenación catalítica no tiene que ser considerado o revelado como una práctica eficaz. En tercer lugar, el alto grado de solubilidad en agua de estas sales orgánicas, es en sí un fenómeno inesperado, unido a la renuencia entre
45 los expertos de recomendar la hidrogenación catalítica en agua como el disolvente único, podrían haber impedido la exploración del nuevo enfoque que se presenta en la presente solicitud.

Más allá de estos hechos que demuestran la no evidencia, existen ventajas prácticas adicionales al uso de compuestos ácidos carboxílicos orgánicos, y especialmente sus análogos preferidos, los compuestos diácidos carboxílicos orgánicos, en el contexto de esta invención. Las sales aralquilo-naftalimidadas resultantes indican solubilidades en agua tan altas como 1:1 por mezcla proporcional, en contraste con las sales mono o divalentes de clorhídrico, metan-sulfónico u otro ácido mineral, cuyas solubilidades caen por debajo del 10% en peso. El procesamiento en grandes cantidades es facilitado a propósito de la síntesis industrial, filtración, purificación, y el suministro de unidades de dosis previas a la filtración estéril y liofilización.

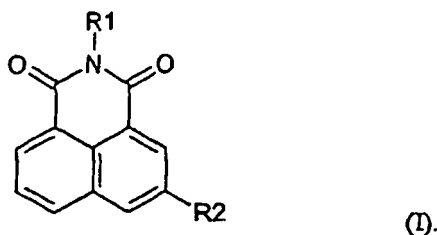
55 En forma seca, estas sales orgánicas de ácidos carboxílicos indican densidades bulto, porosidad y compactación más altas que las sales análogas de ácidos minerales mientras presentan una higroscopicidad más baja. Por lo tanto, son más apropiadas para el procesado a compresión directa, que la separación por granulación o aglomeración.

60 En relación con la carga biológica, los aniones carboxilatos orgánicos no presentan carga de electrolito, a diferencia de los aniones de ácidos minerales, y son biodegradables por las vías normales del metabolismo celular intermediario. En cualquiera de los casos de aniones de ácidos inorgánicos u orgánicos, son en materia de registro que estas especies suministran el balance de carga, propiedades de solubilidad, mecánicas, adsorptivas o absorptivas a la parte del fármaco a la que están enlazadas. Sin embargo, se conoce por la práctica química y farmacéutica que la sal que se forma no afectará la actividad farmacológica, la que en el caso de fármacos que contienen intercaladores aril-policíclicos y aralquilamina es su acción antitumoral.

Por ejemplo, al examinar la farmacopea existente, el intercalador de fármaco ametantrona es conocido por ser igualmente activo como la base libre clorhídrica, de monoacetato y diacetato, a diferencia de la sal que se forma siendo sus propiedades de formulación de mayor tamaño. Su análogo, NSC-639366, por otro lado se está desarrollando preclínicamente y como la sal fumarato, a preferencia clorhídrica o de acetato. En el caso de asulacrina, la sal que se forma preferente es la iseciónato. Para crisnatol y exatecan, es el mesilato que es farmacéuticamente más apropiado. Muchas otras clases de fármacos, con modos de acción diversos, han sido desarrolladas como sales de ácidos orgánicos. Por ejemplo, el L-malato, sales de cleboprida, un tratamiento antinaúsea, de almotriptan, un tratamiento antimigraña, y ofpizotifen, un antihistamínico, han presentado solubilidad mejorada sin alteración de sus propiedades medicinales respectivas.

Resumen de la invención

Una realización de la presente invención es un compuesto representado por la fórmula estructural (I):



R_1 es $-(CH_2)_nN + HR_3R_4 X$, siempre que R_1 pueda también ser $-(CH_2)_nNR_3R_4$ cuando R_2 es $-N + HR_6R_7$.

R_2 es OR_5 , halógeno, $-NR_6R_7$, $-N + HR_6R_7$, ácido sulfónico, nitro, $-NR_5COOR_5$, NR_5COR_5 ó $-OCOR_5$.

R_3 y R_4 son por separado H, o un grupo alquilo C1-C4, ó tomados junto al átomo de nitrógeno al que están enlazados, un grupo heterocíclico no aromático que contiene nitrógeno.

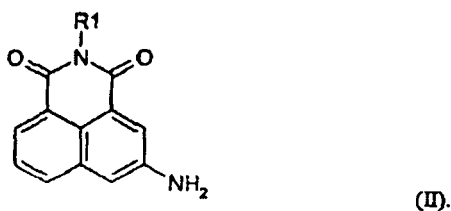
Cada R_5 es por separado H o C1-C4 grupo alquil.

R_6 y R_7 es por separado H, ó un grupo alquilo C1-C4, unido al átomo de nitrógeno los que están enlazados a grupos heterocíclicos que contiene nitrógeno no aromático.

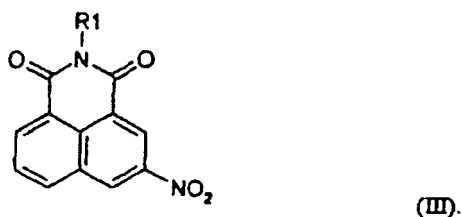
n es un número entero de 0-3.

X^- es el anión carboxilato de un compuesto de ácido carboxílico orgánico. Ejemplos de ácido orgánicos carboxílicos disponibles se muestran más adelante.

Otra realización de la presente invención es un método de preparación de un compuesto representado por la fórmula estructural (II):



El compuesto del producto se prepara por hidrogenación en agua de un compuesto inicial representado por la fórmula estructural (III):



R1 en las fórmulas estructural (II) y (III) es $-(CH_2)_nN^+HR_3R_4X^-$ y n, R3, R4 y X^- como se describen en la fórmula estructural (I). La Hidrogenación puede ser llevada a cabo sin mezcla de disolventes alcohólicos, ácidos minerales, ácidos orgánicos e hidracina.

Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable o diluyente y un compuesto de la presente invención.

Otra realización de la presente invención es el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento en sujetos con cáncer.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema que muestra la síntesis de una sal de malato de amonafida por el método descrito en la presente solicitud. Muchas de las sales de ácidos carboxílicos orgánicos de estructura esquelética de amonafida pueden prepararse por este método.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el porcentaje de crecimiento de célula neto de la célula con cáncer desde la línea de célula H460 (◆), SF268 (■) y MCF7 (▲) en presencia de concentraciones variables de malato de amonafida las que se dan en μM .

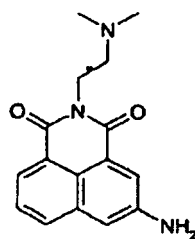
La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento por malato de amonafida de MCF-7, COLO205 y tumores PC3 en ratones. El malato de amonafida se administra intraperitonealmente (IP) o subcutáneamente (SC).

Descripción detallada de la invención

La presente invención esta dirigida a sales de ácidos carboxílicos orgánicos de amonafida y sus derivados y precursores representados por la fórmula estructural (I). Preferentemente en (I) n es 2; R3 y R4 puede ser lo mismo H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_3$; y R2 es NO_2 , $-NH_2$ o $-NH_3^+X^-$. Valores disponibles para X^- son presentados más adelante.

La presente invención es también dirigida a métodos de preparación de sales de ácidos carboxílicos orgánicos de amonafida y sus derivados representados por la fórmula estructural (II) hidrogenando compuestos representados por la fórmula estructural (III) en agua. Preferentemente en la fórmula estructural (II) y (III), n es 2; R3 y R4 puede ser lo mismo H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_3$; Con preferencia n es 2; R3 y R4, $-CH_3$. Valores disponibles para X^- son presentados más adelante.

Con preferencia la presente invención es también dirigida a sales ácidos carboxílicos orgánicos de amonafida y métodos de preparación de los mismos. La estructura de amonafida se representa por la fórmula estructural (IV).



(IV).

Los compuestos dan a conocer dos grupos amino incluyendo las sales de amonafida que pueden ser monovalentes, lo que significa que uno de los grupos amino se protona o divalente cuando los dos grupos aminos se protonan. Un compuesto divalente se puede protonar por dos compuestos de ácido monocarboxílicos diferentes (Por ejemplo: Dos Xs en la fórmula estructural (I) representan 2 compuestos de ácido monocarboxílicos diferentes), por dos equivalentes molar del compuesto ácido, (por ejemplo: Las dos Xs en la fórmula estructural (I) cada una representa el equivalente molar del mismo compuesto de ácido monocarboxílico, o por un equivalente molar de ácido dicarboxílico (Por ejemplo: Las dos Xs en la fórmula estructural (I) representa un compuesto de ácido dicarboxílico. Alternativamente tres equivalentes molar de un compuesto divalente se protona por dos equivalentes molar de un compuesto de ácido tricarboxílico. Todas estas posibilidades se incluyen dentro de las fórmulas estructurales (I) y (IV) anteriores.

Un compuesto ácido carboxílico orgánico es un compuesto orgánico que tiene uno ó más átomos de carbono y un grupo funcional de un ácido carboxílico. Los compuestos de ácido carboxílicos orgánicos disponibles para preparar los compuestos de la presente invención son solubles en agua (solubilidades en agua específicas mucho mayor que el 20% del peso en volumen) lo que produce sales solubles en agua con aminas aril y alquilaminas con $pK_a > 2.0$. Son incluidas ácidos carboxílicos arilo alifáticos (específicamente C1-C4), ácidos dicarboxílicos alifáticos (específicamente C2-C6), ácidos tricarboxílicos alifáticos (específicamente C3-C8), y ácidos carboxílicos heteroalquilo. Un ácido carboxílico alifático puede saturarse completamente (Un ácido carboxílico alquilo) o puede tener una ó más unidades insaturadas. Un compuesto ácido carboxílico heteroalquilo es un compuesto ácido carboxílico alifático en el que uno ó más grupos

ES 2 287 463 T3

metano ó metileno se reemplazan por heteroátomos como O, S, ó NH. Ejemplos de compuestos ácidos carboxílico heteroalquilo incluyen un compuesto ácido monocarboxílico heteroalquilo C1-C5 (Por ejemplo un compuesto ácido monocarboxílico alquilo C2-C6 en el cual un grupo metileno o metano ha sido reemplazado con O, S ó NH) y un compuesto ácido dicarboxílico alquilo C3-C8 (Por ejemplo un compuesto ácido dicarboxílico alquilo C2-C7 en el cual un grupo metileno o metano ha sido reemplazado con O, S ó NH).

Un compuesto de ácido carboxílico alifático puede ser lineal o ramificado. Un compuesto de ácido carboxílico alifático puede ser sustituido (funcional), con uno ó más grupos funcionales. Los ejemplos incluyen un grupo hidroxilo (Por ejemplo, un compuesto de ácido carboxílico alifático hidroxilo C2-C6, un ácido dicarboxílico alifático hidroxilo C3-C8 y un ácido tricarboxílico hidroxilo-C4-C10), una amina (por ejemplo, un ácido monocarboxílico alifáticos amino C2-C6, un ácido dicarboxílico alifáticos amino C3-C8 y un ácido tricarboxílico alifáticos amino C4-C10) una cetona (Ejemplo, Un ácido monocarboxílico ceto-alifático C2-C6 un, ácido dicarboxílico ceto-alifáticos C3-C8 ó ácido tricarboxílico ceto-alifático C4-C10) u otro grupo funcional apropiado.

Ejemplos de ácidos orgánicos apropiados son:

Ácidos monocarboxílico alifáticos saturados como el ácido fórmico, el acético ó el propiónico.

Ácidos monocarboxílico alifáticos insaturados como el ácido 2-pentenoico, el ácido 3-pentenoico, el ácido 3-metil-2 butenoico ó el ácido 4-metil-3 pentenoico.

Ácidos funcionalizados como ácido hidroxicarboxílico (Ejemplo: Ácido láctico, Glicólico, ácido pirúvico y ácido mandélico.

Ácidos cetocarboxílico (Ejemplo: Ácido oxaloacético y Ácido α -cetoglutárico).

Ácidos amino carboxílico (Por ejemplo. Ácido aspártico y ácido glutámico).

Ácidos dicarboxílicos alifáticos saturados como el ácido malónico, el ácido succínico, o ácido adípico.

Ácidos dicarboxílico alifáticos insaturados como ácido maleico o ácido fumárico.

Ácido di y tricarboxílicos funcionalizados como ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido glucónico.

Ácidos carboxílicos arilo con suficiente solubilidad en agua. Ejemplo Ácido 4-hidroxibenzoico, Ácido salicílico, ácido antranílico, ácido anísico y ácido Vanílicico.

Anillos heterocíclicos que contiene nitrógeno no aromático son anillos que incluyen cero, uno ó más heteroátomos adicionales como nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo. El anillo puede ser de cinco, seis, siete u ocho miembros. Los ejemplos incluyen morfolinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, piperazinilo, piperidinilo, azetidinilo, azacicloheptilo, ó N -fenilpiperazinilo.

La hidrogenación de compuestos representados por la fórmula estructural (III) se lleva bajo una atmósfera de hidrógeno a presiones entre 5 y 50 libra por pulgada cuadrada (psi), preferentemente entre 13 y 17 psi. Un catalizador de hidrogenación se requiere, por ejemplo Pd/C, Pt/C, PtO₂, níquel de Raney y el hierro elemental activado ó zinc. Después de la hidrogenación, se obtiene un compuesto monovalente. El compuesto divalente correspondiente puede obtenerse por reacción del producto con un equivalente adicional del mismo ó con un compuesto ácido carboxílico diferente.

El compuesto inicial representado por la fórmula estructural (III) puede prepararse por reacción de la base libre correspondiente, donde R1 es $-(CH_2)_nNR_3R_4$, con un compuesto de ácido carboxílico orgánico. Con preferencia el producto resultante se cristaliza antes de hidrogenar. La base libre puede prepararse por reacción de $H_2N(CH_2)_nNR_3R_4$ con 3-nitro-1,8 anhídrido nitronaftálico, en la que n, R3 y R4 están definidas en la fórmula estructural (I). Las condiciones específicas para llevar a cabo esta reacción son descritas en la Patente EE UU No. 4.204.063, enseñanzas que son incluidas en este trabajo como referencia.

Los compuestos revelados en la presente solicitud son útiles para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, la leucemia y el cáncer de mama) en un sujeto. Un "sujeto" es un mamífero, preferentemente un ser humano, pero también puede ser un animal que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, y semejante), animales de granja (Por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y semejante) y animales de laboratorio (Por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias, y análogos).

Una "cantidad eficaz" es la cantidad de compuestos con el que se consigue un resultado clínico beneficioso cuando el compuesto es administrado a un sujeto con cáncer resistente a múltiples fármacos. Un "resultado clínico beneficioso" incluye una reducción en la masa de tumor, una reducción en la tasa de crecimiento del tumor, una reducción en metástasis, una reducción en la gravedad de los síntomas relacionados con el cáncer y/o un aumento en la lon-

gevidad del sujeto comparado con la ausencia del tratamiento. La cantidad exacta de compuesto administrado a un sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad o la condición y sobre las características del sujeto, como salud general, edad, sexo, peso corporal, y la tolerancia a los fármacos. También dependerá en el grado, severidad y tipo de cáncer. El experto experimentado podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de éstos y otros factores.

- 5 Las cantidades eficaces de los compuestos revelados para la aplicación terapéutica que se encuentran con preferencia aproximadamente 0,35 milimoles por el metro cuadrado de área superficial del cuerpo (milimol/m^2) por día y aproximadamente 2,25 milimoles por metro cuadrado de área de superficial del cuerpo (milimol/m^2) por día, y preferentemente entre 1 milimol/m^2 y 1,5 milimol/m^2 a ciclos de 5 días por infusión intravenosa.
- 10 Los compuestos revelados son administrados por cualquier ruta apropiada, incluyendo, por ejemplo, de forma oral en cápsulas, suspensiones o las pastillas o por administración parenteral. La administración parenteral puede incluir la administración, por ejemplo, sistémica, como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Los compuestos también pueden ser administrados de forma oral (por ejemplo, alimenticia), tópico, por inhalación (Por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasal), o rectalmente, dependiendo del tipo del cáncer
- 15 a tratar. Oral o administración parenteral son modos preferentes de la administración.

- Los compuestos revelados pueden ser administrados al sujeto junto con un portador farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. La formulación de compuestos que son administrados variarán de acuerdo con la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula).
- 20 Portadores farmacéuticos apropiados podrían contener ingredientes inertes que no interactúan con el compuesto. Formulaciones farmacéuticas estándar pueden emplearse, como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Portadores farmacéuticos apropiados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, salina fisiológica, salina bacteriostática (salina que contiene aproximadamente 0,9% miligramos/ml alcohol bencílico), buffer fosfato, solución de Hank, lactato y semejante. Los métodos para composiciones en cápsulas (como en una capa de gelatina firme o ciclodextrasna) expuestos en el artículo son conocidos en la técnica (Baker, y colaboradores, "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986).

Ejemplificación

- 30 El método de la invención es ilustrado en más detalle por los siguientes ejemplos que no se pretende que sean restrictivos en modo alguno. El curso de la formación de sal de ácido orgánico de amonafida y sus análogos pueden seguirse por la vía de determinación de los productos formados por Cromatografía y Espectroscopia RMN. Las sales formadas son caracterizadas por espectrometría de masas y análisis elemental.

Ejemplo 1

Síntesis directa de fármaco intercalador (amonafida) como una sal de ácido orgánico (L-malato)

- 40 El esquema de síntesis siguiente describe en detalle la reacción mostrada en la figura 1.

Preparación de malato de mitonafida (III, FW 447.42)

Reactivos

- 45 (I) 3-nitro-1,8-anhídrido nitronaftálico, (FW 243.18, CAS 3027-38-1, pureza 99%, ACROS, catálogo # 27873-0250);
- (II) N,N-dimetil-etilen-diamina (FW 88.15, CAS 108-00-9, pureza 99%, ACROS catálogo. # 11620-100);
- 50 Ácido L-Málico ((FW 134.09, CAS 97-67-6, pureza 99% ACROS catálogo. # 15059-1000.

Procedimiento de síntesis

- 55 100 g. (0,41 mol, 1 eq.) del anhídrido (I) se combina con 1300 ml de etanol anhidro en un matraz de 3 L de cuello inferior redondo 3 equipado con un embudo separador y un agitador de paleta mecánico. Mientras se agita vigorosamente la suspensión una solución de 40 g de diamina (II) (0,45 mol, 1.1 eq) se añade en 100 ml de etanol anhidro con goteo rápido. La agitación se continúa durante 12 horas (toda la noche), y de allí en adelante la mezcla se mantiene a reflujo durante 1 hora.

- 60 Al enfriarse a una temperatura interna de 80°C, una solución de 60 g precalentada (también a 80°C) (0,42 mol, 1,09 eq.) de ácido L-Málico se añade en 100 ml de etanol al matraz de reacción y se continúa la agitación durante 3 horas. La agitación se detiene cuando la reacción llega a la temperatura ambiente, el malato de mitonafida crudo se recupera por filtración. Los sólidos se resuspenden en 1 litro de isopropanol anhidro, refiltrado, y enjuagado con éter dietílico. Se transfieren a un disco seco, triturado mecánicamente y secado al vacío en un horno de secado a 0,1 Torr con calentamiento a 30°C durante 12 horas.
- 65

ES 2 287 463 T3

Un sólido de color marrón (160 g, 87% rendimiento) se obtiene, p.f. 160 - 162°C, con un espectro de RMN de protón (en ácido acético perdeuterado, 80 MHz) de acuerdo a la teoría malato-CH₂, 2,8 ppm, doble asimétrico, 2H; N, N-(CH₃)₂, 3,1 ppm, singlete, 6H; imido-N-CH₂, 3,7 ppm triplete degenerado, 2H; amino-N-CH₂ y malato-CH, 4,6 ppm, multiplete, 3H; arilo-CH, 8 - 9,3 ppm, dos tripletes evidente y un doblete, 5H; OH, 11,4 ppm singlete, 3H.

El material preparado en esta manera es suficientemente puro para el uso en las siguientes etapas de la síntesis.

Alternativamente, para muestras analíticas y biológicas, la recrystalización se produce por la suspensión del producto en etanol acuoso (agua/etanol 1/5 v/v por gramo de III), calentar a hervir y retirar cualquier insolubilidad por filtración en caliente.

Al enfriarse, la masa se filtra, se enjuaga con éter dietílico y se seca al vacío para proporcionar el más ligero, los platos birrefringente (140 g, 76% rendimiento completo), punto de fusión 163-164°C, homogéneo por HPLC, bajo las condiciones indicadas en la Tabla 1.

Preparación de malato de amonafida (IV, FW 417.42)

Procedimiento de síntesis

Una solución de 134 g. (0,3 moles) de malato de mitonafida (III) se resuspende en 1 litro de agua desionizada y desgasificada bajo una manta de argón en una botella de presión de hidrogenación Pa. 1,4 g. de 10% Pd/C se añade y la mezcla se evacúa y depura con gas hidrógeno (tres veces), conectado a unos equipos Parr y se presuriza con gas hidrógeno a 15 psi. La reacción se agita enérgicamente a temperatura ambiente hacia una solución amarilla en lugar de una suspensión coloreada por dos horas. Esta se deja hidrogenar por 12 horas adicionales (toda la noche).

Después del retiro evacuativo del cabezal de hidrógeno y el reemplazo con nitrógeno, la mezcla de reacción se agita con 40 g de carbono activado, se calienta a 50°C, y se pasa a un embudo Buchner a través de papel de filtro doble capa con la ayuda de filtración de Celite prelavado. El filtrado es concentrado en un matraz de cuello redondo de 2 litros, bajo presión reducida en un rotoevaporador con un calentamiento en baño termostatado a 50°C. Cuando se comienza a formar una corteza fina a lo largo del menisco de sirope concentrado, con peso entre 240-250 g, el matraz se refrigera (4°C) durante 12 horas (toda la noche) para que cristalice.

Los cristales resultantes de color amarillos mostaza y el licor madre se trituran con isopropanol, que se añade por partes a un volumen total de 1 litro. Después de 2 horas de refrigeración, la suspensión se filtra, se lava con isopropanol y éter dietílico para proporcionar IV, 113 g. (90%), un polvo amarillo mostaza, de punto de fusión 182 - 184°C, después se seca en un horno de vacío climatizado (40 - 50°C, 0,5 Torr, 14 horas.). El espectro de RMN protónico (en ácido acético perdeuterado, 80 MHz) de acuerdo con la teoría: malato -CH₂, 2,8 ppm, doblete asimétrico, 2H; N, N-(CH₃)₂, 3,1 ppm, singlete, 6H; imido N-CH₂, 3,7 ppm, triplete degenerado, 2H; amino-N-CH₂ y malato-CH, 4,6 ppm, multiplete, 3H; arilo-CH, 7,4-8,2 ppm, dos multipletes evidentes, 5H; OH, 11.4 ppm, singlete, 5H.

Para propósitos comparativos, entre sales orgánicas preparadas de esta manera y para los propósitos siguientes Ejemplo 3, la Tabla 3 de los productos de reacción crudos se recrystalizan en agua/etanol (1,5/4 v/v por gramo de sal) usando la cantidad mínima de disolvente que provoca que la disolución hierva.

Alternativamente, para muestras analíticas y bioensayos, la recrystalización se logra disolviendo el producto en agua (1/4 p/v por g. de IV) y admitiendo una mezcla caliente de 1/1 isopropano/metanol (1/6 p/v por g. de IV), se calienta a hervir para eliminar cualquier sustancia insoluble por filtración en caliente. Enfriar a temperatura ambiente y luego enfriar durante 12 horas. (0 - 4°C), la masa se filtra, enjuagando con isopropanol seguido por éter dietílico y desecado al vacío para proporcionar 90 g. de cristales rómbicos amarillo mostaza, (85 g, 68% de la producción total), con punto de fusión 184 - 185°C, homogéneo por HPLC, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

HPLC de mitonafida y malato de amonafida

Columna*	Fase móvil **	Flujo (mL/min)	Col, Temp (C°)	Rt AmFm MiTm	
Nova Pak C 18					
4 um 60 A°	17/55/28	1,0	30	>30	NA
3,9 x 150 mm	30/35/35	2,5	40	10,2	13,2
	40/25/35	2,5	40	5,1	4,7
Xterra MS C 18	17/55/28	0,8	40	1,4	3,1
3,5 um	17/55/28	0,8	30	2,3	NA
3,0 x 150 mm					
*Columnas empaq.final **CH ₃ CN, H ₂ O, MeOH v/v/v AMFm = Malato de Amonafida MiTn = malato de mitonafida					

Ejemplo 2

Síntesis de la sal ácida carboxílica orgánica de amonafida por valoración

El método del Ejemplo 1, ilustra la síntesis total de amonafida por una secuencia de pasos en los que el ácido orgánico se incorpora al principio, puede ser prolongado al uso de otros ácidos orgánicos. Éstos pueden ser incluidos en cualquier etapa en el plan de síntesis, donde sea adecuado al flujo de reacción y consistente con la práctica química conocida. Por la vía del ejemplo conveniente, unos paneles de sales se preparan fácilmente de manera semiautomática. Se comprende que cualquier análogo o congénico del mismo, con derivados de aralquil-aminas de propiedades de basicidad similares, serían equitativamente adecuado como un ejemplo.

Primero una solución almacenada de amonafida, se distribuye en un vial de reacción individual para suministrar una cantidad definida de sustrato básico. Esta se valora con una segunda solución que contiene un equivalente estequiométrico de un ácido carboxílico orgánico apropiado, cuya acidez es compatible con un valor de pKa acuoso de no menos que 3. La mezcla resultante se calienta para provocar la disolución completa y la neutralización de las especies iónicamente reactivas, y permite el depósito de sales resultantes como productos sobre el enfriamiento. Estas soluciones también pueden ser concentradas, antes del enfriamiento, para optimizar los productos de reacción. Sin embargo, para los resultados óptimos el disolvente de reacción en esta manipulación debe ser escogido con el propósito de que los reactivos sean por separado más solubles que su combinación iónica.

En un ejemplo ilustrativo, el material de base libre se sintetiza de acuerdo con *Brana y colaboradores* Patente de EE UU 5.183.821. Se disuelve una alícuota en etanol anhidro hirviendo en una concentración de 1 gramo por 20 ml. 10 ml de solución preparada de esta manera contiene 1,765 mMol del material y se puede neutralizar por una cantidad equivalente de un ácido carboxílico orgánico apropiado con el objetivo de proporcionar una sal orgánica monovalente. Debido a que amonafida es divalente, en teoría, también puede ser valorada con dos equivalentes del ácido orgánico para permitir una sal divalente. Por lo tanto, el número de equivalentes ácidos que puede ser añadido debe corresponder al número mínimo de equivalentes básicos calculados en el intercalador del fármaco libre y no exceder al máximo tal número.

Para el propósito de este ejemplo, sin embargo, la formación de sal se restringe a monoequivalentes, y además, las soluciones de ácidos carboxílico orgánicos que contengan 1,765 mmol en 10-20 ml de agua en el punto de ebullición se preparan y adicionan individualmente a cada una de las réplicas de 100 ml de la base libre de fármacos por separado en la concentración y volumen aquí descrito. Después de causar las soluciones mezcladas otra vez hervir hasta ebullición para asegurar la disolución completa de todos ingredientes, dejar enfriar a temperatura ambiente y luego refrigerar toda la noche, las sales cristalinas resultantes se recogen por la filtración, se secan enjuagando con éter dietílico y se secan al vacío.

La Tabla 2 proporciona un listado de los ácidos carboxílico orgánicos que son usados para valorar amonafida con el objetivo de producir la sal monovalente cristalina correspondiente. Las sales obtenidas de esta manera pueden ser

caracterizadas en varias ocasiones por cromatografía para homogeneidad química, y por espectrometría de masas ó RMN para propósitos de caracterización estructural, como se describe arriba en el Ejemplo 1. La caracterización por composición elemental también proporciona un método conveniente para la verificación de identidad. Como se ilustra en la Tabla 2, la composición observada en la parte I y la composición elemental teórica en la parte II coinciden de cerca, lo que demuestra que los productos de reacción constituyen una adición equimolar de cada reaccionante como puede ser anticipado para cualquier aditivo monovalente de una base orgánica ó un ácido orgánico.

TABLA 2

Sales de amonafida composición de sales orgánicas

Parte I			Observado	
Acido	C	H	N	O
A) Succínico	59,54	5,89	10,13	24,44
B) Maleico	60,37	5,10	10,23	24,30
C) Fumárico	59,89	5,52	10,20	24,39
D) Cítrico	54,87	5,78	8,30	31,05
E) L-Tartárico	56,27	4,95	9,23	29,55
F) L-Aspártico	56,80	6,02	13,78	23,40
G) Pirúvico	62,45	5,34	11,00	21,21
H) 2-Oxoglutarico	58,12	5,30	10,40	26,18
Parte II			Calculado	
Acido	C	H	N	O
A) Succínico	59,84	5,78	10,47	23,91
B) Maleico	60,14	5,30	10,52	24,03
C) Fumárico	60,14	5,30	10,52	24,03
D) Cítrico	55,58	5,30	8,84	30,29
E) L-Tartárico	55,42	5,35	9,69	29,53
F) L-Aspártico	57,69	5,81	13,45	23,05
G) Pirúvico	61,45	5,70	11,31	21,54
H) 2-Oxoglutarico	58,74	5,40	9,79	26,08

Confirmación adicional de identidad estructural y pureza también pueden obtenerse en cada análisis por RMN en ácido acético perdeuterado, la sal de amonafida y ácido succínico siendo representativa en la medida en que sea comparable a un análogo de la sal de malato preparada en el ejemplo I. Por lo tanto, la sal mostrada se prepara de acuerdo con la Tabla 2, Parte I, entrada A, cuando la combinación monoequivalente de amonafida y ácido succínico indicaba un espectro de RMN protónico (en ácido acético perdeuterado, 80 MHz) de acuerdo a la teoría: succinato-CH₂, 2,7 ppm singlete, 6H; N, N-(CH₃)₂, 3,1 ppm, singlete, 6H; imido N-CH₂, 3,7 ppm, triplete degenerado, 2H; amino-N-CH₂, 4,6 ppm, triplete degenerado, 2H; arilo-CH, 7,4-8,2 ppm, dos multipletes evidentes, 5H; OH, 11,4 ppm, singlete, 4H.

Aunque estos ejemplos ilustran el uso de algunas moléculas quirales, como por ejemplo en las entradas E-F, se sigue que los resultados disponibles para los propósitos de la formación de sal pueden ser obtenidos con el formulario racémico correspondiente o antípodos alternativos de tales ácidos. Por lo tanto, la selección de los L-enantiómeros en este caso no debe tomarse como una restricción de la enseñanza; sino como un buen ejemplo que entenderán los expertos a ser el más comúnmente disponible de estos ácidos carboxílicos orgánicos formados para los propósitos de la experimentación biológica.

Ejemplo 3

Las sales orgánicas de amonafida son más fácilmente purificadas que las sales ácida metan-sulfónicas o clorhídricas de amonafida

Preparación de malato de amonafida por el método del ejemplo 1

El malato de amonafida, Fumarato amonafida, maleato amonafida, malonato de amonafida y hemisuccinato amonafida se prepararon de acuerdo con el método del Ejemplo 1. En el caso de ácido succínico, el ácido orgánico fue distribuido como un resto equivalente para generar hemisuccinato de amonafida. Este método se ilustra esquemáticamente en la Figura 1 para malato de amonafida. El producto crudo que estaba separado de la mezcla de reacción de hidrogenación se analiza para la pureza por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 1 más arriba. El producto crudo fue recrystalizado en agua/etanol (1.5/4 v/v) usando la cantidad mínima de disolvente requerida para disolver el producto crudo en el punto de ebullición, que se muestra en la última columna de la Tabla 3 para cada sal. El producto recrystalizado se analiza para la pureza por HPLC. La pureza para las sales aisladas y recrystalizadas se reportan debajo en la Tabla 3.

Preparación de base libre de amonafida

La base libre de amonafida se prepara de acuerdo con los procedimientos revelados en la Patente EE UU No. 5.183.821 por *Brana y colaboradores*, condiciones ejemplares, en 1/100° de la escala reportada son como sigue:

5 30 g de 2-(2-dimetil-aminoetil)-5-nitrobenzo[d,e]isoquinolina-1,3-diona y 0,75 g. de paladio 10% sobre carbono en 750 mililitros de etanol se reflujan con agitación hasta disolución completa del compuesto de nitro. Acto seguido 40 mililitros de hidrato de hidracina, de especificaciones comerciales de equivalencia de hidracina anhidra al 60%, se añade despacio durante un período de 30 minutos. Cuando la adición se completa, el reflujo y la agitación se continúa durante 3,5 horas, seguida por la filtración mientras todavía esté caliente. La mezcla de reacción se deja

10 alcanzar la temperatura ambiente durante toda la noche. El producto cristalino se filtra para proporcionar la base libre de amonafida.

Preparación de sales ácidas orgánicas de Amonafida

15 Como se ilustra en la segunda columna de la Tabla 3 a continuación, fumarato, malato, maleato, malonato y la sal de hemi-succinato de amonafida se obtienen de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 por la formación *in situ* de la sal de mitonafida correspondiente, seguida por hidrogenación catalítica. También, el adipato, el aspartato, citrato, glicolato, malato, oxoglutarato, piruvato, salicilato, succinato, y sales de tartrato de amonafida se obtienen de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 2 para la base libre de amonafida crudo preparada

20 como se describe en el párrafo anterior. Las purezas de las sales crudas se valoran por HPLC de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 1 arriba. Estas sales crudas se recrystalizan en una cantidad mínima de agua/etanol (1.5/4 v/v) usando la cantidad mínima de disolvente requerido para disolver el producto crudo en el punto de ebullición, que se muestra en la última columna de la Tabla 3 para cada sal. Las sales purificadas resultantes son evaluadas en relación con la pureza otra vez. La pureza para el crudo y las sales recrystalizadas son mostradas en la Tabla 3 a continuación.

25

Preparación de la sal de hidrocloreto y la sal de ácido metan-sulfónico de Amonafida por el método de Brana y colaboradores, Patente EE.UU. No. 5.420.137

30 El hidrocloreto y las sales de ácido metan-sulfónico de amonafida se preparan de acuerdo con la Patente EE.UU. No. 5.420.137. Los procedimientos de ejemplo son los siguientes: 3 g de amonafida crudo, obtenido como se describe en los dos párrafos previos, de arriba, son disueltos bajo reflujo en 60 ml de etanol prácticamente anhidro. Posteriormente 1 ml de 35% (1 equivalente, aproximadamente) de ácido clorhídrico fuerte se añade en forma de gotas mientras se agita enérgicamente. Después de enfriar, los cristales resultantes se filtran y se lavan con 10 ml de etanol anhidro.

35 La sal de ácido metan-sulfónico se obtiene usando el mismo procedimiento, pero reemplazando el ácido clorhídrico con 0,8 ml de ácido metan-sulfónico. La pureza se evalúa por HPLC con las condiciones descritas en la Tabla 1. Los productos aislados son entonces recrystalizados en agua/etanol (1.5/4 v/v) usando las cantidades mínimas de disolvente requerido para disolver el producto crudo en el punto de ebullición, que se muestran para cada sal en la Tabla 3. Las sales purificadas resultantes son evaluadas en relación con la pureza otra vez. Los resultados son mostrados en la Tabla

40 3 a continuación.

Preparación de la sal de hidrocloreto de Amonafida por el método de Zee-Chang y colaboradores, Patente EE.UU No. 4.614.820

45 La sal de hidrocloreto de Amonafida se obtiene por el método de Zee-Chang y colaboradores, Patente EE.UU. No. 4.614.820. Las condiciones de ejemplo son: una mezcla de la sal de hidrocloreto de N-dimetilaminoetil-3-nitro-1,8-naftalimida y 10% de paladio sobre carbono en el agua es hidrogenada a temperatura ambiente bajo 40 libras/plg² de hidrógeno durante una hora. La cantidad teórica de hidrógeno se absorbe. A la mezcla se adiciona 3 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se filtra entonces y el filtrado se evapora a sequedad bajo presión reducida. El residuo se

50 tritura con 30 ml de etanol total absoluto y filtrado. El sólido resultante se lava con éter y se seca. La pureza se valora por HPLC usando las condiciones descritas en la Tabla 1. El producto crudo se recrystaliza en agua/etanol (1.5/4 v/v) usando la cantidad mínima de disolvente (40 ml/g) requerida para disolver el producto crudo en el punto de ebullición. Las sales purificadas resultantes son evaluadas en relación con la pureza otra vez. Los resultados son mostrados en la Tabla 3 a continuación.

55

60

65

TABLA 3

Sal	Método	Pureza (vaso de reacción)	Pureza (Desp. 1 por cristalizac)	Solvente (ml/g)
Malato de amonafida	Ejemplo 1	92 %	99,3 %	7,5
Malato de amonafida	Ejemplo 2	98 %	99,6 %	7,5
HCl Amonafida	Patente EE.UU. 5.420.137 Brana y asociados	76 %	94 %	40
HCl Amonafida	Patente EE.UU. 4.614.820 Zee- Cheng y asociados.	74 %	92 %	40
Metan-sulfonato de Amonafida	Patente EE.UU. 5.420.137 Brana y asociados.	86 %	93 %	25
Tartrato de Amonafida	Ejemplo 2	90 %	99,2 %	20
Adipato de Amonafida	Ejemplo 2	89 %	98,0 %	25
Aspartato de Amonafida	Ejemplo 2	78 %	98,7 %	30
Citrato de Amonafida	Ejemplo 2	92 %	99,1 %	25
Fumarato de Amonafida	Ejemplo 1	76 %	98,9%	25
Glicolato de Amonafida	Ejemplo 2	92 %	99,3 %	12,5
Maleato de Amonafida	Ejemplo 1	70 %	99,2 %	20
Malonato de Amonafida	Ejemplo 1	74 %	97,0 %	20
2-Oxoglutarato de Amonafida	Ejemplo 2	77 %	98,1 %	30
Piruvato de Amonafida	Ejemplo 2	84 %	99,5 %	20
Salicilato de Amonafida	Ejemplo 2	87 %	98,7 %	35
Hemi-succinato* de Amonafida	Ejemplo 1	88 %	98,7 %	15
Succinato de Amonafida	Ejemplo 2	93 %	99,2 %	20
L-Tartrato de Amonafida	Ejemplo 2	90 %	99,2 %	20
* El hemisuccinato preparado de hemisuccinato de mitonafida, en donde se uso 0,5 eq. De ácido succínico en la separación de mitonafida. Por el contrario, la sal succinato se preparó añadiendo un eq.				

Como es evidente de los datos que se muestran en la Tabla 3, la pureza de las sales orgánicas recristalizadas de amonafida son en cada caso significativamente más grande que las sales ácida de hidróclorato recristalizada correspondiente y la sal ácida metan-sulfónica. Además, al comparar el malato con los restos HCl, el volumen de recristalización para la purificación de la sal de malato es 5 veces más pequeño, demostrando solubilidad en medio hidroxílico más grande así como mayor facilidad de manipulación en soluciones concentradas. Las sales de glicolato y la hemisuccinato son también significativamente más solubles que las sales ácida metan-sulfónico o las HCl.

Ejemplo 4

Las sales de ácido orgánicas de amonafida son más solubles en el agua que la sal de hidróclorato correspondiente

Varias sales de amonafida de ácidos orgánicos de la presente invención se probaron para su solubilidad en medio acuosa y se compararon con la solubilidad del hidróclorato y las sales de ácido metan-sulfónico correspondiente. Específicamente, la solubilidad evaluada (en el duplicado) para la inspección de sal se dirige antes de disolverse, o intentar disolverse, 50, 100 y 200 mg de cada sal en 1 ml de agua USP ó 1 ml salino isotónico en vortex a temperatura ambiental. Las soluciones se permitieron equilibrar su estado de disolución notado durante 1 hora, y luego se refrigeraron durante una hora adicional (a 2°C). En adelante, las muestras retornan a la temperatura ambiente y revisadas para la formación precipitada y permitida equilibrarse durante otra hora hasta una inspección final para el estado de disolución. Los resultados son presentados en la Tabla 4.

TABLA 4

SAL AMONAFIDA				
	Cant. Sal Amonafida (mg)	Solvente	Tiempo	Estado de la disoluc.
L-Aspartato	100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
			1 hora	Soluble
		Agua Destilada	0 hora	Soluble
			1 hora	Soluble
	200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	P. Soluble
			1 hora	P. Soluble
		Agua Destilada	0 hora	P. Soluble
			1 hora	P. Soluble
Citrato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
			1 hora	Insoluble
		Agua Destilada	0 hora	Insoluble
			1 hora	Insoluble
Fumarato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
			1 hora	Insoluble
		Agua Destilada	0 hora	Insoluble
			1 hora	Insoluble
Mono-clorhidrato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	P. Soluble
			1 hora	P. Soluble
		Agua Destilada	0 hora	P. Soluble
			1 hora	P. Soluble
	100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
			1 hora	Insoluble
		Agua Destilada	0 hora	Insoluble
			1 hora	Insoluble
	200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
			1 hora	Insoluble
		Agua Destilada	0 hora	Insoluble
			1 hora	Insoluble
Di-Hidroclorato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
			1 hora	Insoluble
		Agua Destilada	0 hora	P. Soluble
			1 hora	P. Soluble
	100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble

ES 2 287 463 T3

TABLA 4 (continuación)

SAL AMONAFIDA					
5		Cant. Sal Amonafida (mg)	Solvente	Tiempo	Estado de la disoluc.
				1 hora	Insoluble
			Agua Destilada	0 hora	Insoluble
				1 hora	Insoluble
10	L- Malato	200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble
			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
15	Maleato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
				1 hora	Insoluble
			Agua Destilada	0 hora	Insoluble
				1 hora	Insoluble
20	Malonato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble
			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
25		100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
				1 hora	Insoluble
			Agua Destilada	0 hora	Insoluble
				1 hora	Insoluble
30	Metan-sulfonato	200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble
			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
35	2-Oxoglutarato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble
			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
40		100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
				1 hora	Insoluble
			Agua Destilada	0 hora	Insoluble
				1 hora	Insoluble
45	Piruvato	100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble
			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
		200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	P. Soluble
50				1 hora	P. Soluble
			Agua Destilada	0 hora	P. Soluble
				1 hora	P. Soluble
	Succinato	50	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
				1 hora	Insoluble
55			Agua Destilada	0 hora	Soluble
				1 hora	Soluble
		100	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Insoluble
				1 hora	Insoluble
60			Agua Destilada	0 hora	Insoluble
				1 hora	Insoluble
	Tartrato	200	0,9 % Cloruro de Sodio (salina)	0 horas	Soluble
				1 hora	Soluble

ES 2 287 463 T3

De los datos de la tabla 4, se evidencia que un número de sales ácidas orgánicas de amonafida son más solubles en agua destilada y salina a altas concentraciones que las sales formadas correspondientes. Estas últimas incluyen el aspartato, malato, piruvato, oxoglutarato y tartrato.

5 Ejemplo 5

El malato de amonafida tiene actividad anti-cáncer in vitro

10 El Malato de amonafida se prueba para la actividad citotóxica en unos paneles de tres líneas de célula, MCF7 (pecho), H460 (Cáncer de pulmón en célula no pequeñas) y SF268 (Glioma). Estas líneas de célula son usadas por el Instituto Nacional del Cáncer División de Desarrollo Terapéutico en su proceso de revisión preliminar para agentes antineoplásicos. El protocolo que se usa es el siguiente:

15 Las células se crecen en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 5% fetal y 2 mmol de L-glutamina. El tiempo de duplicado de la célula dependiente entre 5 000 y 40 000 células se inocula en 96 placas de pocillos de microtitulación en un volumen de 100 μ l por pocillo. Las placas son incubadas en 37°C, 5% CO₂ 95% aire, y 100% de humedad relativa por 24 horas antes de la adición del fármaco experimental. Después de 24 horas de incubación, dos (2) placas de cada línea de célula son reparadas *in situ* con ácido tricloroacético (TCA) para establecer una población de célula al tiempo de adición del fármaco (Tz).

20 Antes de su uso, las fármacos experimentales son solubilizados en sulfóxido de dimetilo en 400 mmol de concentración de prueba máxima final deseada y congelada. A la hora de la adición de fármaco, una alícuota del concentrado congelado se derrite y diluye dos veces la concentración de prueba máxima final deseada con 50 ug/ml de gentamicina. Cuatro adicionales (4) de los 10 pliegues ó ½ lóg. de diluciones seriadas son hechas cuatro para un total de cinco concentraciones de fármaco de (5) más un control. Un alícuota de 100 μ l de cada dilución de fármaco se añade al pocillo apropiado que ya contiene 100 μ l del medio que contenían las células. Las placas son incubadas durante 48 horas en 37°C, 5% CO₂, 95% aire, y 100% de humedad relativa.

30 Las células se fijan entonces *in situ* por la adición ligera de 50 μ l frío (p/v) TCA (concentración final, TCA 10%) y se incuban durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se descarta, las placas se lavan cinco (5) veces con agua corriente y se secan al aire. Solución B (SRB) de Sulforodamina (100 μ l) al 0,4% (p.v.) en ácido acético 1% se añade a cada pocillo, y las placas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. La tintura no enlazada se retira por lavado cinco (5) veces con ácido acético 1% y las placas se secan al aire. La mancha comprometida se solubiliza con 10 mmol *trizma baseanad*, la absorbancia es leída sobre un lector de placa automática a una longitud de onda de 515 nm.

35 El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula usando las siete mediciones de absorbancia [tiempo cero, (Tz), el control de crecimiento, (C), más el crecimiento de prueba en los cinco niveles de concentración de fármaco (Ti)] de la siguiente manera:

40 $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ para concentraciones, las cuales $Ti \geq Tz$

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$ para concentraciones, las cuales $Ti < Tz$

$GI_{50} = [(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$

45 $TGI = [(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 100$

$LC_{50} = [(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = 50$

50 Todos los experimentos son llevados a cabo por triplicado.

LC_{50} se define como la concentración de fármaco resultante en la reducción al 50% de la proteína medida en el final de la quimioterapia comparado con lo que al inicio demuestra una pérdida neta de células siguiendo el tratamiento.

55 El Malato de Amonafida muestra una actividad considerable como se observa en la Figura 2 y la Tabla 5.

TABLA 5

	H460	SF268	MCF7
GI_{50} (M)	4.11E-06	7.70E-06	5.16E-06
TGI (M)	0,96E-04	1.54E-04	1.10E-04
LC_{50} (M)	1.70E-04	8.42E-04	6.62E-04

Ejemplo 6

Amonafida tiene actividad anti-cáncer in vivo

El Malato de Amonafida se ensaya en la actividad anti-cáncer *in vivo* en modelos de tres tipos de tumores sólidos diferentes, MCF7 (pecho), COLO205 (Colorectal) y PC3 (próstata). La actividad *in vivo* se evalúa usando la metodología de *Hollow fiber* desarrollada por el Instituto Nacional del Cáncer División de desarrollo terapéutico para el uso en su programa de revisión de agente antineoplásico. Específicamente, la actividad anti-cáncer de L-Malato de amonafida se evalúa por el siguiente protocolo.

Fibras huecas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) son usadas. Las fibras estaban por separado coloreadas y llenadas con etanol al 70% e incubadas en etanol 70% a temperatura ambiente durante un mínimo de 96 horas. Luego de tres lavados con agua desionizada, las fibras son llenadas y puestas en una cacerola de agua desionizada para la esterilización por autoclave. Luego las fibras son guardadas en el agua a 4°C hasta su uso.

Los ratones son agrupados en 4 grupos, dos grupos de control con 6 ratones por grupo y 2 grupos experimentales con 3 ratones por grupo. Los grupos experimentales son como sigue:

Grupo A: Control, fibras huecas sin células

Grupo B: Control, las fibras huecas para 3 líneas de célula sin quimioterapia

Grupo C: Fibras huecas para 3 líneas de célula + Malato de Amonafida.

La anestesia en los ratones se induce por xilazina/acepromazina/cetamina inyectada por implante intraperitonealmente, (i.p.), se hace una incisión pequeña a través de la piel y la musculatura de la pared abdominal dorsal, las muestras de fibra son insertadas en el cavidad peritoneal en una dirección de craneocaudal y la incisión se cierra con una grapa de piel. Para implantes subcutáneos (s.c.), una incisión de piel pequeña se hace en la nuca para admitir la inserción de 11 trocar de implante de tumor de vía ancha. El trocar, conteniendo las muestras de fibra huecas, es insertado caudalmente a través del tejido subcutáneo y las fibras son dejadas durante el retraimiento del trocar. La incisión de piel fue cerrada con una grapa de piel. Cada ratón era el hospedero de 6 muestras, cada uno, representando 3 líneas de células de tumor en los 2 compartimentos fisiológicos. (i.p. y s.c.).

El Malato de Amonafida (29.4 mg/kg) se inyecta intraperitonealmente (i.p.), Una vez diariamente de 3 a 8 días.

Al día siguiente a la última inyección de fármaco, los animales son sacrificados y las fibras huecas extraídas. Las fibras huecas son sujetas al punto final estable del ensayo MTT. La densidad óptica de cada muestra es determinada por espectrofotometría a 540 nm y se calcula la media de cada grupo de tratamiento. El porcentaje de crecimiento neto para cada línea de célula en cada grupo de tratamiento se calcula y compara con el porcentaje de crecimiento neto en el vehículo control tratado para determinar el % de inhibición de crecimiento.

$$\% \text{ inhibición del crecimiento} = (\text{Crec. Neto}_{\text{control}} - \text{Crec. Neto}_{\text{tratado}} / \text{Crec. Neto}_{\text{control}}) * 100$$

Pesos corporales individuales de los ratones son registrados diariamente y los animales son controlados diariamente por su salud general durante 6 días. No es necesario sacrificar ningún animal en una cámara de CO₂ prematuramente como resultado de una pérdida de peso del cuerpo más grande que el 20%, o como resultado de evidencia de otros signos de toxicidad.

El Malato de Amonafida muestra actividad considerable como se observa en la Figura 3 y la Tabla 6.

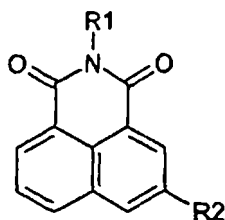
TABLA 6

	IP		SC	
	%Inhibición Crecim	STDEV	% Inhibición Crecim	STDEV
MCF-7	150,2	19,2	116,1	12,1
COLO205	84,6	11,7	80,4	11,7
PC3	71,6	7,3	52,9	10,9

Habiendo sido mostrada esta invención en sus particularidades y descrita con referencias a sus realizaciones preferidas, se comprenderá por los expertos en la técnica que se podrán realizar diversos cambios en su forma y sus detalles sin apartarse del alcance de la invención que se engloba en las reivindicaciones acompañantes.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural, en el que:



(I).

R₁ es $-(CH_2)_nN^+HR_3R_4 X^-$, siempre que R₁ puede también ser $-(CH_2)_nNR_3R_4$ cuando R₂ es $-N^+HR_6R_7$.

R₂ es $-OR_5$, halógeno, $-NR_6R_7$, $-N^+HR_6R_7 X^-$, ácido sulfónico, nitro, $-NR_5COOR_5$, $-NR_5COR_5$ ó $-OCOR_5$.

R₃ y R₄ son por separado H, o un grupo alquilo C1-C4, ó tomados junto al átomo de nitrógeno al que están enlazados, un grupo heterocíclico no aromático que contiene nitrógeno.

Cada R₅ es por separado H o un grupo alquilo C1-C4

R₆ y R₇ son por separado H, un grupo alquilo C1-C4, ó tomados junto al átomo de nitrógeno al que están enlazados, un grupo heterocíclico no aromático que contiene nitrógeno.

n es un número entero de 0-3.

X es el anión carboxilato de un compuesto de ácido carboxílico orgánico.

2. El compuestos de la reivindicación 1, en el que:

n es 2;

R₂ es $-NO_2$, $-NH_2$, ó $-NH_3^+ X^-$ y

R₃ y R₄ son lo mismo y son $-H$, $-CH_3$, ó $-CH_2CH_3$

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que R₃ y R₄ son $-CH_3$.

4. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que X^- es el anión carboxilato de un ácido monocarboxílico alifático C1-C4, ácido monocarboxílico hidroxialifático C2-C6, ácido monocarboxílico cetotalifático C2-C6, ácido monocarboxílico aminotalifático C2-C6, un ácido dicarboxílico alifático C2-C8, un ácido dicarboxílico hidroxialifático C3-C8, un ácido dicarboxílico cetotalifático C3-C8, un ácido dicarboxílico aminotalifático C3-C8, un ácido tricarboxílico alifático C3-C8, un ácido tricarboxílico hidroxialifático C4-C10, un ácido tricarboxílico cetotalifático C4-C10, un ácido tricarboxílico aminotalifático C4-C10, un ácido carboxílico arilo, un ácido monocarboxílico heterotalquilo C1-C5, ó un ácido dicarboxílico heterotalquilo C3-C8.

5. El compuesto de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que X^- es el anión carboxilato de los ácidos fórmico, acético, ácido propiónico, ácido 2-pentenoico, ácido 3-pentenoico, ácido 3-metil-2 butenoico, ácido 4-metil-3 pentenoico, ácido láctico, glicólico, ácido mandélico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutarico, ácido pirúvico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido glucónico.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X^- es malato.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que uno de los grupos amino del compuesto está protonado.

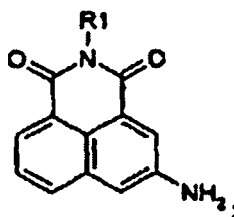
8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X^- es el anión carboxilato de un ácido monocarboxílico hidroxialifático C2-C6, ácido monocarboxílico cetotalifático C2-C6, un ácido dicarboxílico alifático C2-C8, un ácido dicarboxílico cetotalifático C3-C8 y el compuesto es amonafida.

9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es tartrato de amonafida, adipato de amonafida, aspartato de amonafida, citrato de amonafida, fumarato de amonafida, glicolato de amonafida, maleato de amonafida, malonato de amonafida, 2-oxoglutarato de amonafida, piruvato de amonafida, salicilato de amonafida, hemisuccinato de amonafida.

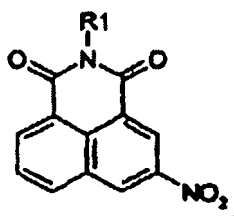
10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es malato de amonafida.

11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es malato de amonafida que tiene un grupo amino protonado.

12. Un método de preparar un compuesto del producto representado por la siguiente fórmula estructural:



a partir de un compuesto inicial representado por la siguiente fórmula estructural, en la que:



R1 es $-(CH_2)_nN^+HR_3R_4X^-$;

R3 y R4 son por separado H, C1-C4 grupo alquilo, ó tomados junto al átomo de nitrógeno al que están enlazados, un grupo heterocíclico no aromático que contiene nitrógeno.

n es un entero de 0-3 y

X^- es el anión carboxilato de un compuesto de ácido carboxílico orgánico,

dicho método que comprende el paso de hidrogenar el compuesto de partida en agua, formando así el compuesto del producto.

13. El método de la reivindicación 12, en el que:

n es 2; y

R3 y R4 son lo mismo y son -H, CH_3 , ó CH_2CH_3 .

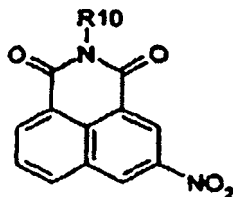
14. El método de la reivindicación 13, en el que R3 y R4 son $-CH_3$.

15. El método de las reivindicaciones 12 ó 14, en el que X^- es el anión carboxilato de un ácido monocarboxílico alifático C1-C4, ácido monocarboxílico hidroxialifático C2-C6, ácido monocarboxílico cetonalifático C2-C6, ácido monocarboxílico aminonalifático C2-C6, un ácido dicarboxílico alifático C2-C8, un ácido dicarboxílico hidroxialifático C3-C8, un ácido dicarboxílico cetonalifático C3-C8, un ácido dicarboxílico aminonalifático C3-C8, un ácido tricarboxílico alifático C3-C8, un ácido tricarboxílico hidroxialifático C4-C10, un ácido tricarboxílico cetonalifático C4-C10, un ácido tricarboxílico aminonalifático C4-C10, un ácido carboxílico arilo, un ácido monocarboxílico heteroalquilo C1-C5, ó un ácido dicarboxílico heteroalquilo C3-C8.

16. El método de las reivindicaciones 12 ó 14, en el que X^- es el anión de carboxilato del ácido fórmico, acético, ácido propiónico, ácido 2-pentenoico, ácido 3-pentenoico, ácido 3-metil-2-butenico, ácido 4-metil-3-pentenoico, ácido láctico, glicólico, ácido mandélico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutarico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido masónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido tartárico, ácido cítrico ó ácido glucónico.

17. El método de las reivindicaciones 12 ó 14, en el que X^- es malato.

18. El método de la reivindicación 12, en el que el compuesto inicial es haciendo reaccionar HX con un compuesto precursor representado por la siguiente fórmula estructural:



en donde R10 es $-(CH_2)_nNR_3R_4$.

19. El método de la reivindicación 18, en el que n es 2 y R3 y R4 ambos son metilo.

20. El método de la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en el que HX es un ácido monocarboxílico alifático C1-C4, ácido monocarboxílico hidroxi-alifático C2-C6, ácido monocarboxílico cetó-alifático C2-C6, ácido monocarboxílico amino-alifático C2-C6, un ácido dicarboxílico alifático C2-C8, un ácido dicarboxílico hidroxi-alifático C3-C8, un ácido dicarboxílico cetó-alifático C3-C8, un ácido dicarboxílico amino-alifático C3-C8, un ácido tricarboxílico alifático C3-C8, un ácido tricarboxílico hidroxi-C4-C10, un ácido tricarboxílico cetó-C4-C10, un ácido tricarboxílico amino-C4-C10, un ácido carboxílico arilo, un ácido monocarboxílico heteroalquilo C1-C5, ó un ácido dicarboxílico heteroalquilo C3-C8.

21. El método de las reivindicaciones 18 ó 19, en el que HX es ácido fórmico, acético, ácido propiónico, ácido 2-pentenoico, ácido 3-pentenoico, ácido 3-metil-2-butenóico, ácido 4-metil-3-pentenoico, ácido láctico, glicólico, ácido mandélico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutárico, ácido pirúvico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico ó ácido glucónico.

22. El método de la reivindicaciones 18 o 19, en el que HX es el ácido málico.

23. El método de los reivindicaciones 12 ó 14, en el que el compuesto inicial se cristaliza antes de hidrogenar.

24. El método de las reivindicaciones 18, en el que el compuesto inicial se prepara por reacción del anhídrido 3-nitro-1,8-nitroftálico con $H_2N-(CH_2)_nNR_3R_4$.

25. El método de la reivindicación 18, en el que el compuesto inicial se prepara por reacción del anhídrido 3-nitro-1,8-nitroftálico con $H_2N-(CH_2)_2N-(CH_3)_2$.

26. Un método de la reivindicación 12 para preparar una sal orgánica del ácido carboxílico de amonafida que comprende los pasos:

a) reacción del anhídrido 3-nitro-1,8 nitroftálico con $H_2N-(CH_2)_2N-(CH_3)_2$ para formar mitonafida;

b) reacción de mitonafida con un compuesto orgánico de ácido carboxílico para formar una sal orgánica de ácido carboxílico de mitonafida;

c) cristalización de la sal orgánica de ácido carboxílico de mitonafida; e

d) hidrogenación en agua de la sal orgánica de ácido carboxílico de mitonafida para formar la sal orgánica de ácido carboxílico de amonafida.

27. El método de la reivindicación 26, en el que el ácido carboxílico orgánico es el ácido fórmico, acético, ácido propiónico, ácido 2-pentenoico, ácido 3-pentenoico, ácido 3-metil-2-butenóico, ácido 4-metil-3-pentenoico, ácido láctico, glicólico, ácido mandélico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutárico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico ó ácido glucónico.

28. Un método de la reivindicación 26 para preparar una sal ácida málica de amonafida que comprende los pasos de:

a) reacción del anhídrido 3-nitro-1,8 nitroftálico con $H_2N-(CH_2)_2N-(CH_3)_2$ para formar mitonafida.

b) reacción de mitonafida con ácido málico para formar la sal ácida málica de mitonafida.

c) cristalización de la sal ácida málica de mitonafida; e

ES 2 287 463 T3

d) hidrogenación en agua de la sal cristalizada ácida málica de mitonafida para formar la sal ácida málica de amonafida.

5 29. Una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente aceptable farmacéuticamente y el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10.

30. Una composición farmacéutica que comprende a un portador o diluyente aceptable farmacéuticamente y el compuesto de la reivindicación 11.

10 31. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

15 32. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

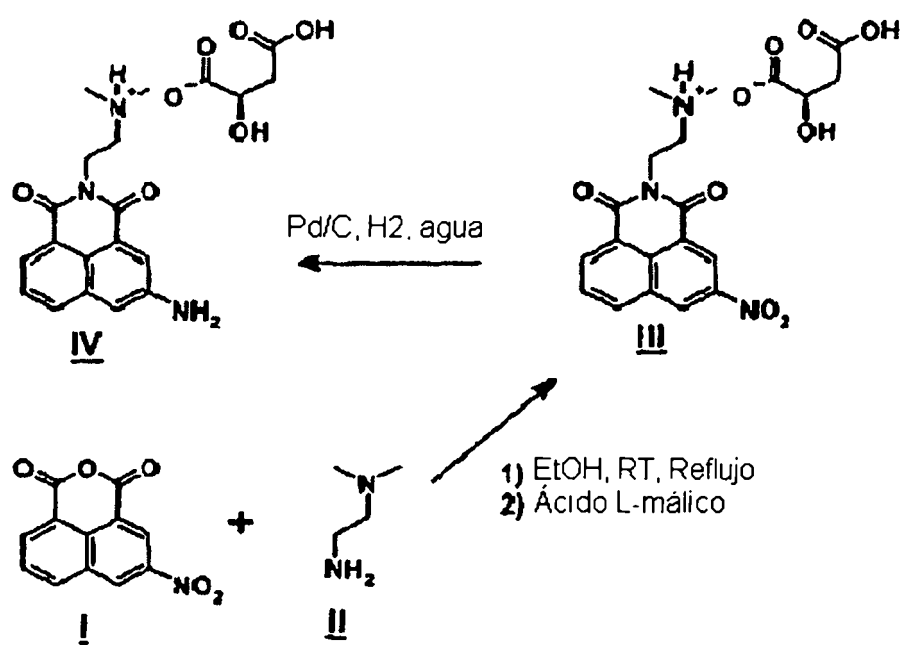


Fig 1

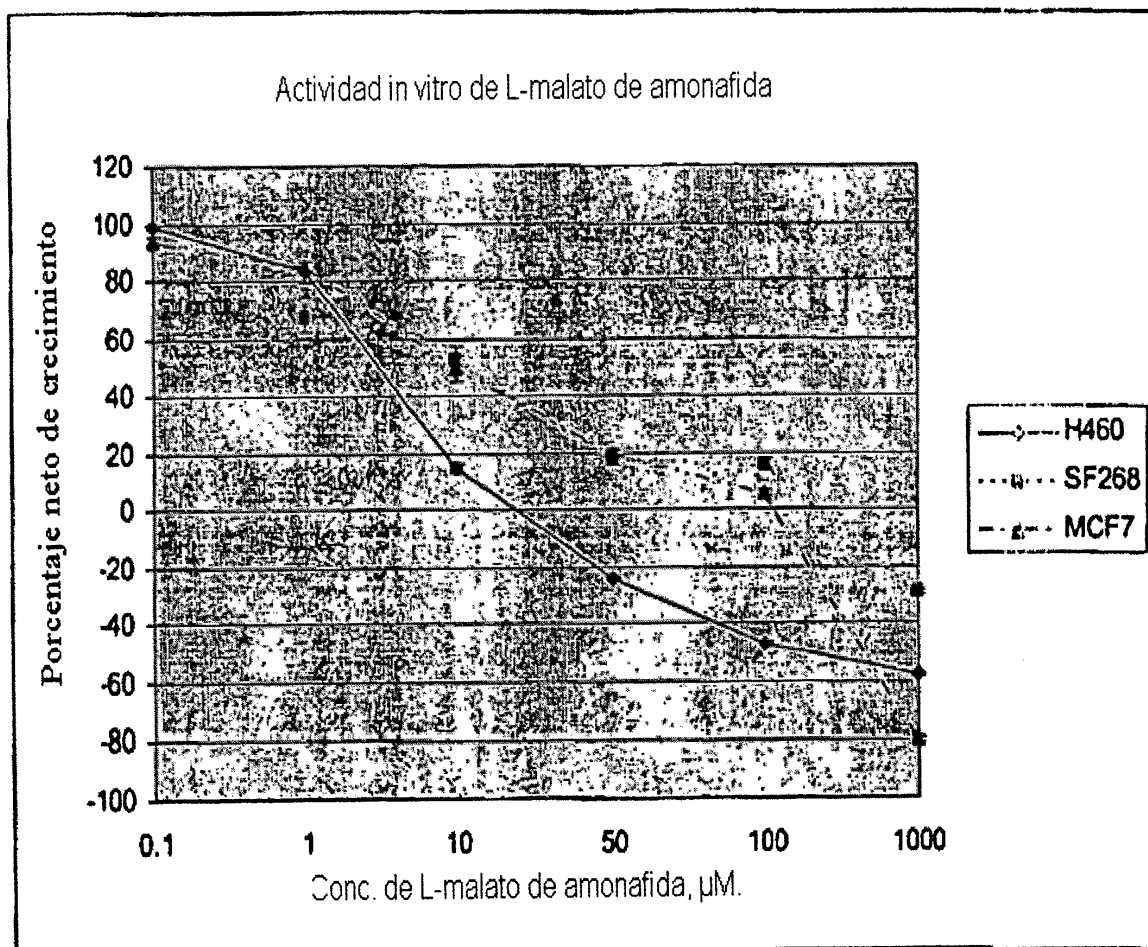


Figura 2

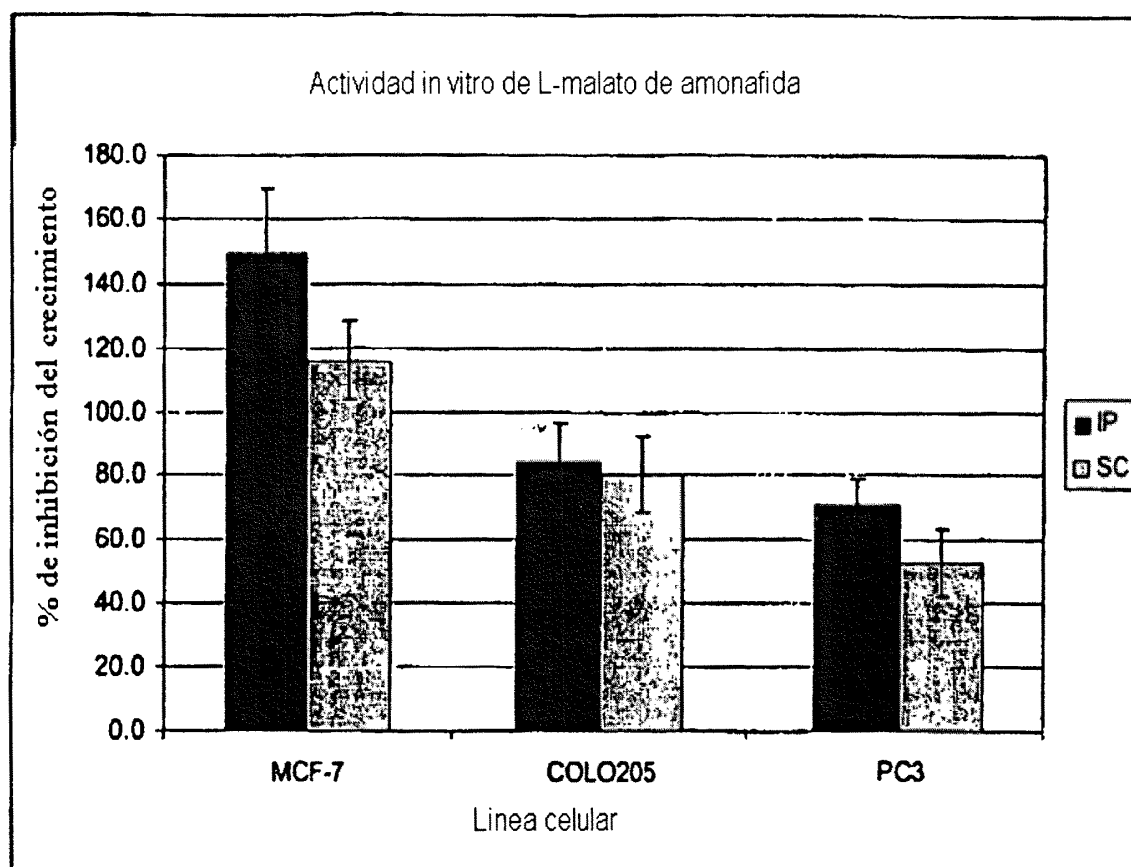


Figura 3