

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 906**

51 Int. Cl.:

**C07D 303/16** (2006.01)

**A61K 31/216** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07C 69/732** (2006.01)

**A61K 31/21** (2006.01)

**C07C 69/734** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2010 PCT/CA2010/001613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11041907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10821532 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 2486026**

54 Título: **Derivados del di(fenilpropanoide) glicerol para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**09.10.2009 US 250287 P**

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

**09.03.2021**

73 Titular/es:

**MACGREGOR, ALEXANDER (100.0%)  
5 Scott-Hall Court  
Markham, Ontario L6C 1A4, CA**

72 Inventor/es:

**MACGREGOR, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 810 906 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados del di(fenilpropanoide) glicerol para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la presente invención se refiere a derivados de propano diil dicinamato para tratar el cáncer y métodos para su preparación.

Antecedentes de la invención

10 Según la organización mundial de la salud, los tumores malignos fueron responsables del 12 por ciento de los casi 56 millones de muertes en todo el mundo por todas las causas en el año 2000. En particular, 5.3 millones de hombres y 4.7 millones de mujeres desarrollaron un tumor maligno y en total 6.2 millones murieron de la enfermedad. El informe también revela que el cáncer se ha convertido en un importante problema de salud pública en los países en desarrollo, igualando su efecto en las naciones industrializadas.

15 Aunque se han realizado progresos sustanciales en las últimas dos décadas, quedan muchos tipos de cáncer para los cuales la terapia convencional es parcial o totalmente ineficaz. El principal problema común con estas terapias es la toxicidad inaceptable.

De este modo, se necesitan nuevos compuestos, agentes o métodos para prevenir ya sea el desarrollo de cáncer o, en el caso de que la neoplasia ya se haya desarrollado, para liberar el organismo huésped libre del cáncer o para reducir su carga neoplásica a un nivel compatible con vida o al menos para facilitar el uso de terapias concomitantes.

20 En esencia, la neoplasia, incluido el cáncer, se puede considerar como la acumulación inapropiada de células, en violación del delicado equilibrio entre la renovación celular y la muerte celular. Para que se desarrolle la neoplasia, se debe aumentar la renovación celular o disminuir la muerte celular o ambas. Un corolario de esta relación es que un agente que afecta estos procedimientos favorablemente para el organismo huésped (y, en consecuencia, desfavorablemente para la neoplasia), es un posible fármaco antineoplásico.

25 Se han aislado e identificado varios agentes antineoplásicos a partir de fuentes naturales. Por ejemplo, la curcumina (diferuloilmetano), un polifenol derivado de la planta *Curcuma longa*, comúnmente llamada cúrcuma, se ha estudiado ampliamente en los últimos 50 años y estas series de estudios han demostrado que la curcumina suprime la proliferación de una amplia variedad de células tumorales, incluidos el carcinoma de mama, el carcinoma de colon, la leucemia mielógena aguda, el carcinoma basocelular, el melanoma y el carcinoma de próstata. (1-7) A pesar del notable perfil de seguridad farmacológica de este compuesto, su efectividad como agente anticancerígeno plausible se ha visto limitada por la mala absorción sistémica y metabolismo extenso con dosis administradas.

30 Se ha demostrado que un componente específico del propóleo del producto de la colmena de abejas, identificado como éster fenílico del ácido cafeico (CAPE), inhibe selectivamente el crecimiento de células de roedores transformadas por virus y transformadas por oncogén, así como células tumorales humanas, incluyendo las células de glioblastomas multiformes (GBM-18), adenocarcinoma de colon (HT-29) y melanoma (HO-1). Estos estudios también muestran que CAPE y varios ésteres adicionales de ácido cafeico inhiben las lesiones preneoplásicas de colonias inducidas por azoximetano y las actividades de ornitina descarboxilasa, tirosina proteína quinasa y lipoxigenasa asociadas con la carcinogénesis de colon. (8-13)

35 Aunque se derivan de diferentes fuentes naturales, CAPE y los curcuminoides poseen similitud estructural que probablemente puede explicar sus propiedades anticancerígenas o al menos explicar parcialmente su perfil de seguridad y selectividad. La importancia de esta similitud estructural con respecto a sus propiedades anticancerígenas es actualmente desconocida.

Un enfoque para desarrollar nuevos agentes antineoplásicos es sintetizar compuestos químicos novedosos que sean selectivos para el cáncer, estables en el medio biológico, mantengan la potencia contra el cáncer y exhiban una baja toxicidad en general.

45 Banskota et al. (*Journal of Ethnopharmacology* (2002), 80(1), 67-73) aislaron los derivados del ácido cinámico cafeato de bencilo, cafeato de fenetilo y cafeato de cinamilo, así como los compuestos de dicinamato (2E, 2'E)-2-acetoxipropano- 1, 3-diil bis (3-(4-hidroxifenil) acrilato) y (E)-2-acetoxi-3-(((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acriloil) oxi) propil 3-(4-hidroxifenil) acrilato de un extracto de MeOH de propóleos holandeses. El cafeato de bencilo, el cafeato de fenetilo y el cafeína de cinamilo mostraron valores de EC<sub>50</sub> de 2.03 μM, 3.16 μM y 1.92 μM, respectivamente, frente a B16-BL6. Los compuestos de dicinamato (2E, 2'E)-2-acetoxipropano-1,3-diil bis (3-(4-hidroxifenil) acrilato) y (E)-2-acetoxi- 3-(((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acriloil) oxi) propil 3-(4-hidroxifenil)acrilato mostró valores moderados de EC<sub>50</sub> de 81.9 μM y 66 μM, respectivamente, contra la misma línea celular.

D1=Dae Sik Jang et al. "Constituents of asparagus officinalis evaluated for inhibitory activity against cyclooxygenase-2", *J. of agricultural and food chemistry*, vol. 52, 2004, páginas 2218-2222, describe los compuestos 8 y 9, que tienen

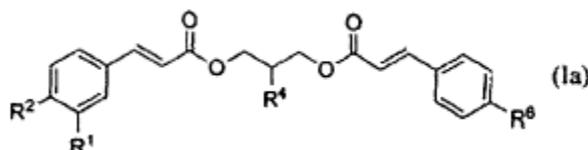
un patrón distinto de sustitución, en el que cada uno de los grupos fenilo terminales lleva un grupo OH en la posición para. Los dichos compuestos 8 y 9 se describen en el contexto de su uso en el campo medicinal como agentes quimiopreventivos del cáncer". Sin embargo, sus actividades inhibitoras contra la ciclooxigenasa-2 se han descrito como bajas (30% o 0%) o ND.

- 5 D2=XIONG Y; DENG K Z; GUO Y Q; ZHANG T J: "New chemical constituents from the rhizomes of sparganium stoloniferum" Archives of Pharmacal Research, vol. 32, no. 5, 2009, páginas 717-720 describe el compuesto (2)-Ocic-Feruloil-3-O-trans-p-coumaroilglicerol como que tiene una actividad citotóxica débil contra el crecimiento de la línea celular tumoral LA795.

Sumario de la invención

- 10 La presente invención se refiere a agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la presente invención se refiere a derivados de propano diil dicinamato para tratar el cáncer y métodos para su preparación.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el compuesto es de fórmula (Ia)



- 15 en la que:

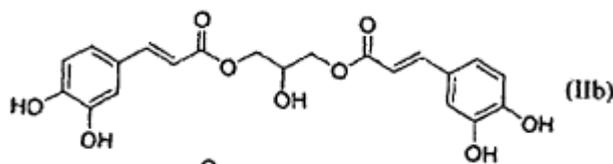
R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente OH, alcoxi o alquilcarboniloxi,

R<sup>4</sup> es OH, y

R<sup>6</sup> es H

- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (IIb) para su uso en el tratamiento del cáncer.



Breve descripción de los dibujos

- 25 Estas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Las figuras 1\* y 9\* -11\* ilustran ejemplos de esquemas sintéticos para producir compuestos de diéster.

La figura 2\* ilustra ejemplos de esquemas sintéticos para producir compuestos de diéster.

La figura 3 ilustra ejemplos de métodos para producción de derivados de cinamato de glicidilo.

- 30 La figura 4\* ilustra ejemplos de esquemas sintéticos para producir compuestos de diéster que tienen extremos simétricos.

Las figuras 5 y 6 ilustran ejemplos de esquemas sintéticos para formar derivados trisustituídos de intermedios para formar los compuestos de la presente invención.

- 35 Las figuras 7 y 8 ilustran ejemplos de esquemas sintéticos para formar derivados disustituídos de intermedios para formar los compuestos de la presente invención.

La figura 12 muestra micrografías de células de carcinoma de colon humano HCT116 a lo largo del tiempo después del tratamiento sin compuesto (control).

La figura 13 muestra micrografías de células de carcinoma de colon humano HCT116 a lo largo del tiempo después del tratamiento con compuesto (IIb) 30  $\mu$ M.

La figura 14 muestra micrografías de células de carcinoma de colon humano HCT116 a lo largo del tiempo después del tratamiento con compuesto (Ie) 30  $\mu$ M.

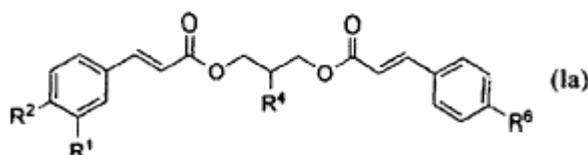
- 5 La figura 15 muestra micrografías de células de carcinoma de colon humano HCT116 a lo largo del tiempo después del tratamiento con compuesto 30 (Id)  $\mu$ M.

\* Todas las figuras marcadas con un asterisco no forman parte de la invención, pero se dejan en la descripción para comprender mejor la invención.

Descripción detallada de la invención.

- 10 La presente invención se refiere a agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la presente invención se refiere a derivados de propano diil dicinamato para tratar el cáncer y métodos para su preparación.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (Ia):



- 15 en la que:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente OH, alcoxi o alquilcarboniloxi,

R<sup>4</sup> es OH y

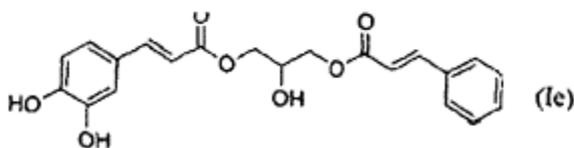
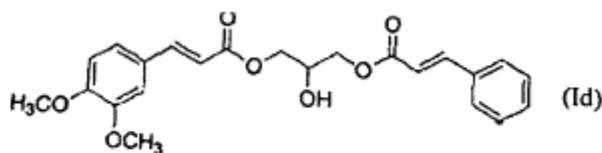
R<sup>6</sup> es H,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En un ejemplo del compuesto de fórmula (Ia) definido anteriormente, tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> son OH, alcoxi o alquilcarboniloxi.

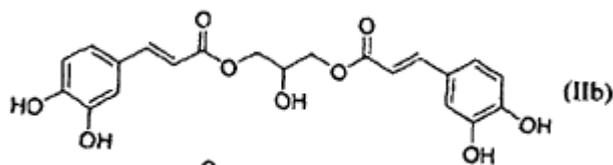
En otros ejemplos, la presente invención se refiere a los compuestos <sup>2a</sup> de fórmula (Ia) descritos anteriormente, en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos OH o ambos alcoxi.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula (Id), (Ie).



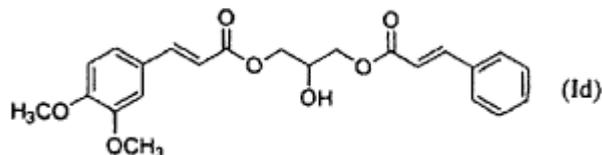
- 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un compuesto como se usa en este documento anteriormente.

- 30 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel o leucemia en el que el compuesto es de fórmula (IIb):

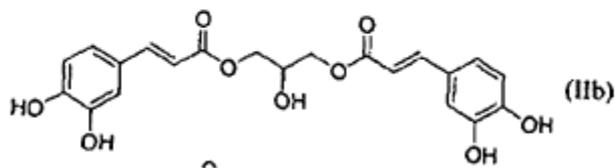
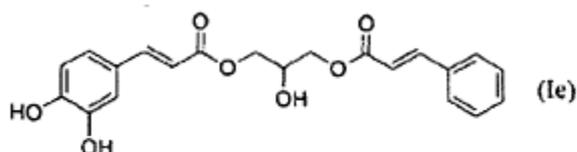


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Más particularmente, la presente invención se refiere a los usos definidos anteriormente, en los que el compuesto administrado al sujeto es de fórmula (Id), (Ie), (IIb), o una combinación de los mismos:



5



La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido anteriormente, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10 Como se usa en este documento, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada de la fórmula general  $C_nH_{2n+1}$ , tal como un grupo alquilo que tiene 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3 o 1 a 2 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo y t-butilo.

15 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la eficacia biológica y las propiedades de una base libre o ácido libre correspondiente, y que no es biológicamente ni de otro modo indeseable. La sal se puede preparar a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica a un ácido libre. Las sales derivadas de una base inorgánica incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, lisina, arginina, N-etilpiperidina, piperidina o una resina de polimina.

20

Los compuestos de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables correspondientes se pueden usar en forma de composiciones farmacéuticas para administración enteral, parenteral o tópica. Se pueden administrar, por ejemplo, peroralmente, por ejemplo, en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones, por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios, parenteralmente, por ejemplo, en forma de soluciones de inyección o suspensiones o soluciones de infusión, o por vía tópica, por ejemplo, en forma de ungüentos, cremas o aceites.

25

Los materiales de portadores apropiados no son solo materiales de portadores inorgánicos, sino también materiales de portadores orgánicos. De este modo, por ejemplo, la lactosa, el almidón de maíz o derivados del mismo, el talco, el ácido esteárico o sus sales se pueden usar como materiales de portadores para comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los materiales de portadores apropiados para las cápsulas de gelatina blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas y polioles semisólidos y líquidos (sin embargo, dependiendo de la naturaleza del ingrediente activo, podrían no requerirse portadores en el caso de las cápsulas de gelatina blanda). Materiales portadores apropiados para la producción de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua,

30

- polioles, sacarosa, azúcar invertido y similares. Materiales portadores apropiados para soluciones de inyección son, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol y aceites vegetales. Materiales portadores apropiados para supositorios son, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas y polioles semilíquidos o líquidos. Los materiales portadores apropiados para preparaciones tópicas son glicéridos, glicéridos semisintéticos y sintéticos, aceites hidrogenados, ceras líquidas, parafinas líquidas, alcoholes grasos líquidos, esteroides, polietilenglicoles y derivados de celulosa.
- Los derivados de propano diil dicinamato representados por las fórmulas generales (Ia), (IIb) definidas anteriormente son útiles para el tratamiento, profilaxis y prevención de cánceres y otras enfermedades proliferativas que incluyen, pero no se limitan a, tumores, inflamación e inmunodeficiencia humana (VIH). La actividad anticancerígena exhibida por los compuestos de la presente invención puede ser por citotoxicidad, antiproliferación, inhibición de la quinasa del ciclo celular o por diferenciación celular.
- La presente invención también se refiere a procedimientos para la preparación de compuestos definidos por las fórmulas generales (Ia), (IIb) o mezclas de los mismos, sus estereoisómeros, sus polimorfos, sus sales farmacéuticamente aceptables y sus solvatos farmacéuticamente aceptables.
- En los siguientes pasajes de texto, los párrafos marcados con un asterisco no pertenecen a la invención, sin embargo, quedan en la descripción para comprender mejor la invención.
- \* Los compuestos de fórmula general (IIb) y (IIb') se pueden formar según las rutas sintéticas descritas en las figuras 1 y 9-11. Con referencia específica a la figura 1, el diéster de 1,3 glicerol 5 (fórmula (II),  $R^4=OH$ ) se puede formar permitiendo que el derivado de ácido cinámico 1 o 2 reaccione con el derivado de cinamato de glicidilo correspondiente 3 o 4 en presencia de un catalizador de transferencia de fase (PTC). El diéster 5 se puede alquilar o acilar adicionalmente para producir el derivado diéster 6.
- \* Los compuestos de fórmula (II), donde  $R^4$  es hidrógeno, se pueden formar mediante la reticulación de los derivados de ácido cinámico 1 y 2 con el agente de reticulación 7 para producir el compuesto diéster 8. Acilación parcial o completa posterior del diéster 8 con un agente de acilación, tal como  $RC(O)L$ , proporciona el derivado de diéster acilado 17.
- \* Como se ilustra en la figura 2, los compuestos de fórmula (II') se pueden producir por esterificación del derivado de ácido cinámico 9 o 10 con el correspondiente derivado de cinamato de glicidilo 3 o 4 en presencia de un catalizador de transferencia de fase (PTC) para proporcionar el derivado diéster de 1,2 glicerol 13, que se puede alquilar o acilar adicionalmente para producir el diéster 14.
- \* Los compuestos de fórmula (II'), donde  $R^4$  es hidrógeno, se pueden formar mediante la reticulación de los derivados del ácido cinámico 1 y 2 con el agente de reticulación 15 para producir el compuesto diéster 16. Acilación parcial o completa posterior del diéster 8 con un agente de acilación, tal como  $RC(O)L$ , proporciona el derivado de diéster acilado 18.
- \* Los ejemplos de catalizadores de transferencia de fase que se pueden usar para formar los compuestos de diéster 5 y 13 incluyen bromuro de tetrabutilamonio o cloruro de tetrabutilamonio. Las reacciones ilustradas para formar los diésteres 5, 6, 8, 13, 14 y 16-18 se llevan a cabo en un disolvente inerte apropiado, tal como dioxano, y se llevan a cabo a una temperatura de reacción de 60-120 °C o 100-105 °C.
- \* Los ejemplos de los grupos salientes que se pueden usar en los compuestos 7 y 15 incluyen, sin limitación, un halógeno, tal como Cl, Br o yodo, metanosulfonilo, fenilsulfonilo, p-tosilo, metanosulfonilo, acetoxi o benzoilo.
- \* Los compuestos de cinamato de glicidilo intermedios 3 y 4 se pueden producir mediante una reacción de sustitución que implica los derivados de cinamato correspondientes 1 o 2 y una cantidad molar en exceso de epiclohidrina u otra epihalohidrina apropiada (Figura 3). La reacción se lleva a cabo en un disolvente inerte apropiado, tal como dioxano, y opcionalmente en presencia de un catalizador a una temperatura de reacción de aproximadamente 50-100 °C o 70-95 °C, durante aproximadamente 12 a 18 horas.
- Cuando los sustituyentes  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son los mismos que los sustituyentes  $R^7$ ,  $R^6$  y  $R^5$ , respectivamente, los compuestos de fórmula general (II) se pueden preparar en una reacción que implica un derivado de haluro de cinamilo 9 y cantidades estequiométricas de glicerol en presencia de una amina terciaria, tal como la piridina, para producir el diéster de 1,3 glicerol simétrico 5, que se puede alquilar o esterificar adicionalmente para proporcionar el compuesto 6 protegido (Figura 4).
- \* Para preparar los compuestos de fórmula general (II'), donde la variable  $R^4$  es H, y las variables  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  son equivalentes a  $R^7$ ,  $R^6$  y  $R^5$ , respectivamente, el derivado de haluro de cinamilo 9 puede reaccionar con metilglicol en presencia de una cantidad catalítica de piridina para producir el compuesto diéster 16.
- \* El derivado de haluro de cinamilo 9 o 10 se puede preparar haciendo reaccionar el derivado correspondiente de ácido cinámico con un haluro de tionilo, tal como cloruro de tionilo, en un disolvente apropiado, tal como dioxano, a temperatura ambiente durante aproximadamente 15-20 minutos.

- 5 \* Las reacciones para formar derivados de diéster 5, 8, 13 y 16 se llevan a cabo por lo general en presencia de piridina y se dejan reaccionar durante aproximadamente 20-30 minutos. Una vez completadas las reacciones, la mezcla de reacción se neutraliza con bicarbonato de sodio u otro agente neutralizante apropiado. Luego se filtra la mezcla de reacción y se aísla el compuesto final secando la capa orgánica a presión reducida seguido de cristalización en acetato de etilo o una mezcla de acetato de etilo y ciclohexano.
- 10 \* Las figuras 5 y 6 ilustran ejemplos de esquemas sintéticos para producir diferentes derivados trisustituidos de los ácidos cinámicos 1 y 2. Cada uno de estos esquemas implica inicialmente la esterificación del ácido gálico 20 para producir el galato de metilo 21, que se bencila selectivamente en la posición para, para producir el derivado protegido 22. La alquilación del derivado 22 con dos equivalentes de un haluro de alquilo RX proporciona el éster dialquilado 23, que posteriormente se somete a hidrogenólisis para producir el derivado fenólico 24. Reducción del fenol 24 con hidruro de litio y aluminio (LAH) después por oxidación parcial del alcohol alquílico resultante con clorocromato de piridinio (PCC) da como resultado la formación de aldehído 25, que se deja reaccionar con ácido malónico y piperidina en piridina para producir el derivado de ácido cinámico 26.
- 15 Como alternativa, el galato de metilo 21 se puede reducir directamente y el alcohol metileno resultante se oxida parcialmente con PCC para proporcionar el aldehído 27, que posteriormente se deja reaccionar con ácido malónico y piperidina en piridina para producir el derivado de ácido cinámico 26.
- 20 En otro ejemplo, la alquilación del derivado 22 con un equivalente de un haluro de alquilo RX proporciona el éster monolquilado 29, que posteriormente se somete a hidrogenólisis para eliminar el grupo protector de bencilo. El fenol resultante se reduce luego con LAH para producir un alcohol metileno que se oxida parcialmente con PCC para formar aldehído 30, que se deja reaccionar con ácido malónico y piperidina en piridina para producir el derivado de ácido cinámico 31.
- 25 \* La figura 6 ilustra ejemplos de esquemas sintéticos para producir derivados mono, di y trialquilados de ácido cinámico trihidroxilado (34, 37 y 40). Los esquemas sintéticos implican la reacción inicial de galato de metilo 21 con 1, 2 o 3 eq. de un haluro de alquilo RX en presencia de yoduro de tetrabutilamonio y  $K_2CO_3$  para producir el éster monoalquilado 32, el éster dialquilado 35 y el éster trialquilado 38, respectivamente. Estos ésteres se reducen posteriormente con LAH para producir alcoholes respectivos que se oxidan parcialmente con PCC para formar aldehídos 33, 36 y 39, respectivamente, que posteriormente se les permite reaccionar con ácido malónico y piperidina en piridina para producir los derivados de ácido cinámico alquilados 34, 37 y 40, respectivamente.
- 30 \* La figura 7 ilustra ejemplos de esquemas sintéticos para producir derivados mono y dialquilados de ácido cinámico dihidroxilado (44, 46 y 50). El ácido cafeico 41 se esterifica primero en MeOH para producir el éster metílico del ácido cafeico 42, que luego reacciona con 1 o 2 eq. de un agente alquilante RX en presencia de TBAI y  $K_2CO_3$  para producir el intermedio monoalquilado 43 o el intermedio dialquilado 45. Los ésteres 43 y 45 luego se hidrolizan en condiciones básicas para producir los ácidos correspondientes 44 y 46, respectivamente.
- 35 Para producir un derivado de ácido cafeico que tiene un grupo alcoxi en la posición 3 del anillo de benceno, el éster 42 se protege primero con 1 eq. de un haluro de benzoilo para proporcionar el derivado protegido 47 que tiene un grupo benzoiloxi en la posición para del anillo de fenilo, que posteriormente se hace reaccionar con 1 eq. de un haluro de alquilo para producir el derivado monoalquilado 48. La desprotección del derivado 48 da como resultado la producción del éster 49 que tiene un grupo hidroxilo libre en la posición para del anillo de fenilo y un grupo alcoxi en la posición 3 del anillo de fenilo. Finalmente, la hidrólisis del éster 49 en condiciones básicas produce ácido carboxílico
- 40 50.
- 45 \* La figura 8 ilustra ejemplos de esquemas sintéticos para producir derivados alquilados de ácido 3,5-dihidroxicinámico. En los esquemas sintéticos ilustrados, el ácido 3, 5-dihidroxicinámico 51 se esterifica primero en MeOH para producir el éster metílico del ácido 3,5-dihidroxicinámico 52, que luego se hace reaccionar con 1 o 2 eq. de un agente alquilante RX en presencia de TBAI y  $K_2CO_3$  para producir el intermedio monoalquilado 53 o el intermedio dialquilado 55. Los ésteres 53 y 55 se hidrolizan luego en condiciones básicas para producir los ácidos 54 y 56 correspondientes, respectivamente.
- 50 De manera similar, el derivado monolalquilado del ácido m- o p-cumarico se puede producir esterificando el ácido cumarico en MeOH para producir éster metílico del ácido cumarico, que luego se hace reaccionar con un agente alquilante para producir un producto intermedio monoalquilado. Este intermedio se hidroliza posteriormente en condiciones básicas para producir el derivado alquilado correspondiente del ácido m- o p-cumarico.
- 55 \* Las figuras 9-11 ilustran ejemplos de esquemas sintéticos para formar diferentes derivados protegidos de los diésteres 5 y 13. Con referencia a la figura 9, se muestra un ejemplo de un esquema sintético para formar derivados de diésteres que tienen residuos fenólicos acilados, que implica primero la protección del grupo hidroxilo secundario del diéster 5 con un grupo tert-butildimetilsililo (TBS) para formar el TBS-éter 60 y luego acilando los grupos hidroxilo fenólicos libres con un agente acilante, tal como un haluro de acilo, para formar el derivado acilado protegido 61. El grupo TBS luego se elimina con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) para producir el alcohol 62, que luego se puede alquilar adicionalmente para proporcionar el alquil éter 63 acilado.

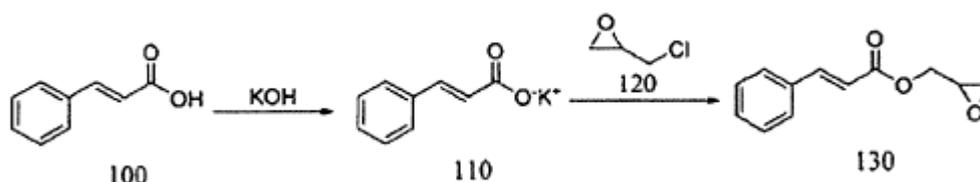
\* En otro ejemplo ilustrado en la figura 10, los grupos hidroxilo fenólicos del éter TBS 60 se acilan parcialmente para formar el éter TBS 61a que tiene uno o más grupos hidroxilo fenólicos libres. Después de la desprotección del éter TBS 61a con TBAF, los grupos hidroxilo fenólicos del alcohol resultante 62a se protegen selectivamente con tritil-Cl para formar el derivado tritilado 62b que tiene un grupo hidroxilo secundario libre. El alcohol 62b entonces se puede alquilar adicionalmente para proporcionar el alquiléter parcialmente acilado 63a.

\* En otros ejemplos ilustrados en la figura 11, los grupos hidroxilo fenólicos libres y el grupo alcohol secundario del diéster 5 se pueden acilar usando un exceso de un agente acilante, tal como un haluro de acilo. Alternativamente, los grupos hidroxilo fenólicos del diéster 5 se pueden proteger selectivamente con tritil-Cl para formar el derivado tritilado 70 que tiene un grupo hidroxilo secundario libre. La posterior alquilación o acilación del alcohol 70 seguido de la desprotección de los grupos hidroxilo fenólicos da como resultado un derivado alquilado o acilado 72.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar la invención:

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de cinamato de glicidilo (130)



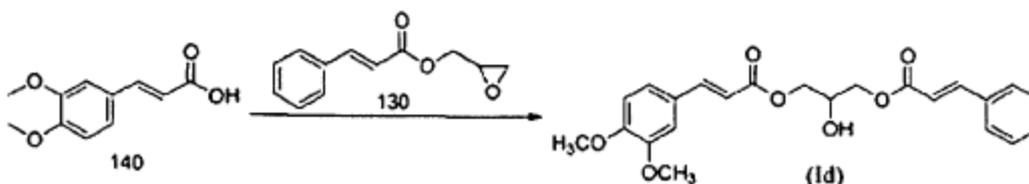
A 5.66 g (0.10 mol) de hidróxido de potasio disuelto en 50 mL de agua desionizada y calentado a 50°-60 °C se agregaron 15 g (0.10 mol) de ácido cinámico (100) con agitación. La lechada de reacción resultante se secó en un horno de vacío a 40-50 °C para producir cinamato de potasio (110).

Método alternativo para producir cinamato de potasio (110)

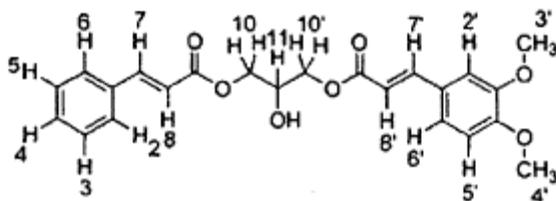
A una solución de ácido cinámico (100, 15 g, 0.10 mol) en THF (150 mL) a aproximadamente 30 °C, se agregaron 5.66 g (0.10 mol) de un polvo de pellas de hidróxido de potasio recién molido para producir un blanco precipitado de cinamato de potasio (110). El precipitado se filtró y se secó en un horno de vacío a 40-50 °C.

Se agregaron cinamato de potasio (110; 5.3 g; 0.028 mol) y una cantidad catalítica (0.85 g; 2.7 mmol) de bromuro de tetrabutilamonio a 50 g (0.54 mol) de epichlorohidrina (120) en un recipiente de reacción equipado con un agitador mecánico y un conjunto de reflujo y calentado a 95 °-105 °C para formar una mezcla que se dejó reaccionar durante 60 minutos. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente, se diluyó con 55 mL de cloroformo y se filtró para eliminar precipitados sólidos. El filtrado orgánico se lavó secuencialmente con 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 5% y agua desionizada y la capa orgánica resultante se destiló a presión reducida a 30 °-40 °C para producir cinamato de glicidilo (130).

Ejemplo 2: Preparación de (E)-3-(cinamoiloxi)-2-hidroxi-1-propano 3-(3, 4-dimetoxifenil) acrilato (Id)

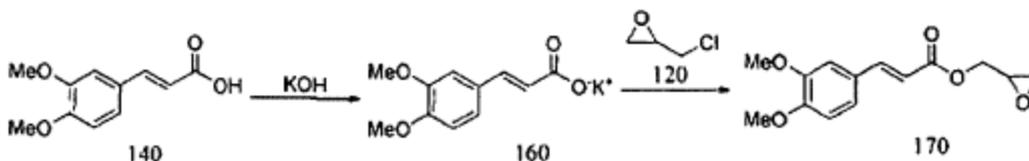


Se disolvió ácido 3,4-dimetoxicinámico (140; 3.82 g; 18.37 mol) en 60 mL de dioxano y se calentó a reflujo (60 ° -70 °C). Una cantidad catalítica (22.5 mg; 0.7 mmol) de bromuro de tetrabutilamonio y 1.5 g (7.35 mmol) de cinamato de glicidilo (130) se agregaron consecutivamente a la solución de ácido 3,4-dimetoxicinámico (140). La mezcla resultante se calentó a 100 ° -105 °C con agitación continua durante 15-16 h y luego se destiló a presión reducida para producir el compuesto (Id). <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ 3.81 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.27 (d, 4H, J = 8 Hz), 6.42 (d, 1H, J = 16 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 16 Hz), 7.15 (dd, 1H, J = 8 Hz, 2 Hz), 6.92 (d, 1H, J = 8 Hz), 7.18 (d, 1H, J = 2 Hz), 6.53 (d, 1H, J = 16 Hz), 7.70 (d, 1H, J = 16 Hz), 7.35 (m, 3H), 7.56 (m, 2H)



Protón	Desplazamiento químico
2,6	7.56
3,5	7.35
4	7.35
7	7.70
8	6.53
2'	7.18
5'	6.92
6'	7.15
7'	7.64
8'	6.42
10, 10'	4.27
11	4.14
OCH3	3.83
OCH3	3.81

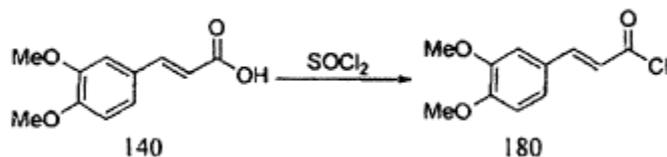
Ejemplo 3: Preparación de (E)-oxiran-2-ilmetil 3-(3,4-dimetoxifenil) (170)



5 A 5.0 g (0.024 mol) de hidróxido de potasio disuelto en 30 mL de agua desionizada y calentado a 50 ° -60 °C se agregaron 1.34 g (0.024 mol) de ácido 3,4-dimetoxicinámico (140) con agitación. La lechada de reacción resultante se secó en un horno de vacío a 40-50 °C para producir 3,4-dimetoxicinamato de potasio (160).

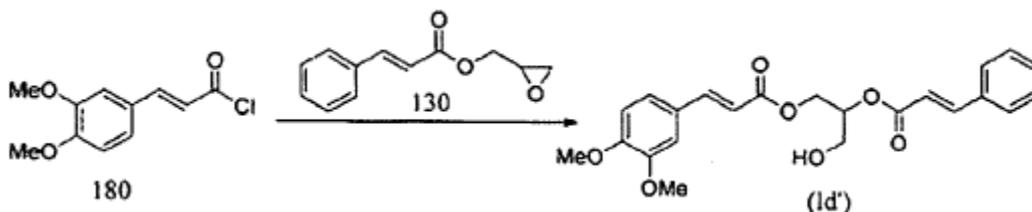
10 Se agregaron 3,4-dimetoxicinamato de potasio (160; 11.83 g; 0.048 mol) y 0.772 g (0.0024 mol) de bromuro de tetrabutilamonio a 55,32 g (0,60 mol) de epiclorhidrina (120) en un recipiente de reacción equipado con un agitador mecánico y un conjunto de reflujo para formar una mezcla que se dejó reaccionar durante 60 minutos y se calentó a 80 ° -90 °C. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente, se filtró para eliminar el precipitado sólido y se secó al vacío para producir el compuesto 170.

Ejemplo 4: Preparación de cloruro de (E)-3-(3,4-dimetoxifenil) acrililo (180)



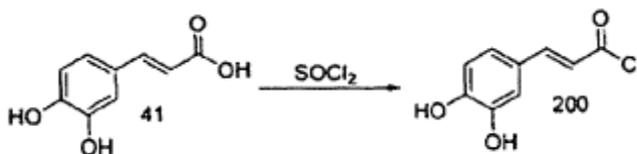
5 A 5 mL de cloruro de tionilo seco ( $\text{SOCl}_2$ ) contenidos en un recipiente de reacción se le agregaron lentamente 4 g (19 mmol) de ácido 3,4-dimetoxicinámico (140) y 50  $\mu\text{l}$  de N,N'-dimetilformamida seca. Los contenidos del recipiente de reacción se mezclaron continuamente a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, y el producto resultante se secó al vacío a 30-40 °C para producir cloruro de (E)-3-(3,4-dimetoxifenil) acrililo (180).

Ejemplo 5: Preparación de (E)-2-(cinamoiloxi)-3-hidroxiopropil 3-(3,4-dimetoxifenil) acrilato (Id')



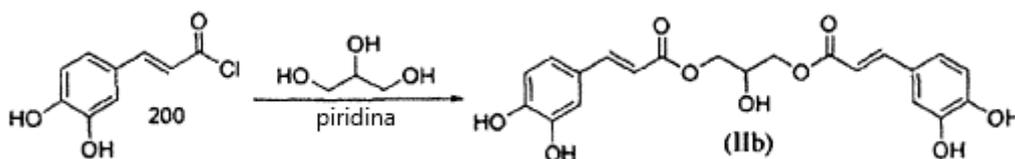
10 A cloruro de 3,4-dimetoxicinamoilo (180; 2.5 g; 11 mmol) disuelto en 20 mL de dioxano se le agregó una cantidad catalítica (250 mg) de bromuro de tetrabutilamonio y 1.33 g (6.5 mmol) de cinamato de glicidilo (130). La mezcla resultante se calentó a reflujo (90 ° -95 °C), con agitación continua durante 16-17 h y luego se destila a presión reducida para producir el compuesto (Id').

Ejemplo 6: Preparación de cloruro de cafeoilo (200)



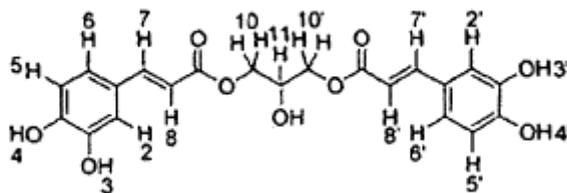
15 Se disolvieron 500 mg (2.78 mmol) de ácido cafeico (190) en 12 mL de dioxano seco a temperatura ambiente y luego se agregaron lentamente 600  $\mu\text{E}$  de  $\text{SOCl}_2$  (cloruro de tionilo) mezclando durante aproximadamente 20 minutos para producir una mezcla de reacción. que contiene cloruro de cafeoilo (200).

Ejemplo 7: Preparación de (2E, 2'E)-2-hidroxiopropano-1,3-diil bis (3-(3, 4-dihroxifenil) acrilato (IIb)



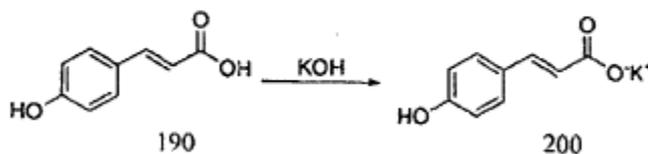
20 A la mezcla de reacción cruda del ejemplo 6 se le agregaron 248 mg (1.39 mmol) de glicerol anhidro y una cantidad catalítica (300  $\mu\text{L}$ ) de piridina. La mezcla se agitó durante 30-40 minutos, y luego se agregaron aproximadamente 1.0 g de  $\text{NaHCO}_3$  y 10 mL de una mezcla de metanol-acetato de etilo (50:50). Después de aproximadamente 30 minutos de agitación adicional a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el disolvente se eliminó. La mezcla de reacción se secó luego a presión reducida a aproximadamente 60 °C. El material seco se disolvió en 50 mL de acetato de etilo y se lavó tres veces con 100 mL de formiato de amonio, pH 3.7. La capa orgánica lavada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y luego a presión reducida para obtener el compuesto (IIb).

25 El compuesto (IIb) se recristalizó luego en una mezcla de acetato de etilo y ciclohexano (1: 3).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) d 4.15 (m, 1H), 4.27 (m, 4H), 6.32 (d, 2H, d = 16 Hz), 7.60 (d, 2H, J = 16 Hz), 6.95 (dd, 2H, J = 8, 2 Hz), 6.77 (d, 2H, d = 8 Hz), 7.05 (d, 2H, J = 2 Hz)



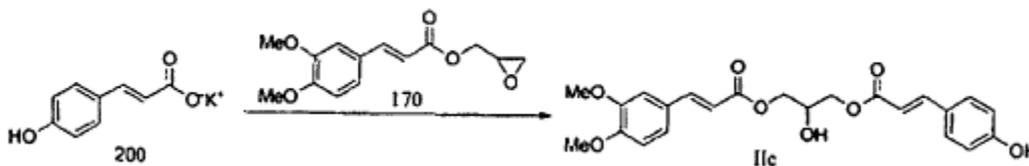
Protón	Desplazamiento químico
2, 2'	7.05
5, 5'	6.77
6, 6'	6.95
7, 7'	7.60
8, 8'	6.32
10, 10'	4.27
11	4.15

Ejemplo 8 \*: Preparación de 3-(4-hidroxifenil) acrilato de potasio (200)



- 5 A 15 mL de una solución acuosa de hidróxido de potasio 0.002 mM se le agregaron lentamente 5 g de ácido cumárico 190 (30 mmol) con mezcla a 60-70 °C. El cumarato de potasio resultante (200) se secó al vacío a 30-40 °C.

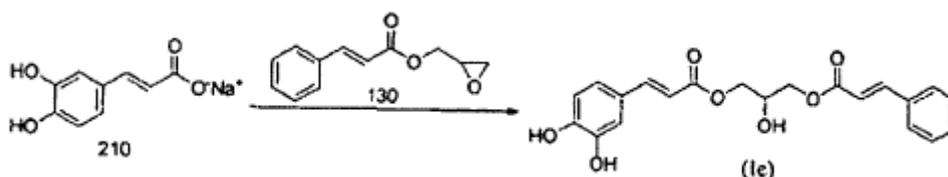
Ejemplo 9 \*: Preparación de (E)-3-((E)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilato)-2-hidroxi-1-propil 3-(4-hidroxifenil) acrilato (Ile)



\* que no forma parte de la invención, pero se deja en la descripción para comprender mejor la invención.

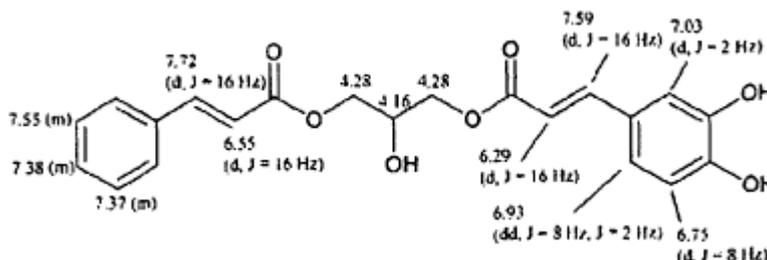
- 10 A una solución de 1.5 g (5.68 mmol) de acrilato de oxiran-2-ilmetil 3-(3,4-dimetoxifenil) (170) disuelto en 30 mL de dioxano seco se le agregaron 2.29 g (1 1.36 mmol) de cumarato de potasio (200) disuelto en 20 mL de dioxano y 100 mg de bromuro de tetrabutilamonio, y la mezcla resultante se calentó a una temperatura de 105-110 °C, durante 16-18 horas para producir diéster (Ile).

Ejemplo 10. Preparación de (E)-3-(cinamoiloxi)-2-hidroxi-1-propil 3-(3,4-dihidroxifenil) acrilato (Ie)



El ácido cafeico (41; 18.02 g; 0.10 mol) se disolvió en THF (180 mL) con agitación a aproximadamente 30 °C para producir una solución al 10%. Se agregó un polvo de gránulos de hidróxido de sodio recién molido (4.00 g; 0.10 mol) a la solución de ácido cafeico y se formó un precipitado sólido de cafeato de sodio (210), que se filtró y se secó a presión reducida.

A una solución de cafeato de sodio (210; 7.35 mmol) en DMSO (20 mL) a 60 ° -70 °C se le agregó cinamato de glicidilo (130; 7.35 mmol). La mezcla resultante se calentó a 60-75 °C con agitación continua durante 22-24 h y luego se destiló a presión reducida para producir el compuesto (Ie). <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) 8 4.16 (s, 1H), 2.28 (s, 4H), 6.29 (d, 1H, J = 16 Hz), 6.65 (d, 1H, J = 16 Hz), 6.75 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.93 (1H, dd, J = 8, 2 Hz), 7.03 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.37 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.55 (m), 7.59 (d, 1H, J = 16 Hz), 7.72 (d, 1H, J = 16 Hz).



Actividad anticancerígena

Los compuestos preparados en la presente invención exhibieron una buena actividad anticancerígena *in vitro* hacia las líneas celulares de melanoma B-16 humano. Las líneas celulares se mantuvieron en medio EMEM suplementado con FCS al 10%, bicarbonato de sodio al 0.1% y glutamina 12 mM. En un procedimiento típico, se sembraron 1 x 10<sup>4</sup> células en cada una de las placas de 96 pocillos en 90 volúmenes de medio. Las placas se incubaron durante 24 h en presencia de CO<sub>2</sub> para permitir la unión celular. Después de 24 h, los compuestos de prueba se evaluaron a cinco diluciones de 10 veces de 1 :10, 1 :100, 1 :1000, 1 :10000 y 1 :100000. A cada pocillo de prueba se agregaron 100 µL de solución del compuesto de prueba y se agregó el medio con vehículo a los pocillos de control y las placas se incubaron adicionalmente. Después de 24 h de incubación, se agregaron 10 µL de [3H]-timidina a cada pocillo para obtener una concentración de 1 µCi por pocillo y se incubó durante 24 h más. Las placas se terminaron, las células se cosecharon y se leyeron mediante un lector de placas de microbeta. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de EC<sub>50</sub> de los compuestos de la presente invención en la línea celular de melanoma B-16, µM

Compuesto	EC <sub>50</sub> (mM)
	1.08
	6.12

Ensayo MTT (proliferación y viabilidad celular) para compuestos anticancerígenos de la presente invención

Las líneas celulares de fibroblastos humanos normales (GM9503 y GM8399) y las líneas celulares de carcinoma humano MCF-7, A549, HCT116, SKOV-3 y PC-3 se mantuvieron en DMEM (medio esencial modificado de Dulbecco)

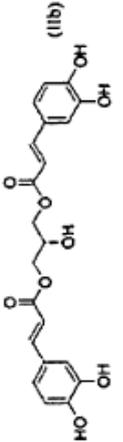
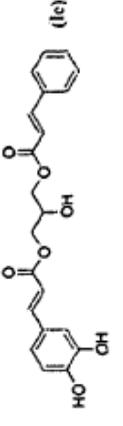
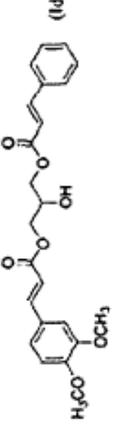
suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino). Además, las células de leucemia murina MDAY-D2 se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 5%. Todos los medios se suplementaron con 100 unidades/mL de estreptomina y 100 µg/mL de penicilina (todos de Hyclone, Logan, UT). Las células se incubaron en una atmósfera de aire humidificado que contenía 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

- 5 El crecimiento y la viabilidad celular se midieron usando el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). El reactivo MTT (Sigma, St. Louis, MO) se preparó a 5 mg/ml en ddH<sub>2</sub>O (solución 5X), se esterilizó por filtración y se almacenó en la oscuridad a -20 °C.

- 10 Para determinar el número óptimo de células para sembrar por pocillo, se llevaron a cabo experimentos preliminares que examinan el aumento de la densidad celular en placas de 96 pocillos. Las células se sembraron a diversas densidades y se examinaron bajo el microscopio después de 96 h. En base a estos experimentos y análisis de curvas de crecimiento, se seleccionaron densidades celulares óptimas para cada línea celular. En resumen, se cosecharon células de crecimiento exponencial y 100 µL de suspensión celular que contenía aproximadamente 2000 células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación para permitir la unión celular, las células se trataron con concentraciones variables de muestras de prueba en medio (60 µL/pocillo) suplementado con FBS al 5% y se incubaron durante 72 horas a 37 °C bajo CO<sub>2</sub> al 5%. Tres horas después de la adición de MTT, la cantidad de formazán formado se midió espectrofotométricamente a 570 nm con un lector de placas Spectramax Plus 384.

- 20 Para evaluar los efectos de los nuevos compuestos sobre el crecimiento y la viabilidad, GM9503 (células normales de fibroblastos humanos;  $2.08 \times 10^3$  células/pocillo), GM8399 (células normales de fibroblastos humanos;  $2.04 \times 10^3$  células/pocillo), A549 (células de carcinoma de pulmón humano;  $2.05 \times 10^3$  células/pocillo), HCT116 (células de carcinoma de colon humano;  $2.19 \times 10^3$  células/pocillo), MCF-7 (células de carcinoma de mama humano;  $2.19 \times 10^3$  células/pocillo), SKOV-3 (células de carcinoma de ovario humano ;  $2.10 \times 10^3$  células/pocillo), PC-3 (células de carcinoma de próstata humano;  $2.08 \times 10^3$  células/pocillo) y MDAY-D2 (células de leucemia murina;  $2.5 \times 10^3$  células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos en medio suplementado. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se trataron con ya sea DMEM suplementado con FBS al 5% (como control) o con compuestos (IIb), (Ie) y (Id) en concentraciones crecientes. Después de la incubación durante 72 h, se midió el crecimiento celular y la viabilidad. Cada compuesto se probó por triplicado y los datos que se muestran en las tablas 2-4 representan la media de células viables en comparación con el control del medio.

Tabla 2. Inhibición *in vitro* de células de carcinoma, EC<sub>50</sub> comparativa (μM)

Compuesto	Humano (EC <sub>50</sub> ) μM					Murina (EC <sub>50</sub> ) μM
	MCF-7 (carcinoma de mama)	A549 (carcinoma de pulmón)	HCT116 (carcinoma de colon)	GM9503 (Fibroblastos normales de la piel)	MDAY-D2 (leucemia)	
 (11b)	1.0	2.17	NE*	57.9	3.4	
 (11c)	25.9	0.64	59.2	NE*	1.5	
 (11d)	72.2	0.59	102.5	NE*	5.0	
DMSO	NE*	NF*	NE*	20.3	43.6	

\* NE (sin efecto inhibitor significativo)

Tabla 3. Inhibición *in vitro* de células de carcinoma, IC<sub>50</sub> comparativa (μM)

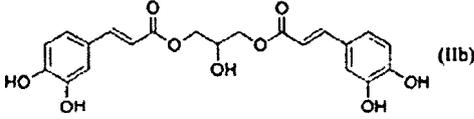
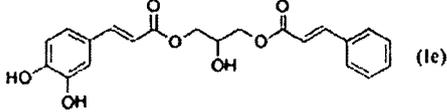
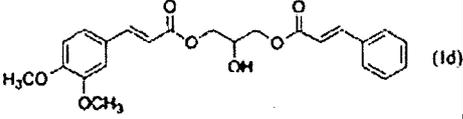
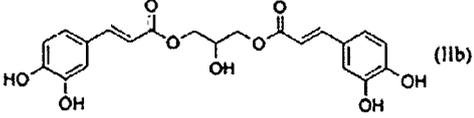
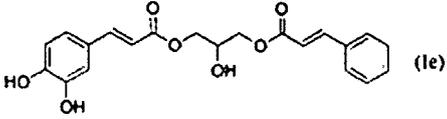
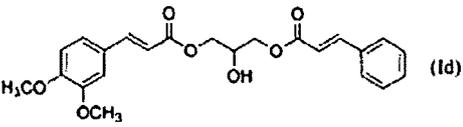
Compuesto	Concentración de inhibición de compuestos contra el cáncer (IC <sub>50</sub> ) μM en líneas celulares de carcinoma humano				
	A549 (Pulmón)	MCF-7 (Mama)	HCT116 (Colon)	PC-3 (Próstata)	SKOV-3 (Ovarios)
paclitaxel	0.69	11.7	0.59	1.32	0.75
 (IIb)	21.04	74.46	26.98	6.76	15.78
 (Ie)	33.2	33.02	27.88	9.04	16.52
 (Id)	18.18	85.15	11.49	9.07	22.01

Tabla 4. Toxicidad comparativa de compuestos de la presente invención en células normales de fibroblastos humanos *in vitro* (IC<sub>50</sub>, μM)

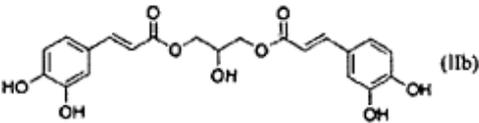
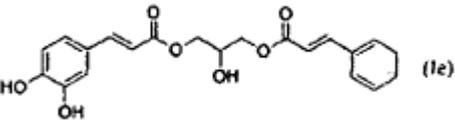
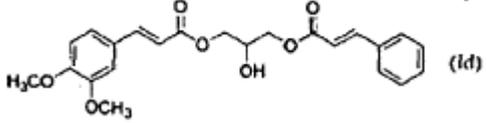
Compuesto	Concentración de inhibición (IC <sub>50</sub> ) μM	
	GM9503 (fibroblastos humanos normales)	GM8399 (fibroblasto humano no interno)
paclitaxel	0.7	2.1
Ácido cafeico	22.0	24.0
 (IIb)	71.2	38
 (Ie)	37.0	23

 (Id)	60.0	16
---	------	----

Como se muestra anteriormente en la tabla 4, en líneas celulares de fibroblastos humanos normales, el paclitaxel y el ácido cafeico son más tóxicos que los compuestos (Iib), (Ie) y (Id).

5 El índice terapéutico para un compuesto anticancerígeno compara la toxicidad del compuesto en una célula normal con un efecto antiproliferativo en las células de carcinoma. El índice es una medida de la seguridad del compuesto anticancerígeno. La proporción de un valor IC<sub>50</sub> en una célula humana normal (por ejemplo, una célula GM9503 de fibroblastos humanos) a un valor IC<sub>50</sub> en una línea celular de carcinoma humano para un compuesto anticancerígeno particular proporciona información comparativa sobre la seguridad y selectividad del compuesto anticancerígeno. Los valores del índice terapéutico que se muestran en la tabla 5 demuestran que los compuestos anticancerígenos (Ib), (Ie) y (Id) poseen un índice terapéutico mayor y, por lo tanto, son menos tóxicos en comparación con el paclitaxel (un fármaco anticancerígeno aprobado). Estos resultados son significativos ya que una terapia anticancerígena exitosa no solo debe demostrar la citotoxicidad antitumoral sino también mostrar una toxicidad tolerable con respecto a las células sanas normales.

Tabla 5. Valores del índice terapéutico (seguridad) \* de compuestos anticancerígenos de la presente invención

Compuesto	A549 (Pulmón)	MCF-7 (Mama)	HCT116 (Colon)	PC-3 (Próstata)	SKOV-3 (Ovarios)
Taxol (Control)	1.01	0.06	1.18	0.53	0.93
 (Iib)	3.38	0.95	2.63	10.52	4.51
 (Ie)	1.12	1.13	1.34	4.14	2.26
 (Id)	3.31	0.70	5.25	6.64	2.74
* Índice terapéutico = toxicidad (fibroblastos)/inhibición anticancerígena=IC <sub>50</sub> (GM9503)/IC <sub>50</sub> (línea celular de carcinoma)					

15

Mecanismo de acción

La línea celular de carcinoma de colon humano HCT116 se trató con los compuestos (Iib), (Ie) y (Id) y se observó durante un período de tiempo para determinar el mecanismo de muerte celular. El experimento se realizó de la siguiente manera:

Se sembraron y trataron células HCT116 con cada compuesto. En cada punto de tiempo, se tomaron imágenes de las células usando un microscopio neutro con un aumento de 63X antes de la fijación. Los puntos de tiempo fueron 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas.

5 Las células tratadas con los compuestos (IIb), (Ie) y (Id) exhibieron la morfología característica de formación de ampollas en la membrana comúnmente vista durante la apoptosis (véanse las figuras 12-15). El compuesto (IIb) parecía ser el más agresivo, seguido del compuesto (Ie) y el compuesto (Id). A las 4 h, unas pocas células en cada pocillo mostraron ampollas de membrana y la mayoría de la población celular inicial parecía estar experimentando apoptosis en los puntos de tiempo de 6 y 8 h. En los puntos de tiempo de 10 y 12 horas, se observaron significativamente menos células vivas en comparación con los puntos de tiempo de 2 y 4 horas, sin embargo, la población celular pareció aumentar ligeramente a las 16 horas. Potencialmente, esto puede ser causado por una población que se duplica en este momento.

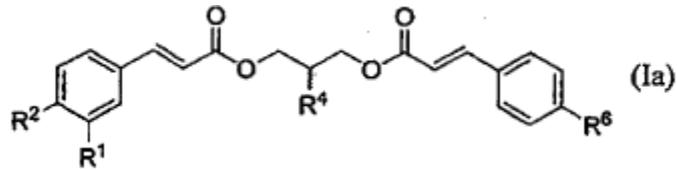
#### Referencias

- (1) Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ and Lin JK: Curcumin induces apoptosis in immortalized N1H 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* 26: 111-20, 1996.
- 15 (2) Kuo ML, Huang TS and Lin JK: Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1317: 95-100, 1996.
- (3) Mehta K, Pantazis P, McQueen T and Aggarwal BB: Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 8: 470-81, 1997.
- 20 (4) Samaha HS, Kelloff GJ, Steele V, Rao CV and Reddy BS: Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res* 57: 1301-5, 1997.
- (5) Simon A, Allais DP, Duroux JL, Basly JP, Durand-Fontanier S and Delage C: Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure- activity relationships. *Cancer Lett* 129:111-6, 1998.
- 25 (6) Jee SH, Shen SC, Tseng CR, Chiu HC and Kuo ML: Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 111: 656-61, 1998.
- (7) Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P and Aggarwal BB: Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 20: 7597-609, 2001.
- 30 (8) Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. H., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V., and Nakanishi, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 44: 230-232, 1988.
- (9) Su, Z-Z., Grunberger, D., and Fisher. P. B. Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Mol. Carcinogenesis*. 4: 231-242, 1991.
- 35 (10) Guarini. L., Su. Z-z., Zucker, S., Lin, J., Grunberger, D.. and Fisher. P. B. Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Cell. Mol. Biol.*, 38:513-527, 1992.
- (11) Rao, C. V., Desai, D., Kaul, B., Amin, S., and Reddy, B. S. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem.-Biol. Interact.*, 84: 277-290, 1992.
- 40 (12) Rao, C. V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S., and Reddy, B. S. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.* 53: 4182-4188. 1993.
- (13) Frankel. K., Wei, H., Bhimani, R., Zadunaisky, J. A., Ferrara, T., Huang, M. T., Conney, A. H., and Grunberger, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.*, 53:1255-1261, 1993.

45

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el compuesto es de fórmula (Ia):



en la que:

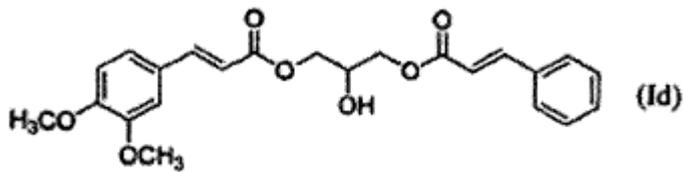
5 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente OH, alcoxi o alquilcarboniloxi,

R<sup>4</sup> es OH y

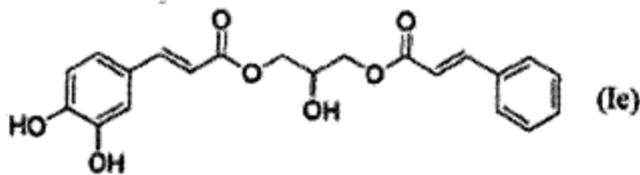
R<sup>6</sup> es H,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. Un compuesto según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el compuesto es al menos un compuesto de fórmula:

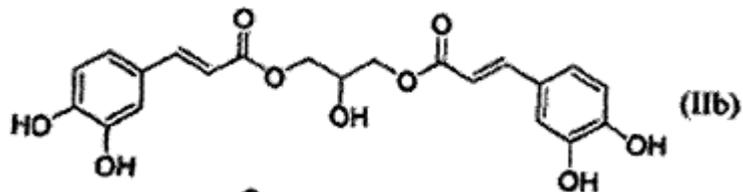


y



15 3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un compuesto como se usa en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

4. Un compuesto de fórmula (IIb) para su uso en el tratamiento del cáncer:



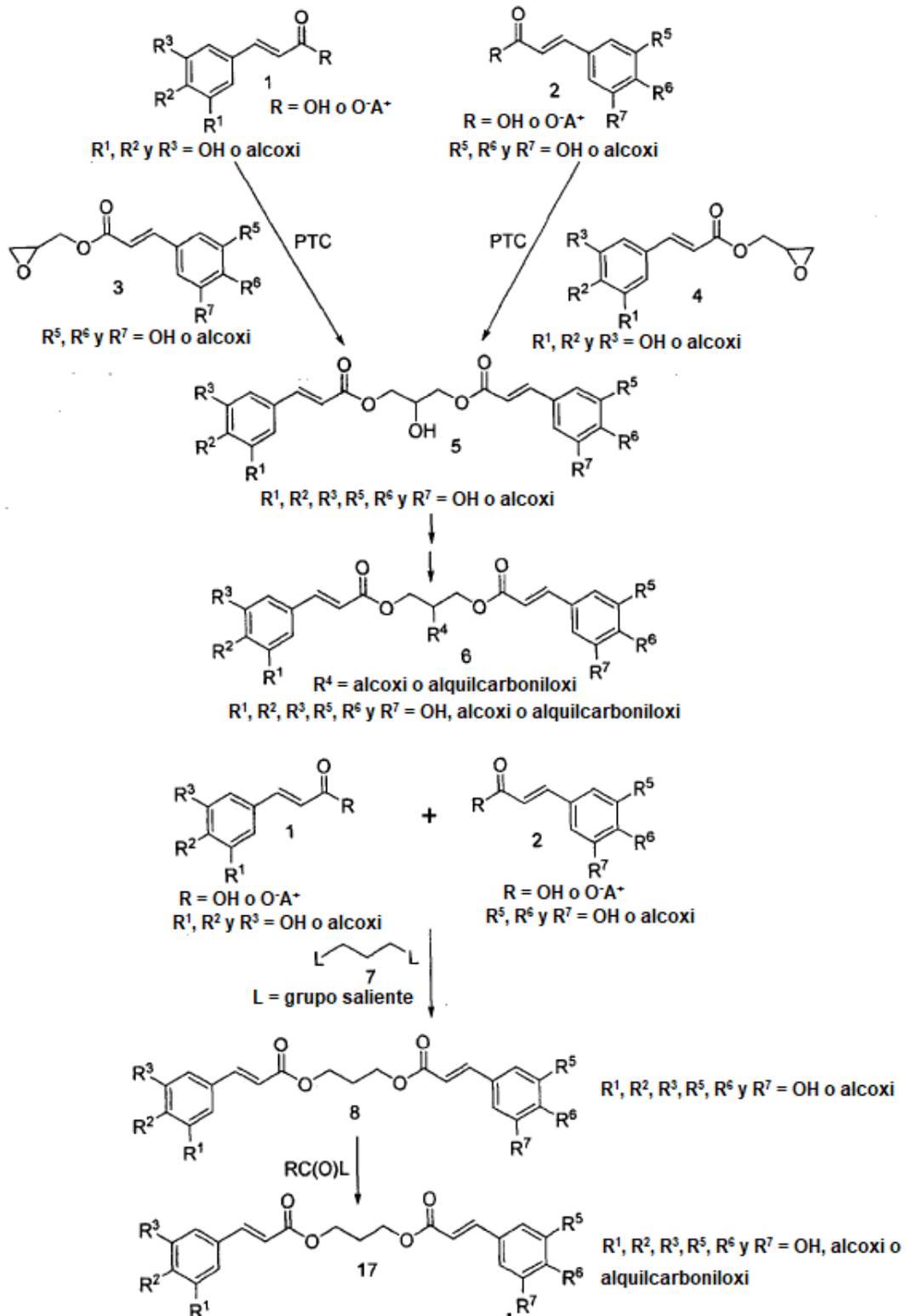
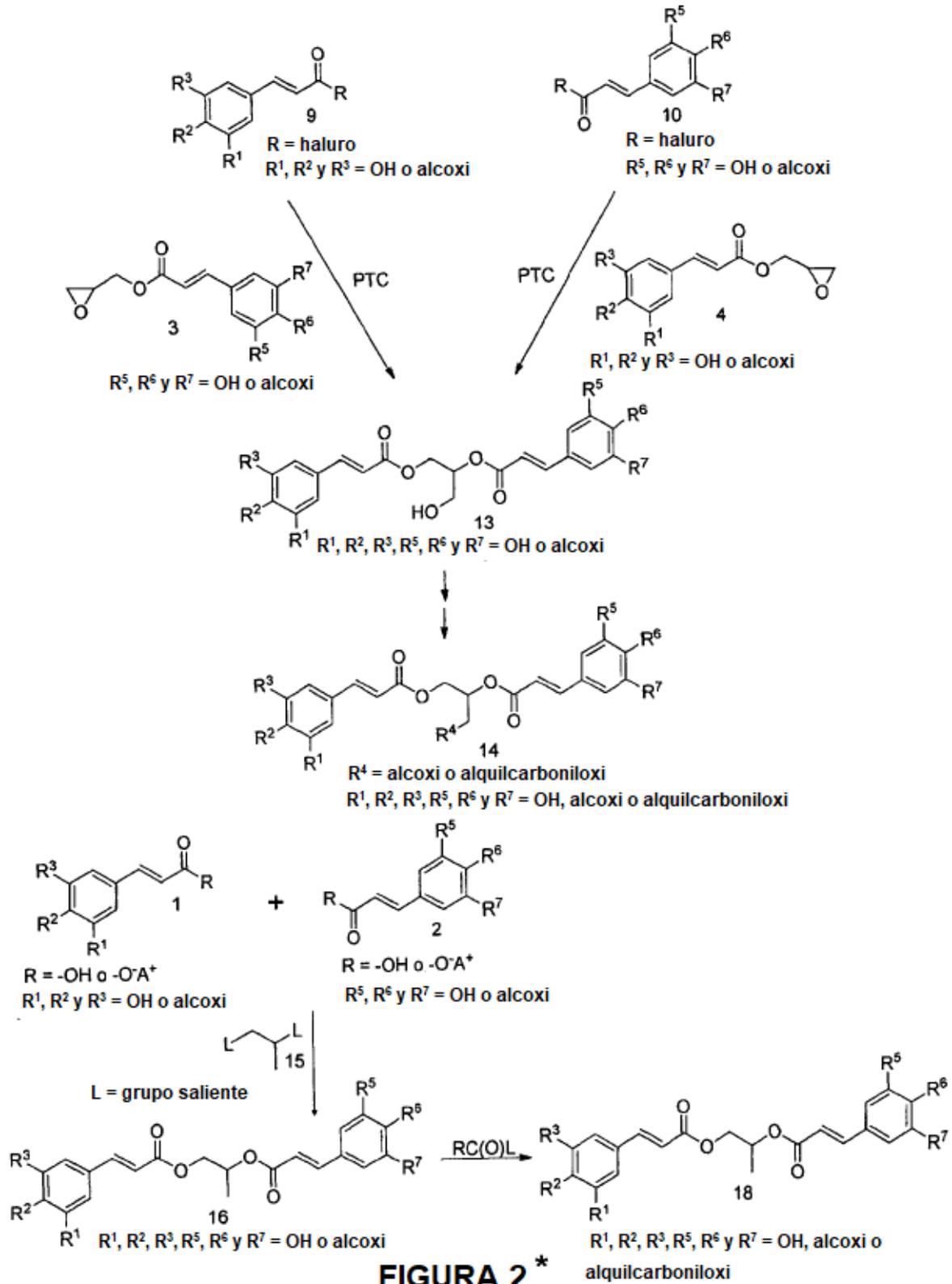


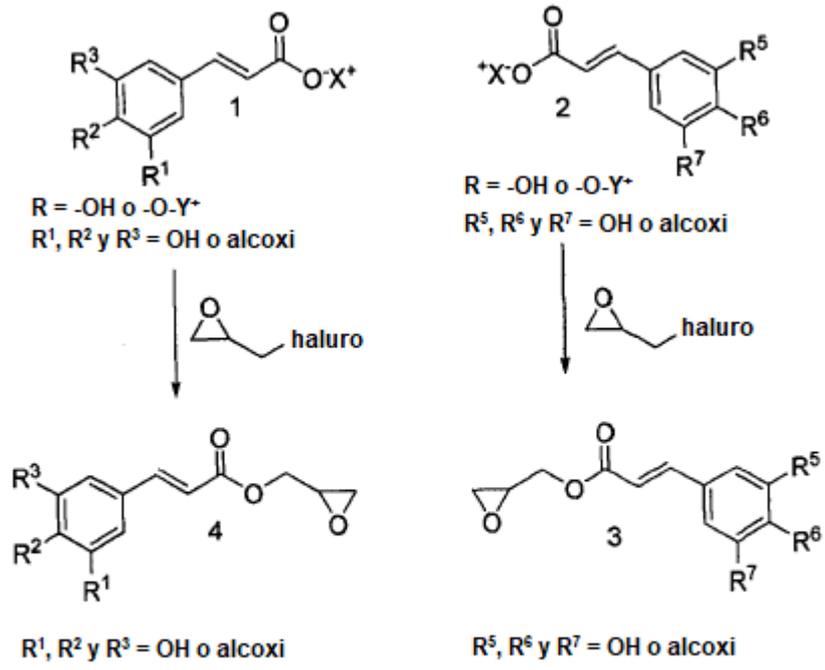
FIGURA 1\*

\* no según la invención

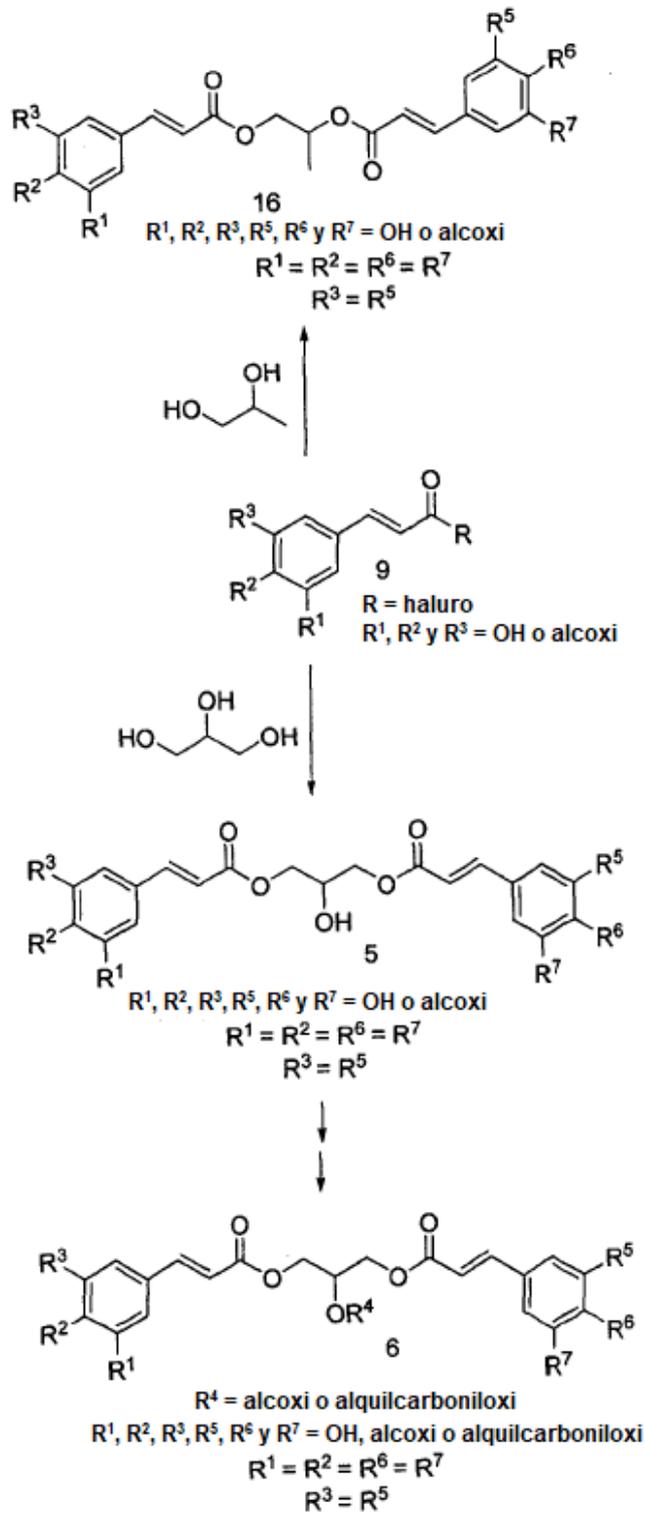


**FIGURA 2 \***

\* no según la invención



**FIGURA 3**

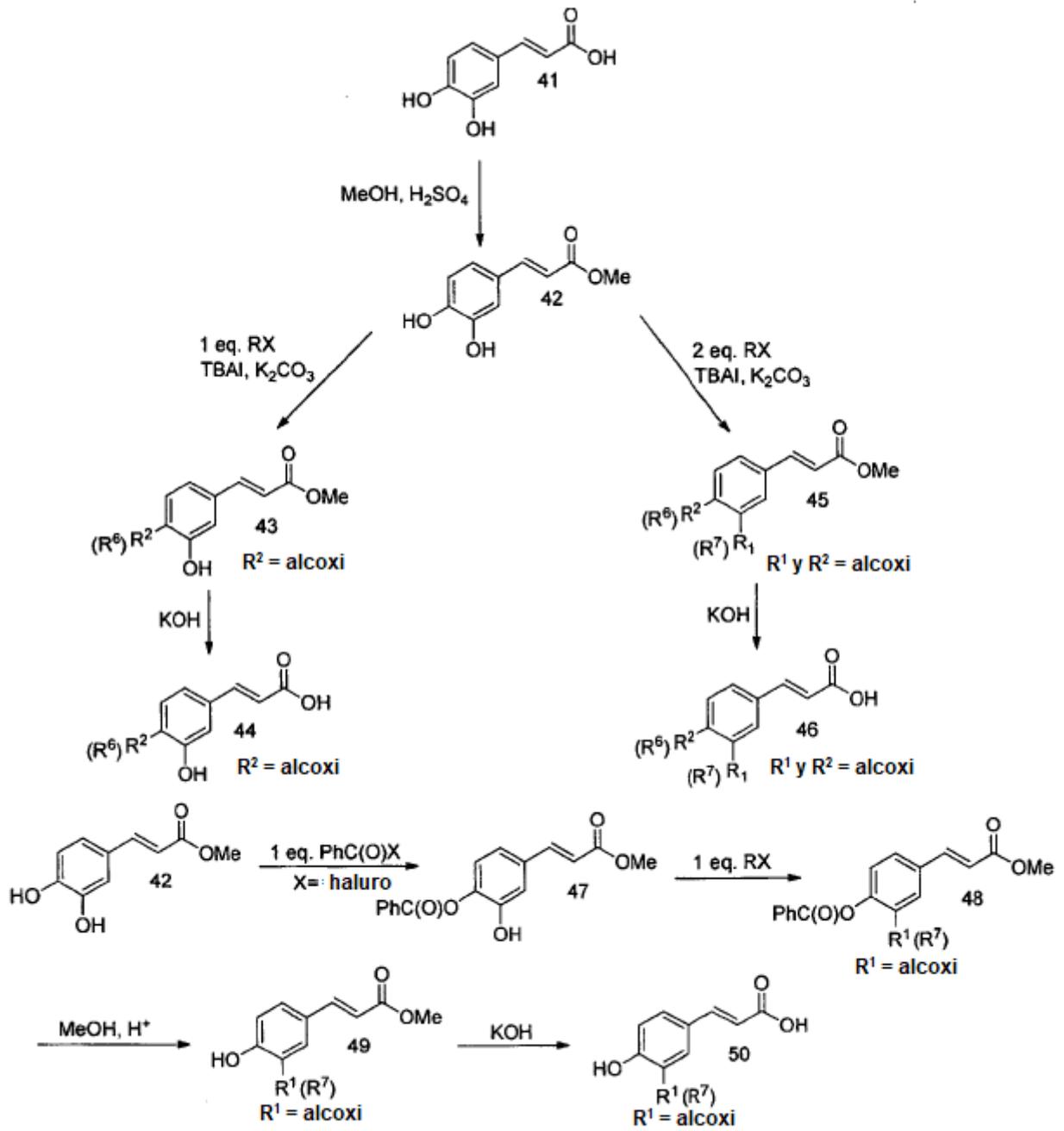


**FIGURA 4 \***

\* no según la invención







**FIGURA 7**

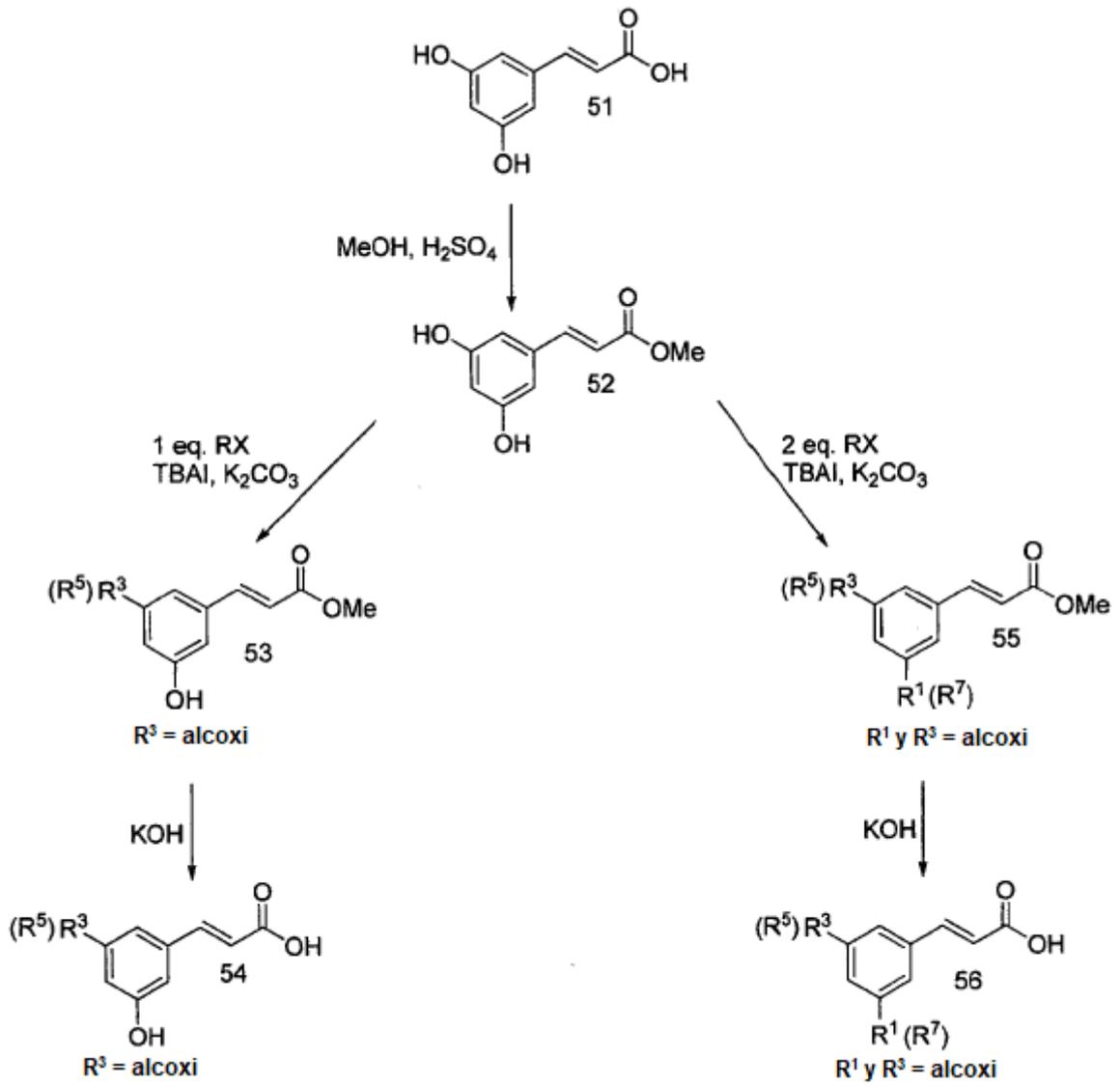
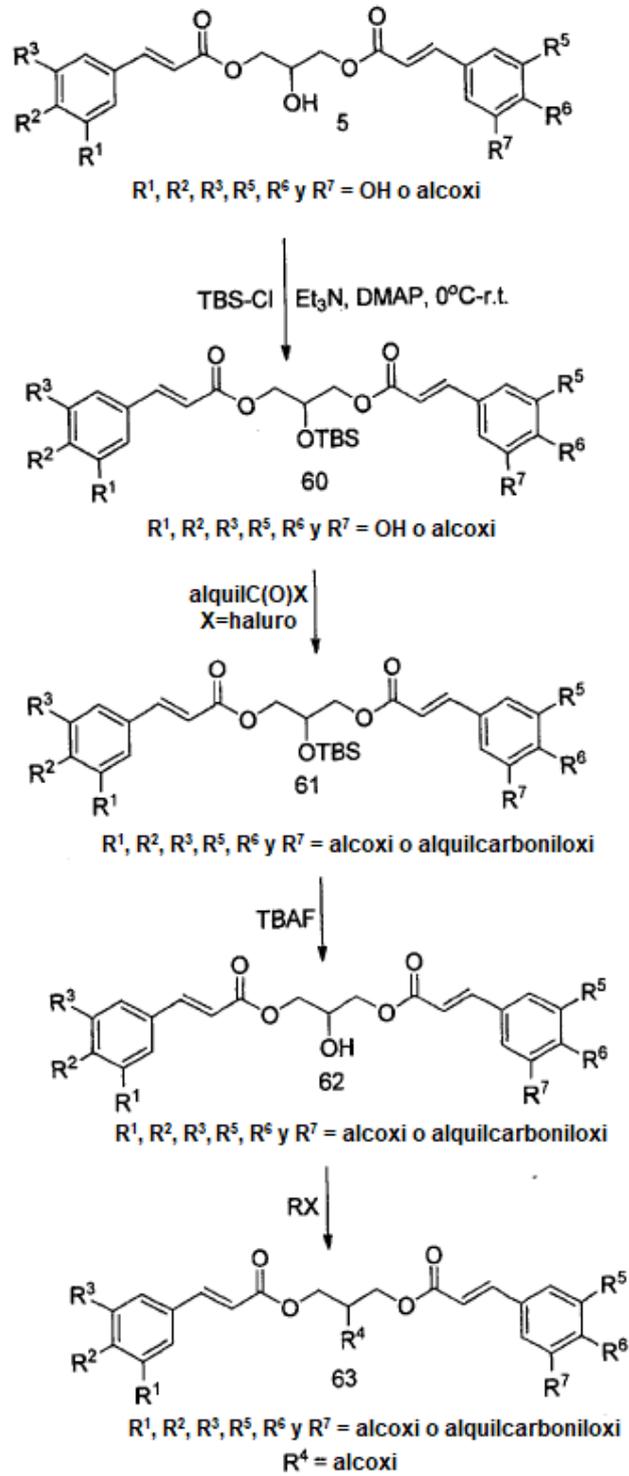
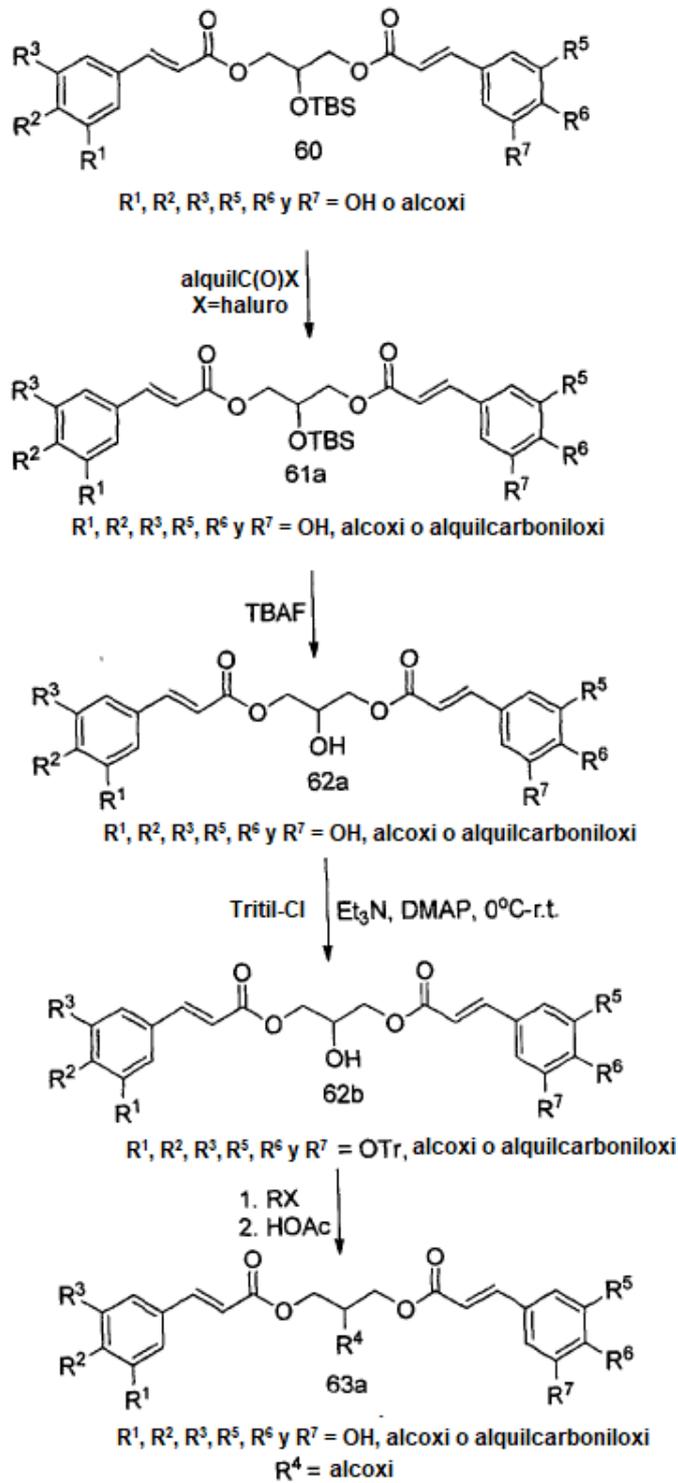


FIGURA 8



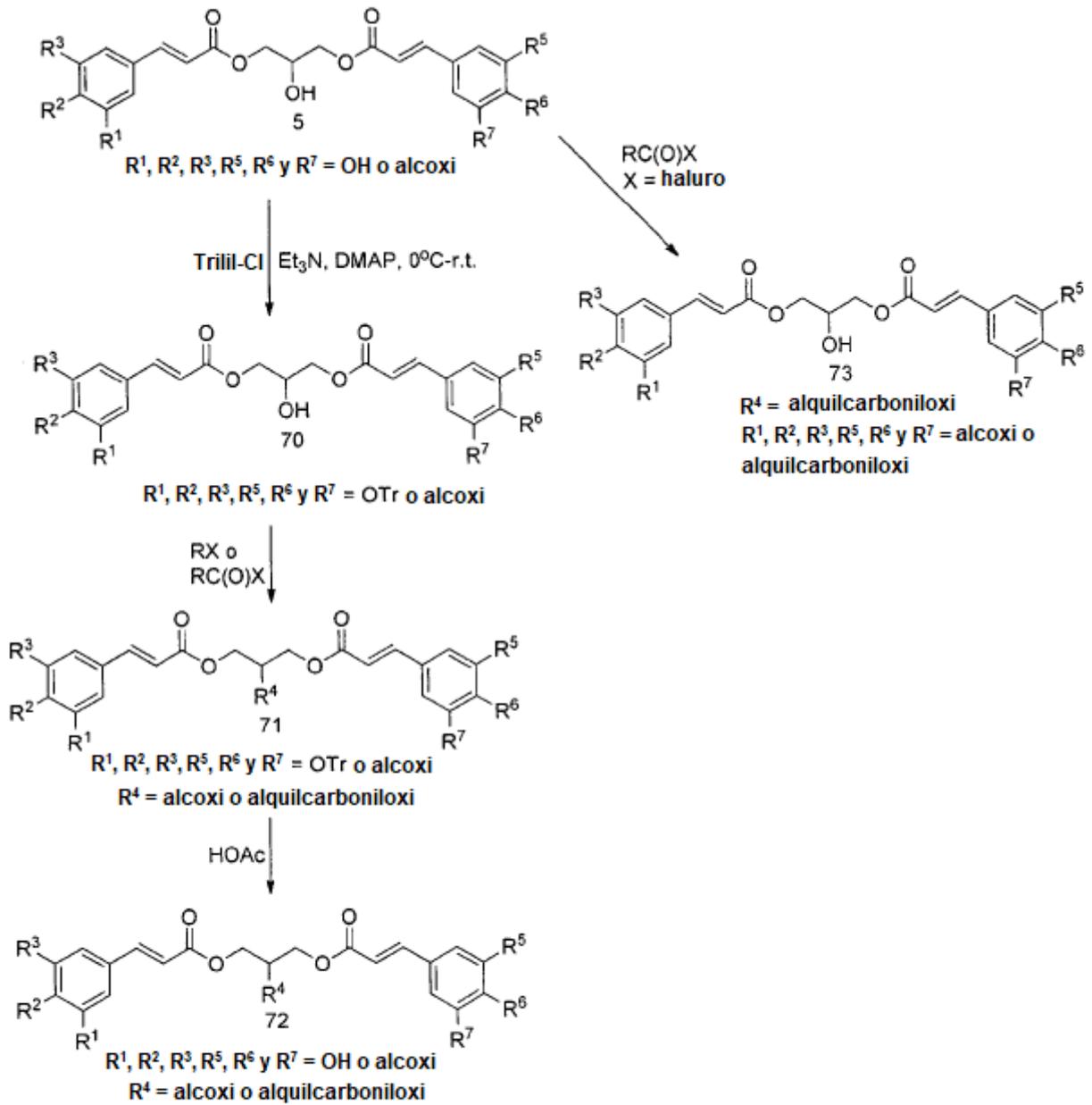
**FIGURA 9\***

\*no según la invención



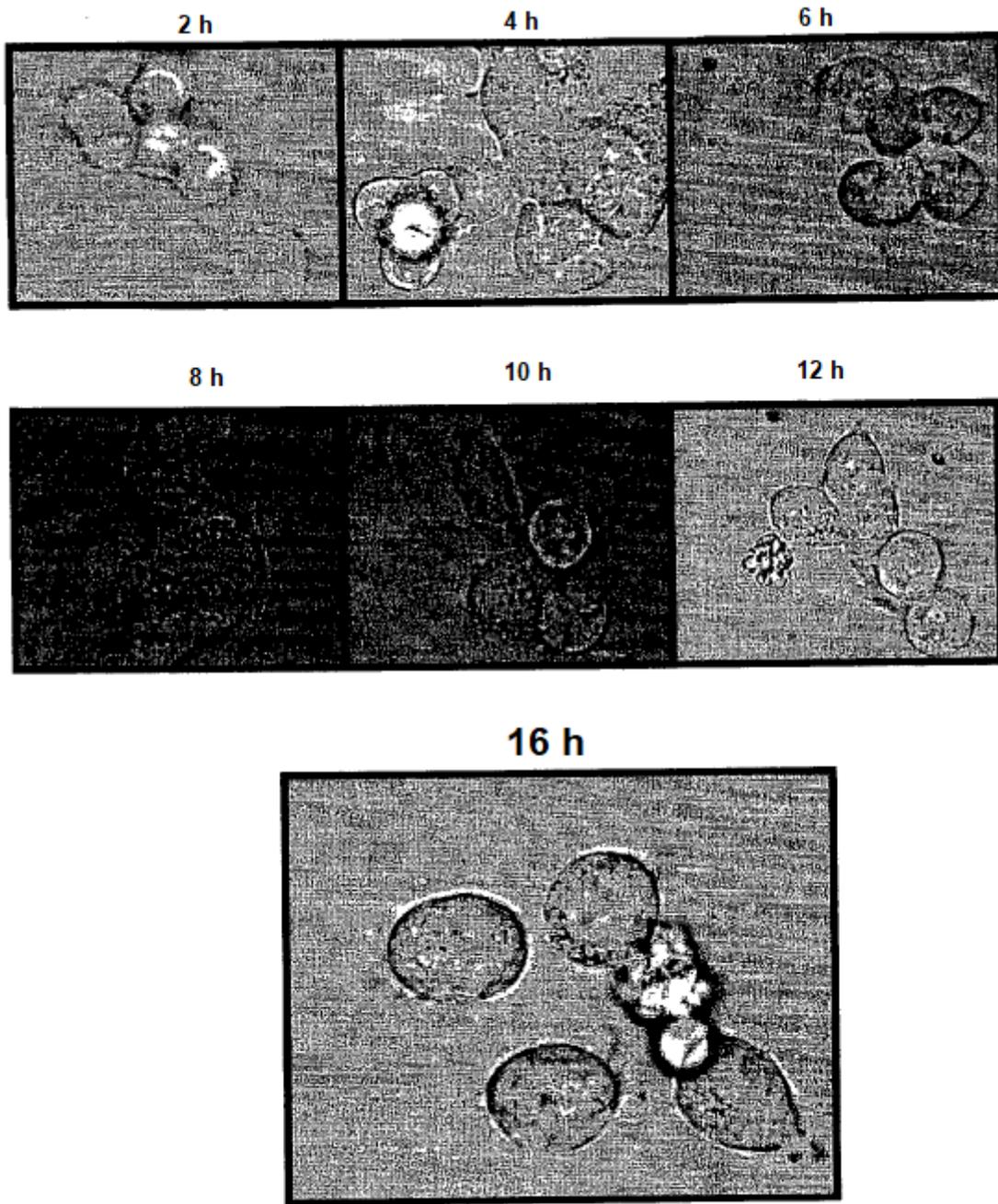
**FIGURA 10\***

\* no según la invención

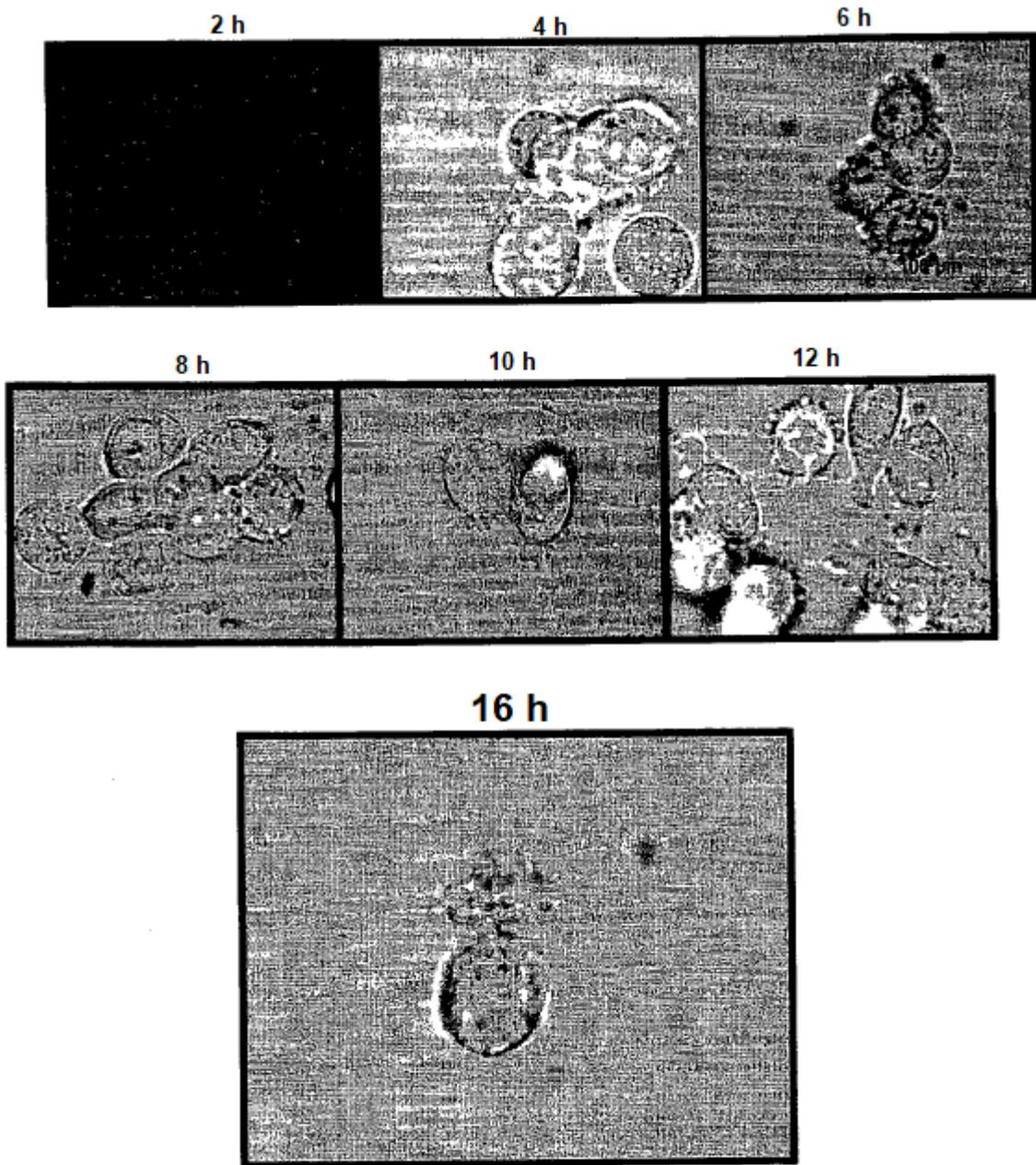


**FIGURA 11\***

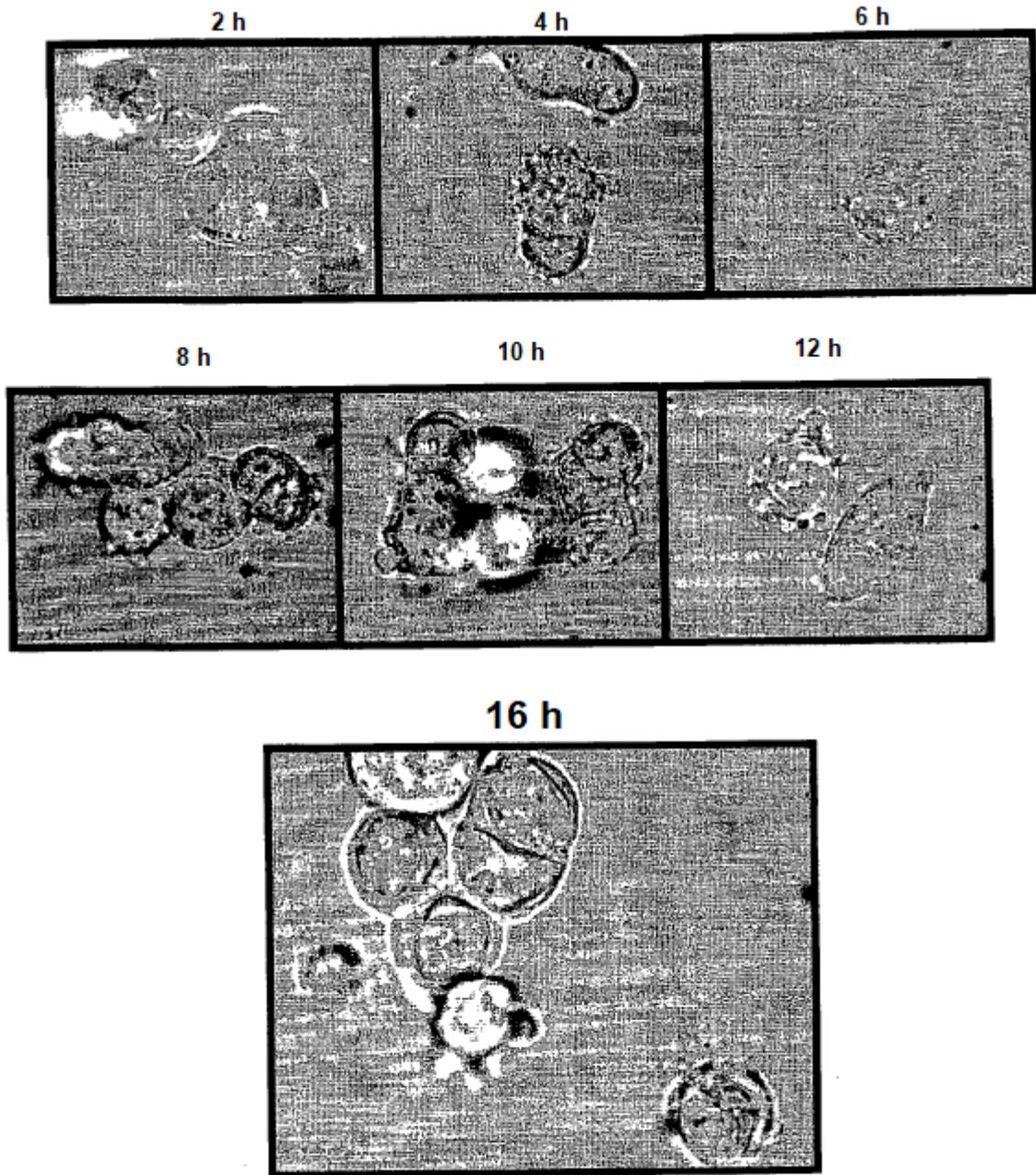
\*no según la invención



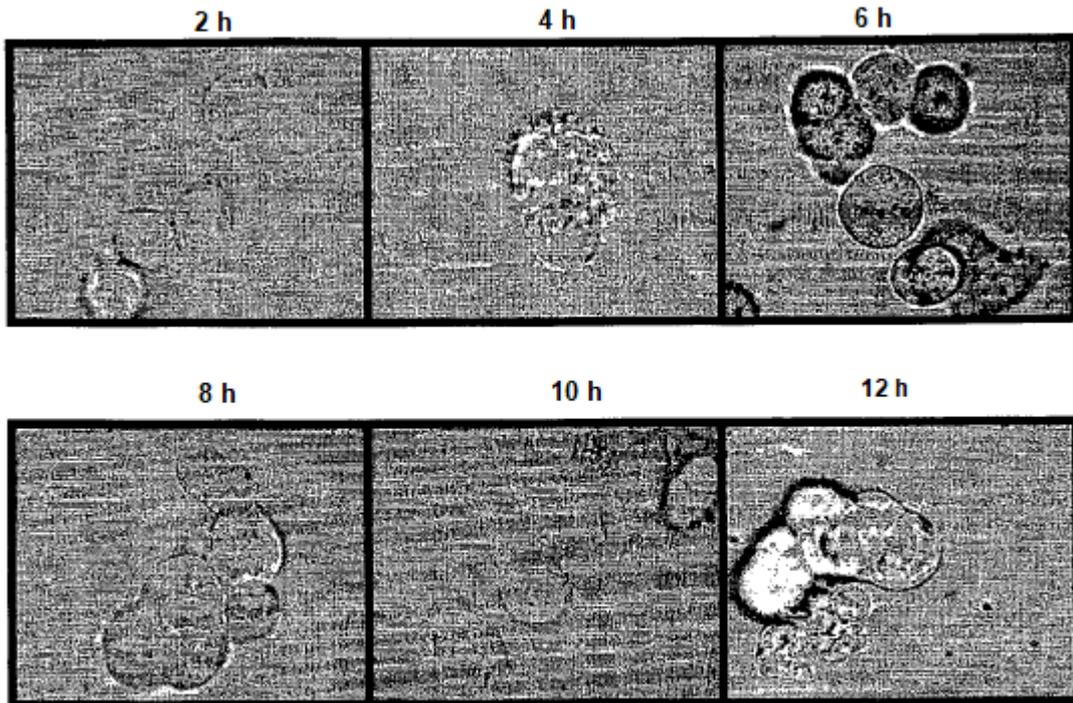
**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**



**FIGURA 15**