



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 749**

51 Int. Cl.:
A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06792859 .8**

96 Fecha de presentación : **16.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1809292**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Derivados de pirimidina condensada como inhibidores de enzimas dependientes de ácido fólico.**

30 Prioridad: **17.08.2005 EP 05107582**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Dan Stoicescu**
ch. de la Dullive 3
1195 Dully, CH

72 Inventor/es: **Stoicescu, Dan**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 749 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

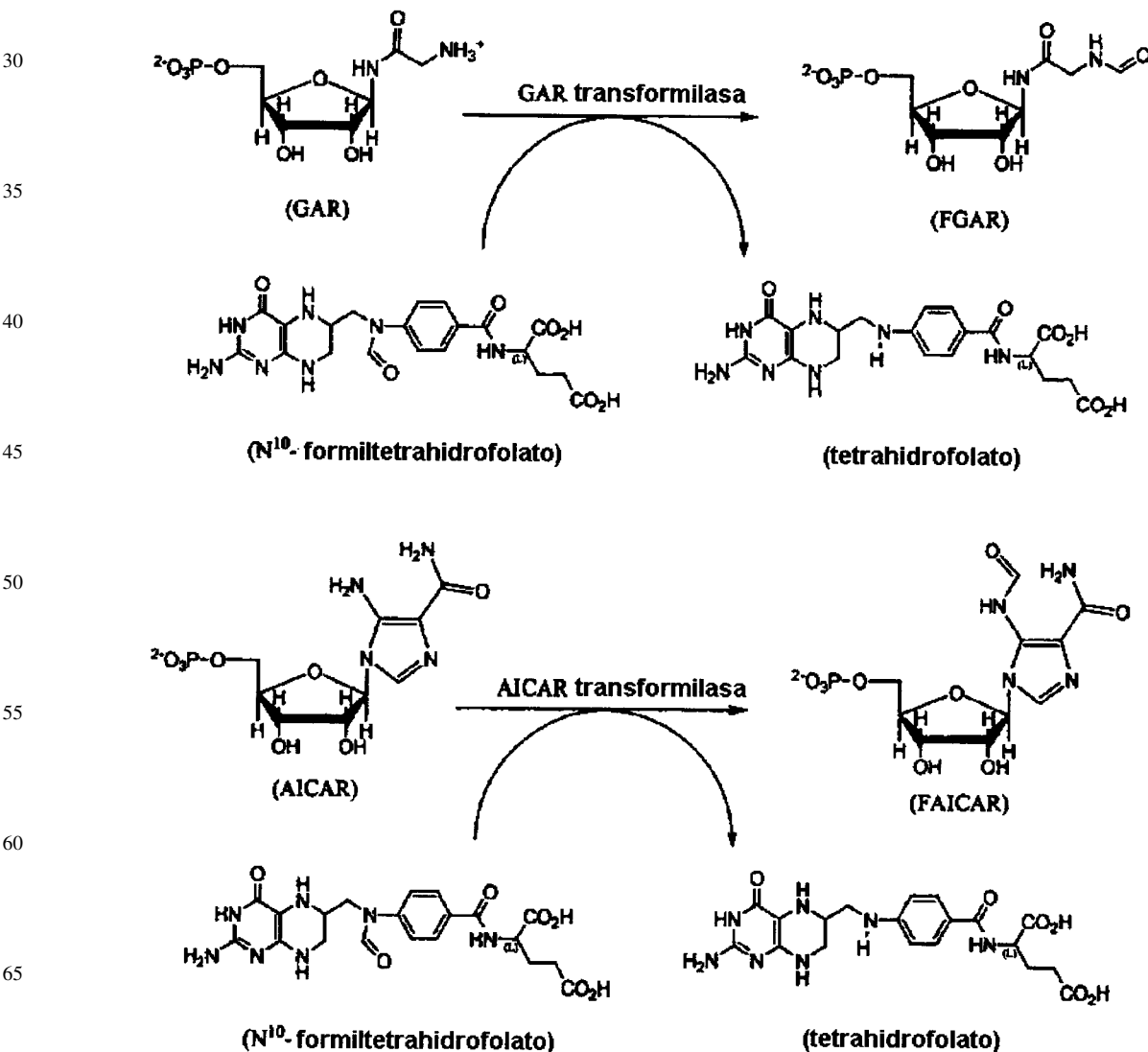
Derivados de pirimidina condensada como inhibidores de enzimas dependientes de ácido fólico.

5 La presente invención se refiere a una nueva clase de compuestos. En particular, la presente invención se refiere a nuevos compuestos que inhiben enzimas cuyos substratos naturales son el ácido fólico o derivados del ácido fólico (folatos), y que pueden ser usados en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

10 Las células cancerosas se replican más rápidamente que muchas otras células y por ello tienen una mayor demanda de nucleótidos, los precursores del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Debido a que todas las células no conservan una reserva residual de nucleótidos (excepto para la adenosina trifosfato, ATP), éstos deben ser sintetizados continuamente durante la síntesis de ADN y ARN. Por consiguiente, la replicación de las células cancerosas tiende a ser más sensible a la inhibición de la biosíntesis de nucleótidos que en las células sanas, y por esta razón, están aumentando los intereses en agentes quimioterapéuticos capaces de llevar a cabo dicha inhibición.

15 Los nucleótidos pueden ser sintetizados biológicamente vía rutas *de novo* a partir de precursores metabólicos fundamentales, o vía rutas de rescate a través de las cuales se reciclan productos de degradación de los ácidos nucleicos, las bases libres y los nucleósidos. Las rutas *de novo* son de interés primordial respecto a la investigación de nuevos agentes quimioterapéuticos.

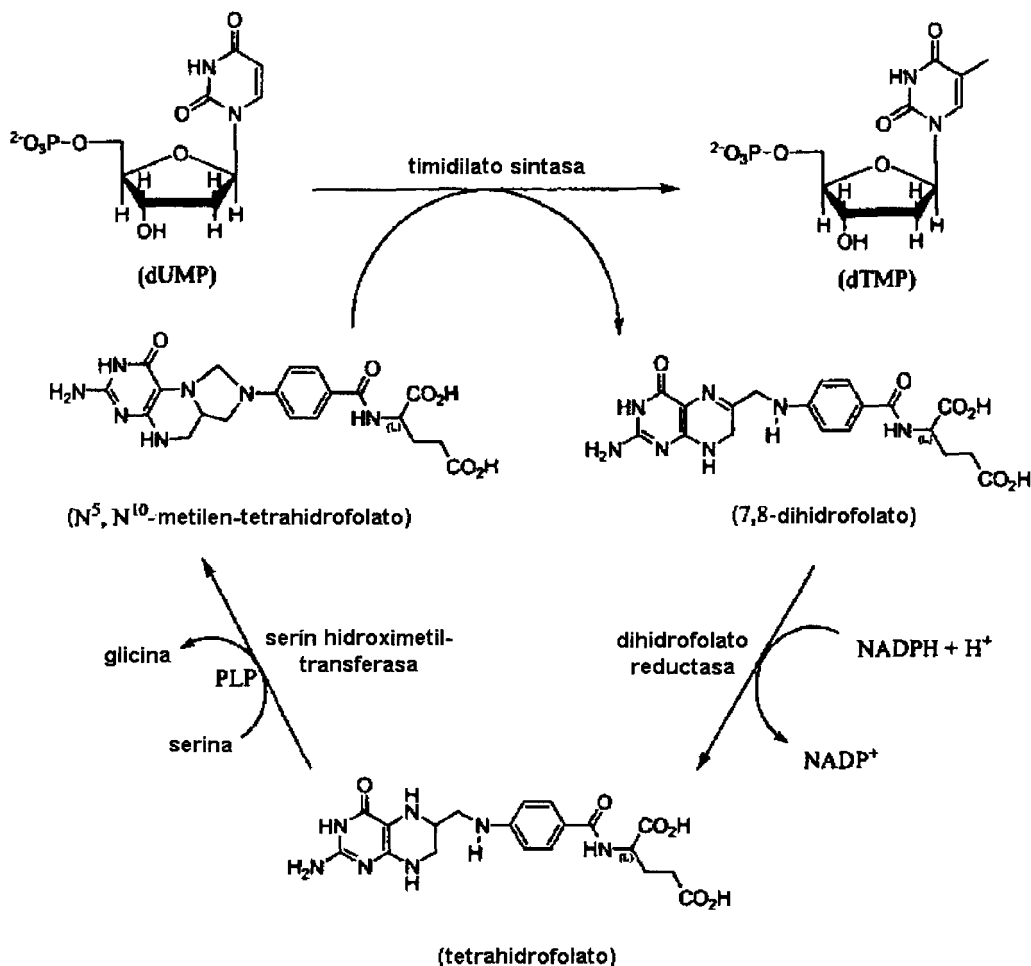
20 Los nucleótidos 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP) se obtienen *de novo* a partir de inosina monofosfato (IMP), que a su vez deriva del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PPRP). Dos enzimas involucradas en la ruta biosintética entre PPRP e IMP son GAR transformilasa y AICAR transformilasa. GAR transformilasa convierte la ribonucleótido glicinamida (GAR) en la ribonucleótido formilglicinamida (FGAR) utilizando N¹⁰-formiltetrahidrofolato, mientras que AICAR transformilasa utiliza el mismo compuesto para convertir la ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) en la ribonucleótido N-formilaminoimidazol-4-carboxamida (FAICAR), tal como se muestra abajo.



ES 2 308 749 T3

Por otra parte, el nucleótido 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) es producido por síntesis *de novo* a partir de 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP), una conversión catalizada por la enzima timidilato sintasa.

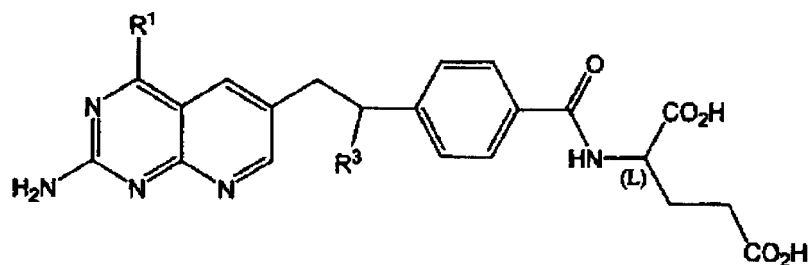
Durante la conversión, el N⁵,N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato es reducido a 7,8-dihidrofolato; el primero es regenerado vía tetrahidrofolato utilizando las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y serin hidroximetil-transferasa. Estos procesos se ilustran abajo.



Se han explotado las interferencias con estos mecanismos en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, US 2,512,572 divulga un número de pteridinas sustituidas que incluyen el potente agente quimioterapéutico metotrexato, que pertenece a la clase de los "antagonistas de folato", e inhibe la síntesis de ADN por antagonismo competitivo con la dihidrofolato reductasa, uniéndose con una afinidad de alrededor de 100 veces mayor que su sustrato natural, previniendo de este modo la regeneración del tetrahidrofolato, que es esencial para la síntesis de dTMP. Esto lleva a la llamada "muerte de timina" ("thymine-less death") en células cancerosas. El metotrexato también inhibe a la GAR transformilasa, a la AICAR transformilasa y a la timidilato sintasa, aunque en menor grado. Las estructuras del metotrexato y de otros anti-folatos relacionados se muestran abajo.

Compuestos	Estructura
Metotrexato	
Aminopterin	
Pemetrexed	
Lometrexol	

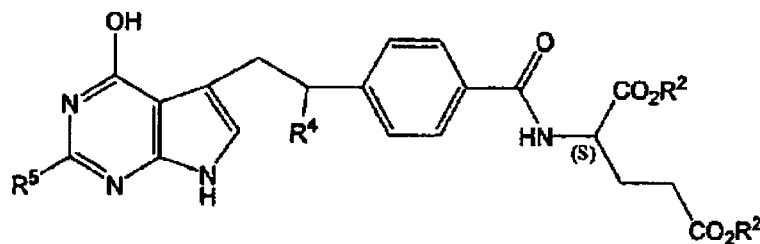
US 4,684,653 divulga compuestos de la fórmula:



donde R¹ es OH o NH₂ y R³ es H, Me o Et, y sus correspondientes 5,6,7,8-tetrahidro derivados. Estos compuestos son divulgados para tener un efecto en una o más enzimas que utilizan como sustrato el ácido fólico y sus derivados metabólicos.

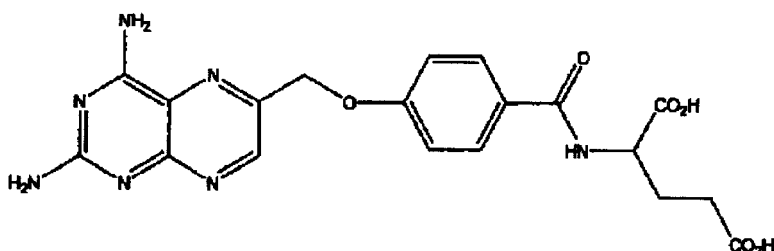
ES 2 308 749 T3

US 5,344,932 divulga derivados de ácido glutámico de la fórmula:



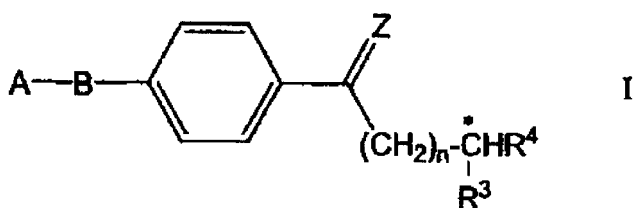
donde R⁵ es H o NH₂, R⁴ es H o OMe, y R² es H o un catión farmacéuticamente aceptable, y divulga que éstos tienen un efecto en uno o más enzimas que utilizan como sustrato el ácido fólico y sus derivados metabólicos.

US 4,007,957 divulga un método de sintetizar varios compuestos de pteridina, que incluyen:



Aunque dichos compuestos tienen utilidad demostrada para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar el cáncer, todavía existen un número de problemas asociados con su uso, que incluyen baja eficacia, resistencia intrínseca y adquirida a dichas drogas en algunos pacientes, toxicidad y efectos secundarios adversos. Por consiguiente, permanece la necesidad de compuestos alternativos que puedan ser usados para tratar el cáncer y puedan dirigir uno o más de los problemas mencionados.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



donde:

Z = O ó S;

N = 1 - 3;

R³ = -CO₂R⁸, -C(O)SR⁸, -C(O)NHR⁸, -C(S)OR⁸, -C(S)SR⁸, -C(S)NHR⁸, -C(NH)SR⁸ o -C(NH)NHR⁸,

donde R⁸ es -H o alquilo;

R⁴ = -H, -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵,

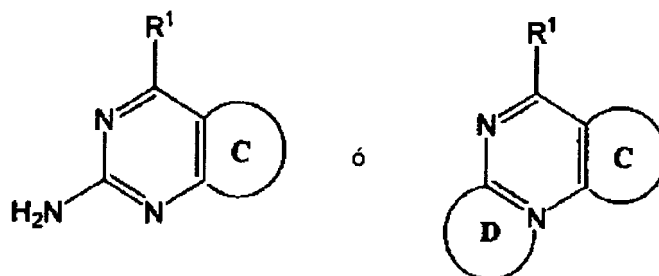
donde R⁵ tiene independientemente uno de los significados de R³;

ES 2 308 749 T3

B = -NR²-, -CH₂ NR²-, -CH₂CH₂NR²-, -CH₂ CHR⁷- o -CH₂O-,

donde R² es H o un grupo alquilo C₁₋₃, alquenoilo o alquinilo, y R⁷ es H o un grupo alquilo C₁₋₃ o alcoxi;

5 A =



20 donde

R¹ = -NH₂ o -OH,

25 C y D son cada uno, independientemente, un anillo aromático o no aromático sustituido o no sustituido de 5 o 6 eslabones que también puede contener uno o más hétéroátomos, y C está conectado al grupo B en cualquier posición disponible.

30 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de acuerdo a la invención en su primer aspecto, para su uso en terapia.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo a la invención en su primer y segundo aspecto.

35 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de acuerdo a la invención en su primer y segundo aspecto para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una condición responsable de la inhibición de una enzima dependiente sobre el ácido fólico o derivados del ácido fólico.

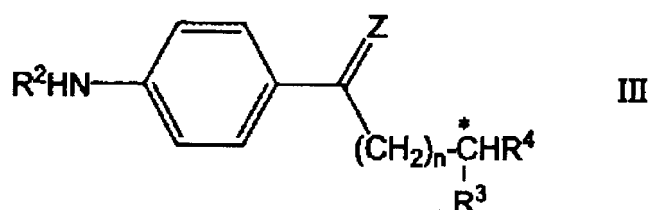
40 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de acuerdo a la invención en su primer y segundo aspecto para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar un compuesto de acuerdo a la invención en su primer y segundo aspecto, que comprende el paso de:

45 (a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula II



50 donde A está previamente definido, m es 0,1 o 2 y X es un grupo saliente, con un compuesto de la fórmula III



donde Z, n, R², R³ y R⁴ están previamente definidos;

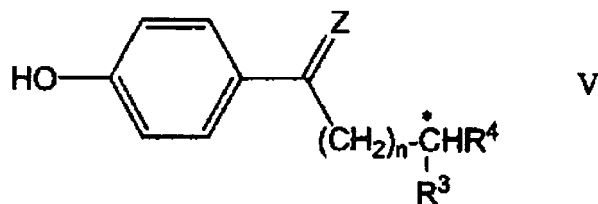
65 (b) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula IV



ES 2 308 749 T3

donde A está previamente definido y X es un grupo saliente, con un compuesto de la fórmula V

5



10

donde Z, n, R³ y R⁴ están previamente definidos; o

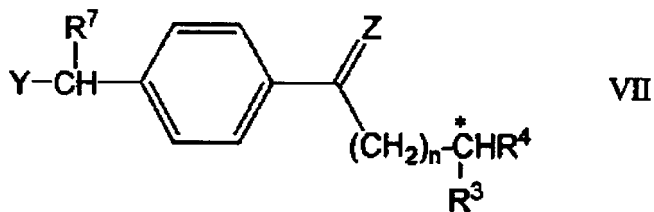
15

(c) convertir uno de los siguientes compuestos VI o VII en el correspondiente reactivo organometálico



20

25



30

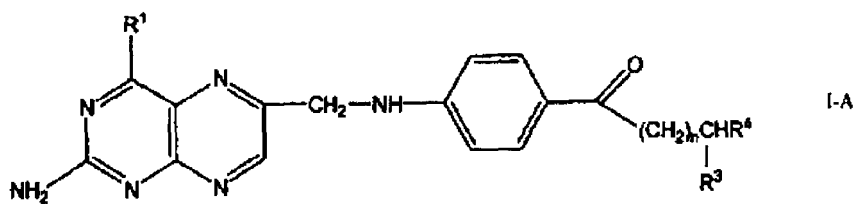
35

donde A, Z, n, R³, R⁴ y R⁷ están previamente definidos, e Y es, en cada caso independientemente, un halógeno, y hacer reaccionar dicho reactivo con el otro de los compuestos VI o VII.

40

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar un compuesto de acuerdo a la invención en su primer y segundo aspecto teniendo la fórmula I-A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

45

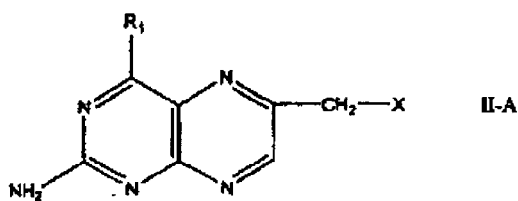


50

55

donde n, R¹ y R² y R⁴ están previamente definidos, que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula II-A

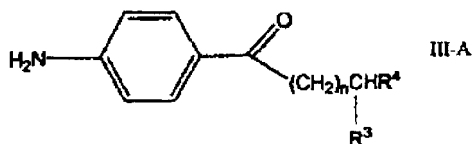
60



65

ES 2 308 749 T3

donde X es Cl, Br o I, con un compuesto de la fórmula III-A



10 En un octavo aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de la fórmula V o VII previamente definido, excepto que R⁴ es -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵. En otros aspectos más alejados de la invención se proporcionan compuestos de la fórmula III tal como se definen en las reivindicaciones.

15 Los aspectos preferidos de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos, son como se describen abajo o como se definen en las reivindicaciones dependientes.

20 En todos los aspectos de la invención, el carbono marcado C* puede ser asimétrico (cuando R⁴ no es H) y en este caso se entenderá que los compuestos de la fórmula I pueden existir en forma racémica, o pueden estar separados en sus enantiómeros (+) o (-) por métodos convencionales. Además, en algunos compuestos pueden estar presentes otros centros quirales ocasionando uno o más pares de enantiómeros. Por ejemplo, existe un segundo centro quiral en aquellos compuestos donde B = -CH₂CHR⁷- donde R⁷ es un grupo alquilo C₁₋₃ o alcoxi. Se pretende que todas estas formas racémicas o enantioméricas estén englobadas dentro del alcance de la presente invención. Además, se entenderá que los compuestos de fórmula I puedan existir en una o más formas tautoméricas, y cada una de estas formas también se pretende que estén englobadas dentro del alcance de la presente invención.

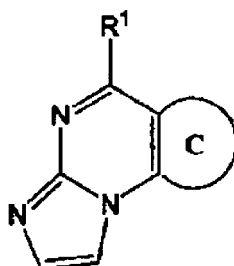
25 Tal como se describe en detalle más adelante, los compuestos de fórmula I son análogos estructurales del ácido fólico y se ha encontrado que poseen actividad como inhibidores de aquellas enzimas que son dependientes sobre el ácido fólico o derivados del ácido fólico (folatos), como la dihidrofolato reductasa (DHFR), a niveles comparables con los del metotrexato *in vivo*. También se ha visto que los compuestos de fórmula I son activos inhibiendo el crecimiento de tumores en modelos animales *in vivo*. Es de esperar que la última actividad pueda deberse a la habilidad de los compuestos para actuar como antagonistas competitivos de DHFR, aunque los detalles del mecanismo no se presentan aquí. Los compuestos de fórmula I pueden ser utilizados en tratamiento del cáncer, así como condiciones que son responsables de la inhibición de una enzima dependiente sobre el ácido fólico o un derivado del ácido fólico.

35 En composiciones preferidas de la fórmula I, se satisfacen una o más de las siguientes:

- Z es O;
- n es 1;
- 40 - R³ es -CO₂R⁸ y R⁴ es CH₂CH₂CO₂R⁸;
- R⁸ es -H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo o butilo terciario, preferiblemente -H, -Me o -Et, preferiblemente -H;
- 45 - B es -CH₂NR²-, -CH₂CHR⁷- o -CH₂O-, preferiblemente -CH₂NR²-;
- R² es -H, -Me, -Et o -CH₂C≡CH, preferiblemente H;
- 50 - R⁷ es -H, -Me, -Et o -OMe, preferiblemente H.

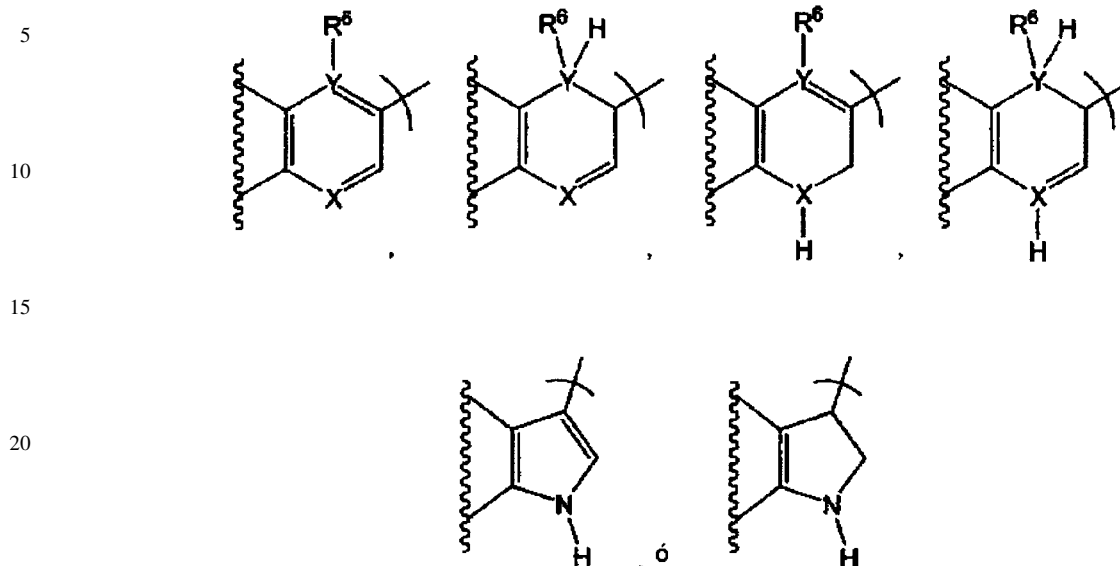
Además, los compuestos preferidos de las fórmulas III, V o VII muestran una o más de las designaciones preferidas de Z, n, R², R³, R⁴ y/o R⁷ arriba asignadas.

55 En el grupo A en las fórmulas I, II, IV o VI, D es preferiblemente un anillo heteroaromático de 5 eslabones. Preferiblemente, A es



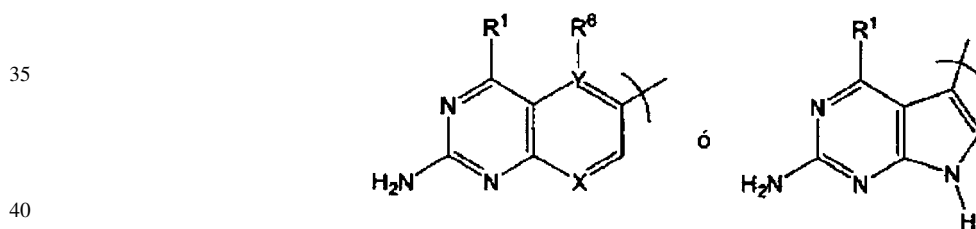
ES 2 308 749 T3

En el grupo A, C puede ser uno de los siguientes grupos (se muestran los puntos de unión al anillo adyacente y al grupo B):

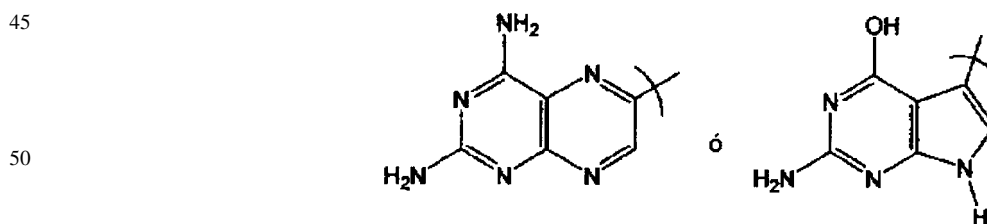


donde X es CH o N, y cualquiera: Y es C y R⁶ es H, Me, Et o HCO; o Y es N y R⁶ es un solo par de electrones. En aspectos preferidos, X e Y son ambos N y R⁶ es un solo par de electrones.

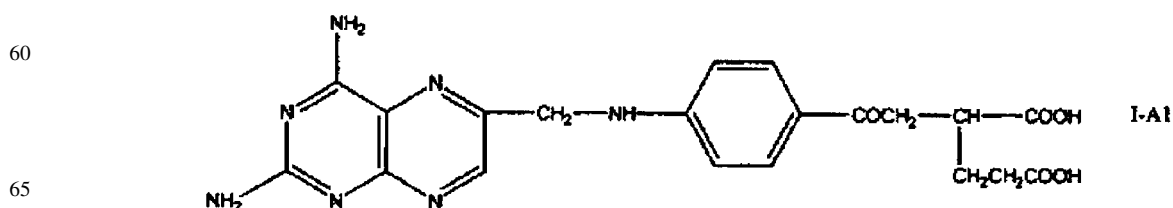
Los grupos A especialmente preferidos son aquellos de las siguientes estructuras, que mimetizan estrechamente aquellos encontrados en pteridinas naturales y en otras bases heterocíclicas:

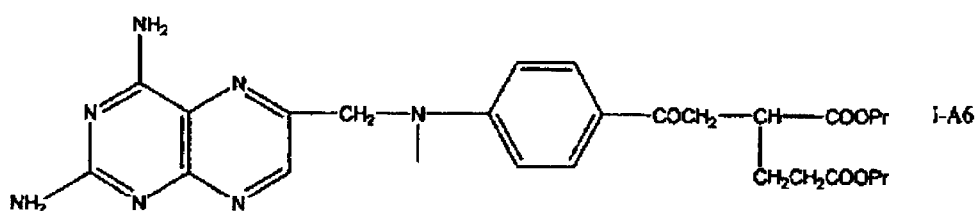
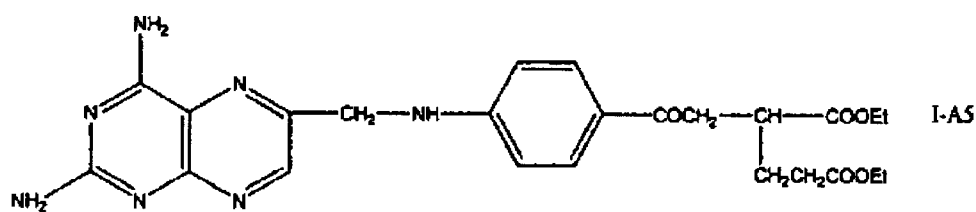
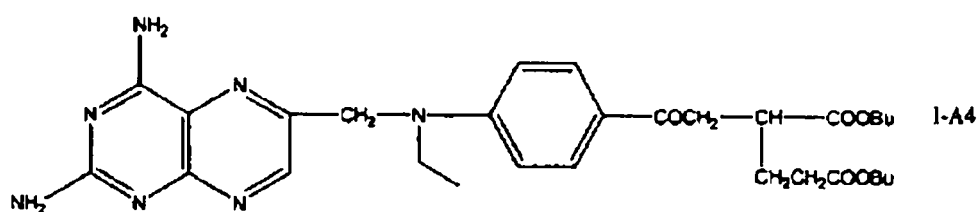
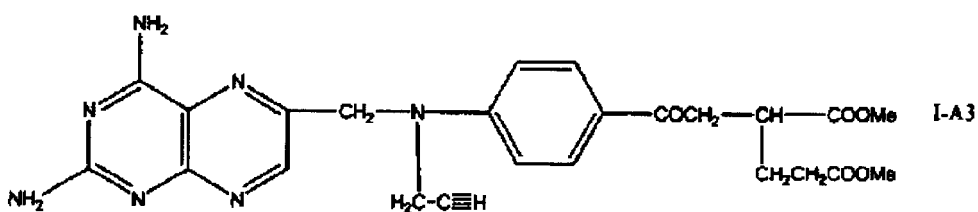
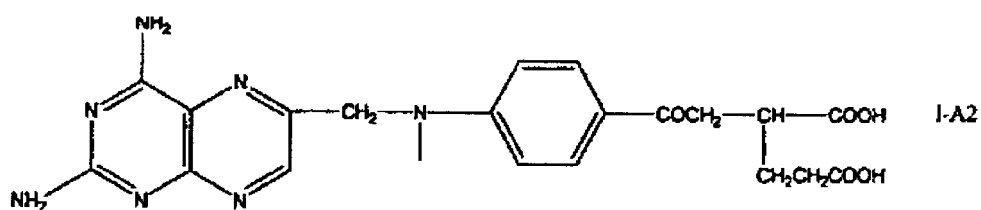


De particular interés son los dos grupos A siguientes:



Especialmente preferidos son los compuestos de la fórmula I que tienen los dos grupo A de arriba, donde B es -CH₂NR²-, R² es -H, -Me, -Et o -CH₂C≡CH, Z es O, n es 1, y R³ es -CO₂ R⁸, preferiblemente cualquier grupo ester hidrolizable. Abajo se muestran ejemplos individuales de este grupo de compuestos.





55

60

65

Los compuestos de la fórmula I pueden ser preparados por los métodos de la invención a partir de materiales de partida fácilmente disponibles y económicos. En el caso donde B es $-NR^2-$, $-CH_2NR^2-$ o $-CH_2CH_2NR^2-$, por ejemplo, los compuestos de fórmula I pueden ser preparados por acoplamiento de un compuesto de la fórmula II con un compuesto de la fórmula III. El grupo saliente X generalmente será un halógeno, como cloro, bromo o yodo, especialmente bromo y yodo. Esta reacción se lleva a cabo preferiblemente en un solvente dipolar aprótico, como dimetil formamida (DMF) o dimetilacetamida (DMAc). Puede usarse un catalizador básico como fluoruro de potasio, que proporciona un rendimiento superior que las aminas terciarias o el bicarbonato sódico. Cuando se necesite, previamente a la reacción, los grupos sensibles pueden ser protegidos utilizando grupos protectores apropiados conocidos en el estado de la técnica, y desprotegerlos después vía métodos clásicos. Por ejemplo, cuando R^3 es H y R^4 es $CH_2CH_2CO_2H$, estos grupos ácido pueden ser protegidos por ejemplo como grupos metil ester, con la subsiguiente desprotección por métodos conocidos como hidrólisis alcalina con hidróxido sódico en etanol y precipitación por adición de ácido, como ácido acético glacial. Por consiguiente, se entenderá que el método de la invención engloba la reacción de los compuestos de las fórmulas II y III donde cada uno o ambos compuestos están en una forma protegida.

ES 2 308 749 T3

Con el fin de que la invención pueda ser entendida totalmente, ahora será descrita en forma de ejemplo sólo con referencia al dibujo que acompaña, donde

La Figura 1 es una representación esquemática de la síntesis total de dos compuestos de acuerdo a la presente invención (compuestos 3 y 4), tal como se describe en detalle en los Ejemplos 1 y 2.

Los siguientes ejemplos tienen la intención de demostrar la invención pero no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

10 Ejemplo 1

Síntesis del compuesto 3

15 *Origen de los materiales de partida*

El cloruro de 3-cloropropanoilo y el cianoacetato de etilo se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich Company Ltd, The old Brickyard, New Road, Gillingham, Dorset SP8 4XT, United Kingdom, o se sintetizaron por métodos clásicos. La α -bromo-p-nitro-acetofenona 7 se obtuvo por bromación de p-nitroacetofenona con bromo en tetrahydrofurano (THF). La 2,4-diamino-6-bromometilpteridina 2 se obtuvo por métodos clásicos (ver, por ejemplo, US 4,077,657 y US 4,224,446).

25 Paso A

Síntesis del compuesto 6

El cloruro de 3-cloropropanoilo se esterificó con etanol en presencia de piridina o trietilacetato para producir etil 3-cloropropionato 5. Este último se condensó con cianoacetato de etilo de acuerdo con el procedimiento de L. Ruzicka *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 17, 183-200 (1934), CA 28:2584, o Koelsch, C.F., *J. Am. Chem.* 65, 2458-9 (1943), para formar dietil α -cianoglutarato 6. Con $^1\text{H-NMR}$ se confirmó la estructura esperada. GC: 97% de pureza.

35 Paso B

Síntesis del compuesto 8

Se añadieron 175 g (0.71 mmol) de α -bromo-p-nitro-acetofenona 7 en porciones a 0-5°C a una suspensión de 175 g (0.82 mmol) de dietil α -cianoglutarato 6 y 175 g (3 mmol) de KF en 500 ml de DMF. La reacción se monitorizó por cromatografía en capa fina (TLC). Tras 4 horas, la mezcla de reacción se suspendió en 2 l de agua que contenía 0.1% de ácido acético a pH 5. Tras decantar el agua, se lavó con agua el precipitado pegajoso (2 x 750 ml) y luego se trituró con 300 ml de metanol. Cuando se completó la cristalización, el precipitado se filtró y se lavó sucesivamente con un exceso de metanol y éter, proporcionando 210 g del compuesto 8, un sólido amarillo con un m.p. de 92.1°C (rendimiento del 68%). Tras cromatografía en gel de sílice (50:50:4 benceno-ciclohexano-etanol) el producto tenía un m.p de 99.7°. La TLC en placas de gel de sílice (5:1:3:10:0.1 benceno-etanol-ciclohexano-éter de petróleo AcOH) mostró una sola mancha con un Rf (factor de retención) de 0.38. HPLC: 97% de pureza.

50 Paso C

Síntesis del compuesto 9

30 g (0.08 mmol) del compuesto 8 se disolvieron en 400 ml de metanol y se hidrogenaron en un frasco de hidrogenación a temperatura ambiente en presencia de 6 g de catalizador 20% de Pd/C. El volumen teórico de hidrógeno (c. 6200 ml; 0.28 mmol) se absorbió es 1 hora (TLC control). El catalizador de platino se filtró y se evaporó el metanol. El producto crudo obtenido se solidificó por secado *in vacuo*, resultando en 27.6 g del compuesto 9, un sólido amarillo (rendimiento del 99%) que se utilizó, sin ninguna purificación, en la conversión al compuesto 10 crudo descrito abajo. La pureza se aceptó por análisis de TLC. La TLC (4:1 cloroformo-metanol) mostró una sola mancha, de Rf 0.5 (reacción característica con 4-dimetilamino benzaldehído). La sal HCl se aisló tras reflujo en HCl. LC-MS y $^1\text{H NMR}$ confirmaron las estructura esperada; HPLC: 99% de pureza.

65 Paso D

Síntesis del compuesto 10

Se preparó una solución de 52.2 g (0.15 mmol) del intermediario 9 en 100 ml de metanol. Se añadieron 188 ml de NaOH 6N gota a gota a temperatura ambiente durante 1 hora y se permitió reposar la solución durante 12

ES 2 308 749 T3

horas. Luego, la mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de agua y se concentró bajo alta aspiración. Al residuo se añadieron 700 ml de HCl al 37% y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla obtenida se diluyó con 1.5 l de metanol y el precipitado de NaCl se eliminó por filtración. El filtrado se utilizó en el paso E. Antes de la dilución, se aisló una pequeña cantidad de diácido 10 por filtración de la suspensión y lavado del precipitado sucesivamente con un exceso de agua, acetona y éter. La TLC (4:1 cloroformo-metanol) mostró una sola mancha, Rf 0.26.

Paso E

Síntesis del compuesto 1

La solución metanólica del ácido dicarboxílico 10 obtenido en el paso D se enfrió a 0-5°C y se añadieron gota a gota 100 ml de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó bajo reflujo durante 3 horas, y luego se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el solvente. El precipitado obtenido se filtró y lavó con éter, resultando en 27 g del compuesto 1 (rendimiento del 63%), un sólido con un m.p. de 115-116°C. Tras la recristalización a partir de tetrahidrofurano, se obtuvieron 17.5 g de cristales blancos de 1 con un m.p. de 116-117°C. La TLC (4:1 cloroformo-metanol) mostró una sola mancha, Rf 0.73. Espectro UV: 234, 319 nm (MeOH). Espectro ¹H NMR: 2.0 (2H, m, CH₂CH₂COOH₃), 2.5 (2H, t, CH₂CH₂COOH₃), 3.1 (2H, m, COCH₂), 3.5 (1H, m, COCH₂CH), 3.75 (6H, s, COOCH₃), 7.6-8.0 (4H, m, CH arom.). HPLC: 99% de pureza.

Paso F

Síntesis del ester N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]pseudoglutámico (compuesto 3)

Se agitó durante 30 minutos a 70°C una mezcla de 7 g (27.4 mmol) de 2,4-diamino-6-bromometilpteridina 2 y 7 g (23.4 mmol) de dimetil N[4-metil-amino]benzoil]pseudoglutamato 1 en 70 ml de N,N-dimetilacetamida y se dejó reposar a temperatura ambiente toda la noche protegido de la luz, luego se calentó de nuevo durante 10 minutos a 100°C. La reacción se controló por TLC. Tras enfriarla, la mezcla de reacción se vertió en agua acidificada con AcOH a pH 4 (1000 ml). El precipitado amarillo oscuro formado se filtró y lavó tres veces con agua y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 2.6 g de producto naranja-amarillo, m.p. 200-210°C. El filtrado se trató con NaHCO₃ al 10%, y el precipitado formado se separó de la misma forma, resultando en una segunda fracción de dimetil ester 3 (2 g). Rendimiento total: 36%. La TLC (4:1 cloroformo-metanol) mostró una sola mancha, Rf 0.48. Espectro UV: 210, 332 (0.1 N HCl); 238,335 (MeOH).

Ejemplo 2

Síntesis del ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]pseudoglutámico (compuesto 4)

Se añadió en porciones 1 g (2.1 mmol) de dimetil ester 3 a una solución de 10 ml de NaOH 2N y 25 ml de etanol, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El precipitado formado se filtró y disolvió en agua destilada. La solución alcalina se trató con carbón, se filtró y se ajustó el pH a 4.5 con AcOH al 10%. El precipitado se filtró y lavó con agua a pH 4.5, luego con acetona, resultando en 0.8 g de compuesto 4 (rendimiento del 85%). El producto, un sólido marrón, se purificó por HPTLC (Cromatografía de Capa Fina de Alto Rendimiento). Tras elución con 50:50:5 CH₃CN-H₂O-NH₄OH, se extrajo el diácido a partir de gel de sílice con 100 ml de solución de NaOH a pH 8.0. Se eliminó el agua por congelación seca. La TLC (7:2:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH) mostró una sola mancha, Rf 0.80. Espectro de masas: m/z 120 (M+, 100%). Espectro IR (KBr): 1651 (COCH₂), 1594 (C=C), 1563, 1403 (C=O ácido), 1176 (C-O), 823 (CH). Espectro UV: 242, 332 nm (0.1 N HCl); 232, 259, 325 nm (0.1 N NaOH); 229, 262, 318 (MeOH). ¹H NMR: 1.6 (3H, m, CH-CH₂), 2.2 (2H, t, CH₂CH₂COOH), 2.9 (2H, m, COCH₂), 4.6 (2H, s, CH₂NH), 6.8-7.8 (4H, m, CH arom.), 9, (1H, s, 7-CH). HPLC: 97% de pureza.

Se pueden producir otros compuestos de fórmula I por adaptación de los procedimientos arriba descritos en una forma apropiada. Por ejemplo, el intermediario 1 y compuestos análogos pueden ser convertidos en sus correspondientes derivados N-metilo por reacción con formaldehído y cianoborohidrato sódico. El intermediario 6 también puede ser producido por reacción de cianoacetato de etilo con acrilato de etilo de acuerdo a procedimientos clásicos.

Ejemplo 3

Inhibición in vitro de DHFR

Utilizando un ensayo clásico de inhibición de enzima DHFR, se midió la habilidad de los compuestos de fórmula I para inhibir la dihidrofolato reductasa (DHFR) *in vitro*. La enzima DHFR se purificó de hígados de rata o se utilizó la DHFR disponible comercialmente, ésta producida por expresión recombinante en *E. Coli*. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron a 37°C por monitorización de los cambios en la absorbancia de UV a 340 nm de una solución que contiene ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico 50 mM (pH 7.0), EDTA 1 mM, 2-mercaptoeta-

ES 2 308 749 T3

5 nol 75 μM , albúmina sérica bovina 0.1%, dihidrofolato 20 μM , y NADPH 100 μM . Las reacciones se iniciaron por adición de dihidrofolato. Cada titración del inhibidor se llevó a cabo dos veces, y la actividad media de DHFR se representó contra la concentración del inhibidor para obtener valores de IC_{50} . La proporción IC_{50} (compuesto)/ IC_{50} (MTX) se designó como IC_{50} relativa y los resultados de un experimento representativo (sacado de 5 experimentos) para los compuestos 438 y 497 relativos al metotrexato (MTX) se muestran en la Tabla 1. Los resultados obtenidos sugieren que muchos de los compuestos de fórmula I probados poseen una potencia *in vitro* similar a la del MTX.

10 TABLA 1

15 Compuesto	Fórmula Química	IC_{50} Relativa
MTX		1
20 438	Compuesto 4, $\text{R}^3 = \text{H}$	12.5
497	Compuesto 4	0.75

25 N.B. el compuesto 4 tiene la misma estructura que el compuesto 4 de la Figura 1 excepto que R^3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$) es reemplazado por H.

Ejemplo 4

30 *Toxicidad in vitro*

35 Se ensayó la toxicidad de los compuestos de fórmula I frente a un número de líneas celulares tumorales (CCRF-CEM, HepG2, HeLa, KB, L1210, A549 y COLO205) por medición de la viabilidad celular a diferentes tiempos tras adición del medicamento hasta las 72 horas, y se comparó con la correspondiente toxicidad del metotrexato y del pemetrexed (obtenido como Alimta[®]). Los compuestos de fórmula I demostraron potentes efectos inhibitorios frente al crecimiento de todas las líneas celulares analizadas, con los efectos inhibitorios más fuertes vistos frente a la línea celular L1210. Comparado con el metotrexato y el pemetrexed, los compuestos de fórmula I manifestaron efectos inhibitorios más fuertes o similares frente a todas las líneas celulares, y en algunos casos el comienzo de la citotoxicidad fue más rápida. Además, se encontró que los compuestos de fórmula I donde B = $-\text{CH}_2\text{NH}-$ eran particularmente citotóxicos.

45 La citotoxicidad no revertía por adición de purinas, como hipoxantina, o por adición de aminoimidazol carboxamida (a concentraciones muy altas), pero revertía por adición de leucovorina, indicando que la citotoxicidad se debe a antagonismo del mecanismo relacionado con el folato. De acuerdo con un mecanismo de acción propuesto en el que DHFR es la diana principal, la adición de timidina revertía la citotoxicidad inducida por los compuestos de fórmula I sólo a altas concentraciones. no obstante, estos efectos indican una inhibición específica de la síntesis *de novo* de purinas y una inhibición menos significativa del ciclo del timidilato más pronunciadas que en el caso del metotrexato. Los compuestos de fórmula I también inhibían la glicinamida ribonucleótido transformilasa en un rango de concentración comparable al metotrexato.

Ejemplo 5

55 *Inhibición de tumores en modelos animales in vivo*

La habilidad de los compuestos de fórmula I para inhibir el crecimiento de tumores en ratones se ensayó como sigue. Se inyectaron subcutáneamente 5×10^6 células L 1210 en una región axilar de ratones DBA/2 (grupo de 8 ratones/tratamiento). Tras la administración intraperitoneal de una solución salina sola o de una solución salina que contenía el compuesto de fórmula I, se midió, al tiempo indicado, la longitud y anchura del tumor control (que sólo recibió salino) y se comparó con aquellos tumores de animales que recibieron el compuesto prueba para calcular el porcentaje de inhibición. La administración intraperitoneal de la solución salina que contiene el compuesto prueba, diariamente durante 6 días, llevó al 60% de supervivientes de larga duración libres de tumor (peso del tumor cero). Los tiempos de supervivencia medios para los animales control tratados con salino y los animales que recibieron el Compuesto 4 (0.5 mg/kg) fueron de 6.7 y 15.6 días, respectivamente. La administración oral de compuesto requiere de dosis del inhibidor más altas y lleva a una reducción del peso del tumos menos marcada pero todavía significativa y a un 25% de supervivientes de larga duración en comparación con el grupo control tratado con salino.

ES 2 308 749 T3

Los compuestos de fórmula I eran también activos *in vivo* frente al carcinoma W256 (TGI = 28%) debido a la alta solubilidad y con ello el transporte pasivo al interior del tumor en comparación con otros agentes anti-folato. Los tiempos de supervivencia medios para los animales control tratados con salino y para los animales que recibieron el Compuesto 4 (1 mg/kg) en el modelo intraperitoneal tumoral de rata Walker-256 fueron de 22.5 y > 46.3 días, respectivamente.

La evolución del tumor se midió siguiendo distintos regímenes de tratamiento y los resultados se resumen en la Tabla 2.

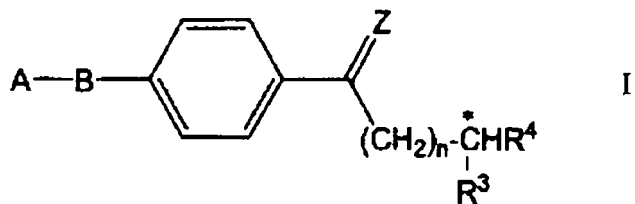
TABLA 2

Efecto de varias concentraciones del Compuesto 4 en un modelo tumoral de rata

Grupo	Tratamiento	Nº de animales que sobreviven a día 30 tras el trasplante	Volumen del tumor (cm ³) +/- SE
1	Control Salino	2/10	37.3 +/- 0.3
2	0.5 mg/kg – 3 dosis cada 4 días	9/10	13.4 +/- 3.07
3	0.25 mg/kg – 3 dosis cada 4 días	8/10	23 +/- 3.5
4	0.1 mg/kg – 5 dosis cada día	10/10	14.5 +/- 3.8
5	1 mg/kg – una dosis	8/10	17.1 +/- 3.3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



15 donde:

Z = O ó S;

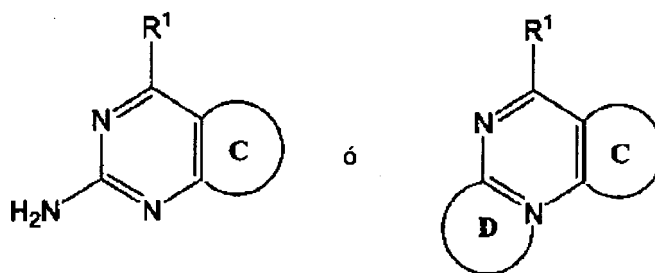
N = 1 - 3;

20 $R^3 = -CO_2R^8, -C(O)SR^8, -C(O)NHR^8, -C(S)OR^8, -C(S)SR^8, -C(S)NHR^8, -C(NH)SR^8,$ o $-C(NH)NHR^8$, donde R^8 es -H o alquilo;

25 $R^4 = -H, -CH_2R^5$ o $-CH_2CH_2R^5$, donde R^5 tiene independientemente uno de los significados de R^3 ;

30 B = $-NR^2-, -CH_2NR^2-, -CH_2CH_2NR^2-, -CH_2CHR^7-$ o $-CH_2O-$, donde R^2 es H o un grupo alquilo C_{1-3} , alqueno o alquino, y R^7 es H o un grupo alquilo C_{1-3} o alcoxi;

A =



45 donde

$R^1 = -NH_2$ o $-OH$,

C y D son cada uno, independientemente, un anillo aromático o no aromático sustituido o no sustituido de 5 o 6 eslabones, que puede también contener uno o más heteroátomos, y C está conectado al grupo B en cualquier posición disponible.

50 2. Un compuesto según la reivindicación 1, donde Z es O.

3. Un compuesto según la reivindicaciones 1 y 2, donde n es 1.

55 4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^8 es -H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo o butilo terciario.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^3 es $-COR^8$ y R^4 es $-CH_2CH_2CO_2R^8$.

6. Un compuesto según la reivindicación 5, donde R^8 es H, metilo o etilo.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde B es $-CH_2NR^2-, -CH_2CHR^7-$ o $-CH_2O-$.

8. Un compuesto según la reivindicación 7, donde B es $-CH_2NR^2-$.

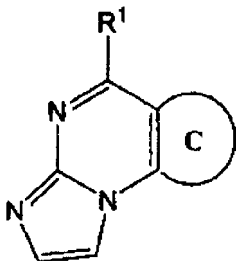
65 9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^2 es -H, -Me, -Et o $-CH_2C\equiv CH$.

10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^7 es -H, -Me, -Et o -OMe.

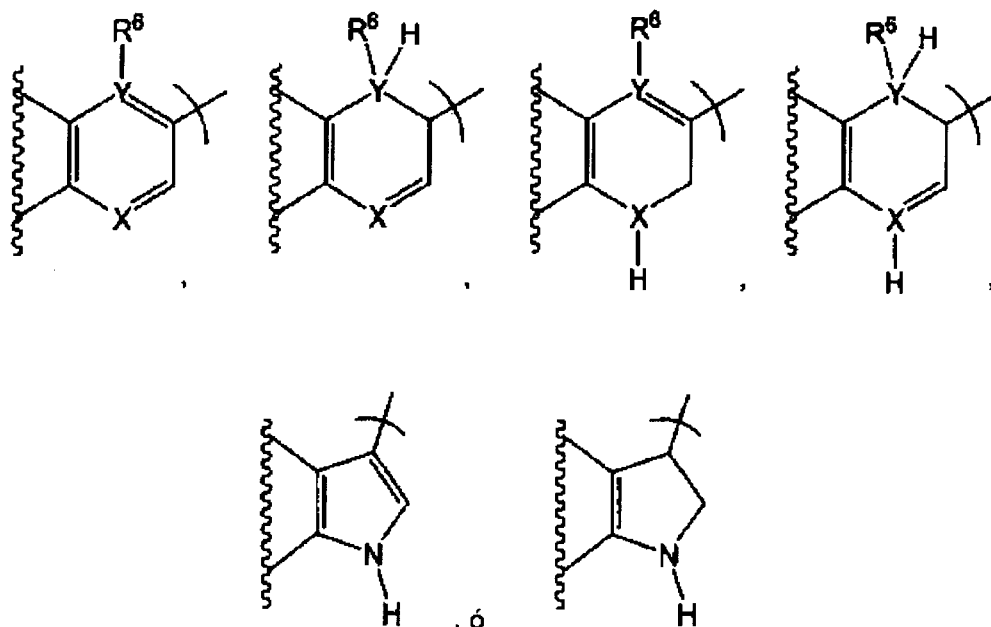
ES 2 308 749 T3

11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde D es un anillo aromático de 5 eslabones.

12. Un compuesto según la reivindicación 11, donde A es



13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde C es:



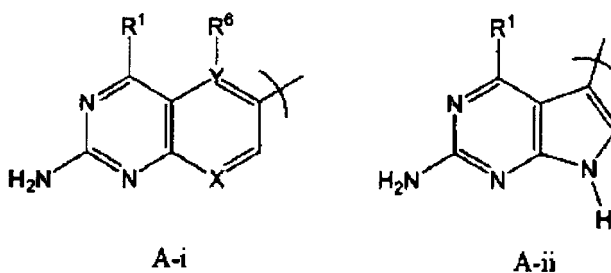
donde X es CH o N, y cada:

donde X es CH o N, y cada:

Y es C y R⁶ es H, Me, Et o HCO; o

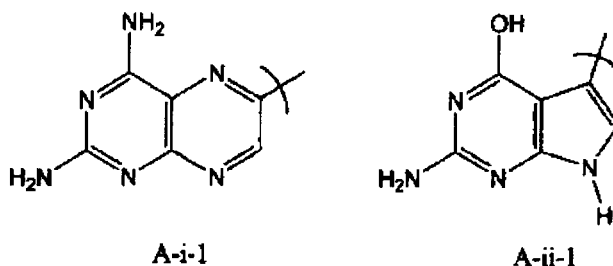
Y es N y R⁶ es un solo par de electrones.

14. Un compuesto según la reivindicación 13, donde A es de la fórmula A-i o A-ii:



ES 2 308 749 T3

15. Un compuesto según la reivindicación 14, donde A es de la fórmula A-i-1 o A-ii-1:



16. Un compuesto según la reivindicación 15, donde B es $-\text{CH}_2\text{NR}^2-$; R^2 es -H, -Me, -Et o $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, Z es O, n es 1; y R^3 es $-\text{CO}_2\text{R}^8$.

17. Un compuesto según la reivindicación 14, donde B es $-\text{CH}_2\text{NR}^2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_3-$ o $-\text{CH}_2\text{O}-$, R^2 es -H, -Me, -Et o $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; Z es O; n es 1; R^3 es $-\text{CO}_2\text{R}^8$; R^4 es -H o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}^8$; R^8 es independientemente -H, -Me o -Et; si A es A-i e Y es C, R^6 es -H; y si A es A-ii, R^1 es -OH.

18. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en terapia.

19. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20. Uso de un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 18 para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una condición responsable de la inhibición de una enzima dependiente sobre el ácido fólico o un derivado del ácido fólico.

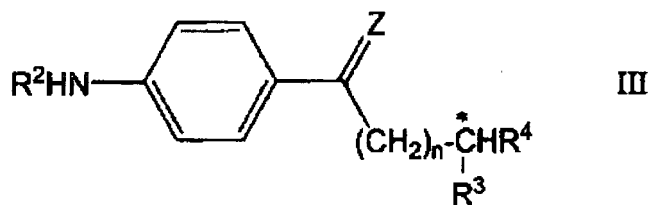
21. Uso de un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 18 para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer.

22. Un método de preparación de un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende el paso de:

(a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula II



donde A es como se define en la reivindicación 1, m es 0, 1 o 2 y X es un grupo saliente, con un compuesto de la fórmula III



donde Z, n, R^2 , R^3 y R^4 son como se definen en la reivindicación 1;

(b) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula IV

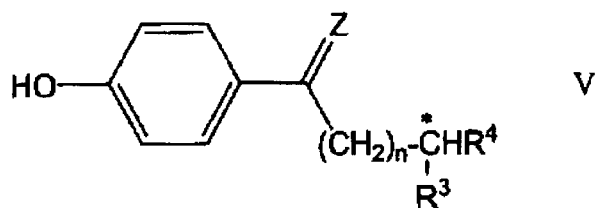


ES 2 308 749 T3

donde A es como se define en la reivindicación 1 y X es un grupo saliente, con compuesto de la fórmula V

5

10



15

donde Z, n, R³ y R⁴ son como se definen en la reivindicación 1; o

(c) convertir uno de las siguientes compuestos VI o VII en su correspondiente reactivo organometálico

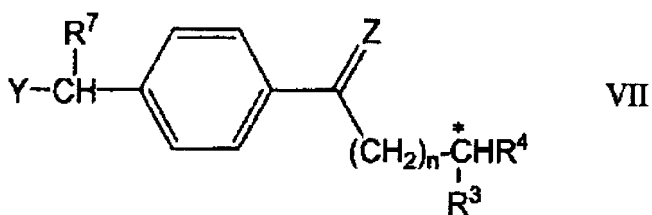
20



VI

25

30



35

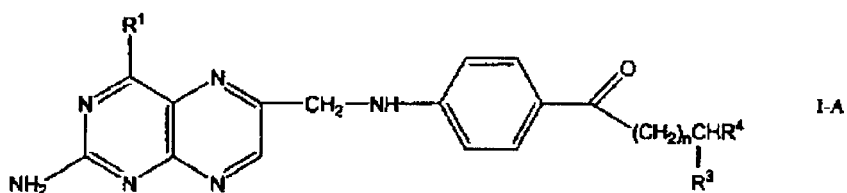
donde A, Z, n, R³, R⁴ y R⁷ son como se definen en la reivindicación 1, e Y es, independientemente en cada caso, un halógeno, y hacer reaccionar dicho reactivo con el otro de los compuestos VI o VII.

40

23. Un método de preparación de un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, que tiene la fórmula I-A o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

45

50

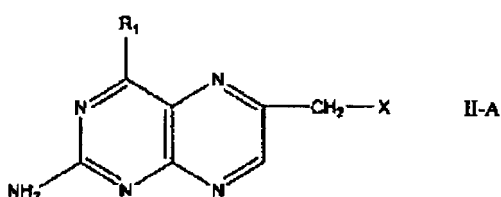


55

donde n, R³, R³ y R⁴ son como se definen en la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula II-A

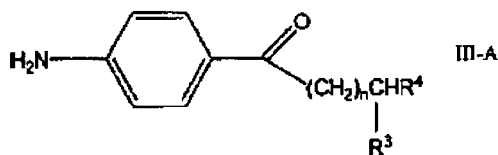
60

65



ES 2 308 749 T3

donde X es Cl, Br o I, con con compuesto de la fórmula III-A



24. Un compuesto de la fórmula V o VII, tal como se define en la reivindicación 22, donde R⁴ es -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵.

15 25. Un compuesto de la fórmula III, tal como se define en la reivindicación 22, donde R⁴ es -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵ y R² es un grupo alquilo C₁₋₃, alquenilo o alquinilo.

20 26. Un compuesto de la fórmula III, tal como se define en la reivindicación 22, donde R⁴ es -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵ y Z es S.

27. Un compuesto de la fórmula III, tal como se define en la reivindicación 22, donde R⁴ es -CH₂R⁵.

25 28. Un compuesto de la fórmula III, tal como se define en la reivindicación 22, donde R³ es -C(O)SR⁸, -C(O)NHR⁸, -C(S)OR⁸, -C(S)SR⁸, -C(S)NHR⁸, -C(NH)SR⁸ o -C(NH)NHR⁸.

29. Un compuesto de la fórmula III, tal como se define en la reivindicación 22, donde R⁵ es -C(O)SR⁸, -C(O)NHR⁸, -C(S)OR⁸, -C(S)SR⁸, C(S)NHR⁸, -C(NH)SR⁸ o -C(NH)NHR⁸.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

