



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 291 120**

② Número de solicitud: 200601111

⑤ Int. Cl.:
C07F 1/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

② Fecha de presentación: **03.05.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2008**

Fecha de la concesión: **25.11.2008**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
30.10.2008

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

⑦ Titular/es: **Universitat de les Illes Balears**
Campus Universitario
Ctra. Valldemossa, Km. 7,5
Edificio Son Lledó
07071 Palma de Mallorca, Baleares, ES

⑦ Inventor/es: **Terrón, Ángel;**
García Raso, Ángel;
Escribá, Pablo V.;
Barceló Oliver, Miquel;
Martínez, Jordi;
Lladó, Victoria;
López, Iván;
Gutiérrez, Antonio y
Molins, Elies

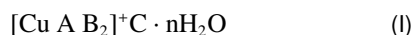
⑦ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑤ Título: **Síntesis y utilización del complejo ternario Cu-fenantrolina-ácido iodohipúrico y compuestos relacionados como fármacos antitumorales.**

⑤ Resumen:

Síntesis y utilización del complejo ternario Cu-fenantrolina-ácido iodohipúrico y compuestos relacionados como fármacos antitumorales.

La presente invención se refiere a complejos ternarios formados por Cu(II), 1,10-fenantrolina o 2,2-bipiridilo y diferentes ácidos hipúricos de fórmula general (I):



donde A se selecciona de entre: I-hip, Hip, BGG y B¹GG; B se selecciona de entre: phen y bpy; C se selecciona de entre I-hip⁻, Hip⁻, B¹GG⁻, BGG⁻ y I⁻; y n, si existe, son las aguas de cristalización que pueden variar entre 1 y 7. Dichos compuestos en disolución presentan una gran estabilidad en forma de complejos de Cu(I), que actúan a nivel de ADN y, por tanto, son útiles como agentes antitumorales, en particular en cáncer humano y especialmente cáncer de pulmón.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Síntesis y utilización del complejo ternario Cu-fenantrolina-ácido iodohíprico y compuestos relacionados como fármacos antitumorales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a complejos ternarios formados por Cu(II), 1,10-fenantrolina o 2,2-bipiridilo y diferentes ácidos hipúricos, al procedimiento de su preparación y a la utilización de los mismos como agentes antitumorales, en particular en el cáncer de humano, todavía más especialmente en el cáncer de pulmón.

10 **Antecedentes de la invención**

Recientemente se han descrito compuestos de Cu(II) con 1,10-fenantrolina (*orto*-fenantrolina, phen) que presentan diversas actividades clínicas como antitumorales (Casiopinas), antimicobacterianas, antifúngicas y antimicrobianas.

En las Patentes Europeas EP 0434444 y EP 0434445 se describen casiopinas que son complejos, en los que un átomo de cobre está unido a una única molécula de fenantrolina (con diferentes sustituyentes) y a un aminoácido enlazado de forma quelante por el N del grupo amino y el oxígeno del grupo carboxílico. Dichos compuestos utilizan aminoácidos/péptidos libres con una coordinación plano-cuadrada, con lo cual es muy improbable que los complejos [Cu(N,N-fenantrolina)(N,O-aminoácido)] puedan generar el compuesto bisfenantrolinacobre(I) en disolución, como mínimo, en las cantidades y la cinética favorable de la presente invención.

Con respecto a las propiedades antimicobacterianas de los compuestos de Cu(II) con 1,10-fenantrolina, véase D.K. Saha, U. Sandbhor, K. Shirisha, S. Padhye, D. Deobagkar, C.E. Ansond, A.K. Poweld, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3027-3032.

Con respecto a las propiedades antimicrobianas, véase M.A. Zoroddu, S. Zanetti, R. Pogni, R. Basosi, J. Inorg. Biochem. 63 (1996) 291-300.

Con respecto a las propiedades fungicidas, véase G. Majella, S. Vivienne, M. Malachy, D. Michael, M. Vickie, Polyhedron 18 (1999) 2931-2939.

En la técnica también se conoce la acción de compuestos derivados de la fenantrolina como intercaladores del ADN [K.E. Erkkila, D.T. Odom, J.K. Barton, Chem. Rev. 99 (1999) 2777-2796].

También se conoce que algunos complejos de bisfenantrolina-cobre presentan actividad de hidrólisis de ácidos nucleicos (S. Zhang, Y. Zhu, C. Tu, H. Wei, Z. Yang, L. Lin, J. Ding, J. Zhang, Z. Guo, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 2099-2116, y sus referencias, aunque en todos los casos descritos es necesaria para este tipo de actividad la presencia de:

- a) tioles y peróxido de hidrógeno.
- b) reductores y presencia de aire.
- c) en condiciones fisiológicas, la presencia de un reductor o irradiación con luz ultravioleta o visible.

Sin estos condicionamientos no se produce la formación del complejo estimado como activo [Cu(phen)₂]⁺, tal y como se ha demostrado por ESI-HRMS a partir del complejo [Cu(gly-L-trp)(phen)] (véase, A. García Raso, J.J. Fiol, B. Adrover, V. Moreno, I. Mata, E. Espinosa, E. Molins, J. Inorg. Biochem. 95 (2003) 77-86). En dichas referencias se parte de complejos enlazados a una única molécula de fenantrolina y un aminoácido/péptido, intentando imitar la estructura de las casiopinas. Dichos complejos disueltos en etanol y sin la presencia de agente reductor originan complejos de cobre en estado de oxidación (I) [Cu(phen)⁺], causantes de la hidrólisis del ADN.

Muy recientemente, J. Kang, J. Chen, Y. Shi, J. Jin, Z. Wang, J. Biol. Inorg. Chem. 10 (2005) 190-198, han descrito la inducción de apoptosis en células de hematoma humano mediante fenantrolina en presencia de una sal de Cu(II) debida a una hipacetilación de las histonas (siempre en presencia de oxígeno).

En ninguno de los documentos anteriores se describen complejos ternarios de Cu(II), 1,10-fenantrolina (2,2-bipiridilo) y diferentes ácidos hipúricos que permiten obtener en disolución acuosa o etanólica durante un periodo mínimo de 24 horas la especie bisfenantrolina (I) que es posiblemente la responsable de la hidrólisis del ADN y sus efectos antitumorales.

En el documento de los presentes inventores "Study of the interaction of ternary compounds of the type [Cu(o-iodohippurato)(phen)₂]⁺ or [Cu(o-iodohippurato)(bpy)₂]⁺ with DNA" (resumen de un póster presentado en EURO-BIC7 European Biological Inorganic Chemistry Conference en Garmisch-Partenkirchen del 28-9-2004 al 2-9-2004) se mencionan dos complejos, cuya caracterización y método de síntesis se desarrollan en la presente invención.

ES 2 291 120 B2

En el documento "Synthesis, structure and nuclease properties of several ternary Copper (II) peptide complexes with 1,10-phenantroline" (Journal of Inorganic Biochemistry 95 (2-3): 77-86 (2003) se describen complejos ternarios de cobre, fenantrolina y dipéptidos, diferentes a los de la invención, que originan complejos de cobre (I) sin presencia de agente reductor pero sin afirmar que dicho complejo es estable más de 24 horas, que es una de las características básicas de la presente invención.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a complejos ternarios formados por Cu(II), 1,10-fenantrolina o 2,2-bipiridilo y diferentes ácidos hipúricos.

Otro objeto de la presente invención es el procedimiento para la síntesis de dichos complejos.

Aún otro objeto de la presente invención es la utilización dichos complejos como agentes antitumorales.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la representación ORTEP al 50% de probabilidad del complejo $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{phen})_2]^+(\text{I-hip}^-) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La figura 2 muestra la representación ORTEP del complejo $[\text{Cu}(\text{I-Hip})(\text{bpy})_2]^+(\text{I}^-) \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$.

La figura 3 muestra la representación ORTEP del complejo $[\text{Cu}(\text{Hip})(\text{phen})_2]^+(\text{Hip}^-) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

La figura 4 muestra la representación ORTEP del complejo $[\text{Cu}(\text{B}^1\text{GG})(\text{bpy})_2]^+(\text{I}^-) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

La figura 5 muestra el estudio cinético por ESI-HRMS de la generación en disolución acuosa de la especie de cobre (I) $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ sin la adición de ningún otro agente.

La figura 6 muestra el efecto del $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ sobre la proliferación de células de cáncer A549.

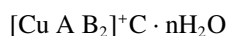
La figura 7 muestra el estudio de la fase del ciclo celular, en el cual la distribución de poblaciones celulares se estudió mediante citometría de flujo en células A549 cultivadas en ausencia o presencia del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$, tras la tinción con bromuro de etidio.

La figura 8 muestra fotografías de a) células tratadas con el complejo $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{phen})_2]^+(\text{I-hip}^-) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a diferentes concentraciones, entre 0 y 5 micromolar (1ª línea, 45x; 2ª línea 180x) y b) la fragmentación de la PARP obtenida mediante la técnica de Western blot.

La figura 9 muestra la viabilidad determinada mediante la técnica del azul de tripán en células tratadas durante 24 horas con los compuestos indicados en el gráfico a diferentes concentraciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto ternario caracterizado por la fórmula general (I):



donde

A se selecciona de entre: I-hip, Hip, BGG y B¹GG;

B se selecciona de entre: phen y bpy;

C se selecciona entre I-hip⁻, Hip⁻, B¹GG⁻, BGG⁻ y I⁻; y

n, si existe, son las aguas de cristalización que pueden variar entre 1 y 7, para su utilización como agente antitumoral.

Preferiblemente, de dicha fórmula se excluyen los compuestos ternarios $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{phen})_2](\text{I-hip}^-) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{bpy})_2](\text{I-hip}^-) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

En dicha fórmula Cu representa iones de Cu(II), phen representa 1,10-fenantrolina, bpy representa 2,2-bipiridilo y con respecto a los diferentes ácidos hipúricos (aminoácidos o péptidos en los que se ha protegido el grupo NH₂ terminal mediante la sustitución de uno de los hidrógenos por un grupo benzoilo (o sus análogos con sustitución de algún hidrógeno por yodo: *orto*-iodobenzoilo, *meta*-iodobenzoilo o *para*-iodobenzoilo)), Hip representa benzoil-

ES 2 291 120 B2

glicinato, BGG representa benzoilglicilglicinato, B¹GG representa orto-benzoilglicilglicinato, I-hip⁻ representa *orto*-iodobenzoilglicinato.

En particular, la presente invención se refiere a [Cu(Hip)(phen)₂]⁺(Hip⁻)-2H₂O, [Cu(BGG)(phen)₂]⁺(BGG⁻)-6H₂O, [Cu(B¹GG)(bpy)₂]⁺(I⁻)-5H₂O, [Cu(B¹GG)(phen)₂]⁺(B¹GG⁻) y [Cu(I-hip)(bpy)₂]⁺(I-hip⁻)-1,5H₂O.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento para la síntesis de complejos ternarios del tipo cobre(II)-ácido hipúrico-ligando que comprende las etapas de:

a) Preparación de una suspensión de carbonato básico de cobre y ácido hipúrico seleccionado entre I-hip, Hip, BGG y B¹GG en agua;

b) Calentamiento a reflujo de la suspensión preparada;

c) Adición a la suspensión preparada en la etapa b) del ligando seleccionado entre 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridilo;

d) Filtración de la disolución formada en la etapa c) y posterior enfriamiento para obtener un producto cristalizado.

A continuación, se describirán a modo de ejemplo las características físico-químicas y el proceso de síntesis de diferentes compuestos de la invención sin pretender que limiten el alcance de la invención.

Caracterización físico-química de los compuestos y procesos de síntesis de los mismos

Tal y como se indica en cada ejemplo, las preparaciones con yoduro como contraión se han realizado con el fin de modificar la solubilidad de los distintos productos y conseguir una mejor cristalización (posibilitar la resolución de la estructura mediante difracción de Rayos X).

Las preparaciones están expresadas en cantidades molares, pudiendo escalarse las reacciones si se conservan las relaciones reactivo/disolvente.

Puede haber diferencias en las cantidades de agua presentes entre las estructuras cristalinas y las muestras usadas para la caracterización completa de los compuestos. En algunos casos, algunas muestras pueden estar húmedas (aguas de hidratación), pero sobretodo en algunos casos las muestras pierden aguas de cristalización inmediatamente al contacto con el aire, debiéndose insertar los cristales adecuados (rayos X) en vaselina para evitar su degradación, siendo imposible esta protección para las demás técnicas utilizadas.

Los compuestos se caracterizaron mediante microanálisis elemental con un analizador Carlo Erba modelo 1108.

Adicionalmente, los compuestos se caracterizaron por difracción de rayos X de monocristal en un difractor Enraf-Nonius CAD4 que produce una radiación monocromada de molibdeno K α . El índice de los parámetros de celda se realizó con 25 reflexiones al azar. Los datos se recogieron con el modo de escaneo ω -2 θ . Las correcciones de absorción se realizaron siguiendo el escaneo PSI semiempírico y el empírico DIFABS. La resolución estructural se realizó utilizando el sistema de programas WINGX. La estructura se resolvió utilizando los programas SIR2002 y el refinamiento mediante el método de matrices totales SHELXL97. Los átomos no hidrogenoides se refinaron anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno se introdujeron en posiciones calculadas y se prosiguió el refinamiento con sus átomos de referencia.

Los compuestos obtenidos también se caracterizaron mediante espectroscopia de masas de alta resolución con ionización por electrospray (ESI-HRMS) a partir de disoluciones acuosas o etanólicas a concentraciones de 0,2 mg/ml. El resultado más importante es que en todos los casos se detecta el pico correspondiente al complejo de cobre (I) [Cu(phen)₂]⁺ (o el equivalente con bipiridilo).

Ejemplo 1



Obtención

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; Cu(CO₃)-Cu(OH)₂], 3 mmol de ácido *orto*-iodohipúrico [I-hipH] y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que tuviera lugar la reacción.

ES 2 291 120 B2

Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadió 3 mmol de 1,10-fenantrolina al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado. Se obtuvieron cristales azules intensos de forma rómbica.

Estructura de Rayos X

La estructura coincide con la fórmula $[Cu(I-hip)(phen)_2]^+(I-hip)^- \cdot 7H_2O$.

La estructura cristalina (figura 1) muestra al cobre (I) con una geometría de octaedro distorsionado enlazado al anión carboxilato con una distancia corta y una muy larga [distancias: Cu-O: O(1), 1,975(6) y O(2), 2,82 Å] y a los cuatro nitrógenos de las dos moléculas de fenantrolina [distancias: Cu-N: N(1'), 1,992(7); N(10'), 2,206(7); N(1''), 2,062 (7) y N(10''), 1,991(7) Å]. El complejo presenta una carga positiva que es compensada con otro anión iodohipurato. Siete moléculas de agua por fórmula unidad están presentes en la unidad asimétrica formando una estructura 3D mediante diversos enlaces de hidrógeno. La estructura tridimensional se forma por planos alternativos de iones positivos y negativos. Es interesante también observar interacciones por apilamiento entre los anillos de fenantrolina (distancia, 3,39 Å; ángulo diédrico, 177,5°), e interacciones C-I...C (anillo) similares a interacciones C-H...I [distancia 3,60 y 3,55 Å] entre un átomo I(7) de un fragmento aniónico y los carbonos C(9)-C(10) de un fragmento catiónico.

Para el resto de compuestos no se dispone de un refinamiento definitivo, pero aún así no hay duda del entorno de coordinación.

A continuación, en la Tabla 1 se muestra un resumen de los parámetros de difracción para el complejo

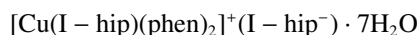


TABLA 1

Resumen de los parámetros de difracción de $[Cu(I-hip)(phen)_2]^+(I-hip)^- \cdot 7H_2O$

	$[Cu(I-hip)(phen)_2]^+(I-hip)^- \cdot 7H_2O$
Fórmula empírica	$C_{22}H_{44}CuI_2N_6O_{13}$
Peso molecular	1158,17
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unidad	a = 12,845(8) Å b = 14,598(7) Å c = 15,253(11) Å $\alpha = 63,61(3)^\circ$ $\beta = 67,06(4)^\circ$ $\gamma = 68,12(4)^\circ$
Volumen	2289(2) Å ³
Z	2

ES 2 291 120 B2

Densidad (calculada)	1,680 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	1,895 mm ⁻¹
F(000)	1154
Tamaño de cristal	0,36 x 0,35 x 0,14 mm ³
Rango de Theta para la toma de datos	1,55 a 24,99°
Rango de índices	-14 ≤ h ≤ 15, -15 ≤ k ≤ 17, 0 ≤ l ≤ 18
Reflexiones recogidas	8354
Reflexiones independientes	8021 [R(int) = 0,0393]
Completado	99,5%
Transmisión más y mín.	0,7773 y 0,5487
Datos/restricciones/Parámetros	8021 / 0 / 577
GoF a F ²	1,062
Índice R final (I>2sigma(I))	R1 = 0,0604, wR2 = 0,1560
Índice R (totalidad de los datos)	R1 = 0,1104, wR2 = 0,1806
Coefficiente de extinción	---
Mayor pico y agujero de difracción	0,747 y -1,447 e.Å ⁻³

40 *Análisis elemental*

		%C	%H	%N
teórico	C ₄₂ H ₄₄ CuI ₂ N ₆ O ₁₃	43,56	3,83	7,26
experimental		43,54	3,64	7,10

50

Espectro de masas de alta resolución (ESI-HRMS)

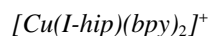
55

		masa exacta monoisotópica	
		teórica	experimental
[Cu(I-hip)(phen) ₂] ⁺	C ₃₃ H ₂₃ CuIN ₅ O ₃	727,0142	727,0167
[Cu(phen) ₂] ⁺	C ₂₄ H ₁₆ CuN ₄	423,0671	423,0676

65

ES 2 291 120 B2

Ejemplo 2



5 Obtención

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; $Cu(CO_3) \cdot Cu(OH)_2$], 3 mmol de ácido *orto*-iodohipúrico [I-hipH] y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que la reacción tenga lugar.

15 Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadió 3 mmol de 2,2'-bipiridilo al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado.

15 Análisis elemental

Coincide con la fórmula $[Cu(I-hip)(bpy)_2]^+(I-hip)^- \cdot 5H_2O$.

20

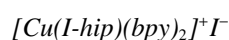
		%C	%H	%N
teórico	$C_{38}H_{40}CuI_2N_6O_{11}$	42,49	3,75	7,82
25 experimental		42,50	3,54	7,80

Espectro de masas de alta resolución (ESI-HRMS)

30

		masa exacta monoisotópica	
		teórica	experimental
35 $[Cu(I-hip)(bpy)_2]^+$	$C_{33}H_{23}CuIN_5O_3$	descompone dando más señales	
40 $[Cu(bpy)_2]^+$	$C_{20}H_{16}CuN_4$	375,0771	375,0619

Ejemplo 3



45 Obtención

La síntesis se realizó de igual manera que para el ejemplo 2, pero una vez finalizada la preparación se añadió a la disolución un exceso de yoduro potásico KI y se volvió a filtrar. A continuación, se dejó reposar la mezcla durante dos días. En este producto el catión $[Cu(I-hip)(bpy)_2]^+$ es idéntico al anterior, simplemente se modifica su solubilidad mediante el cambio de contraión.

Estructura de Rayos X

La estructura coincide con la fórmula $[Cu(I-hip)(bpy)_2]^+(I^-) \cdot 1,5H_2O$.

55

Análisis elemental

60

		%C	%H	%N
teórico	$C_{29}H_{26}CuI_2N_5O_{4,5}$	41,77	3,14	8,40
65 experimental		43,47	2,94	8,02

A continuación, en la Tabla 1 se muestra un resumen de los parámetros de difracción para el complejo $[Cu(I-hip)(bpy)_2]^+(I^-) \cdot 1,5H_2O$.

ES 2 291 120 B2

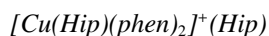
TABLA 2

Resumen de los parámetros de difracción de [Cu(I-hip)(bpy)₂]⁺(I⁻)·1,5H₂O

5		[Cu(I-hip)(bpy) ₂] ⁺ (I ⁻)·1,5H ₂ O
	Fórmula empírica	C ₅₈ H ₅₂ Cu ₂ I ₄ N ₁₀ O ₉
10	Peso molecular	1667,78
	Temperatura	294(2) K
	Longitud de onda	0,71073 Å
15	Sistema cristalino	Monoclínico
	Grupo espacial	P 21/n
20	Dimensiones de la celda unidad	a = 15,912(3) Å
		b = 17,705(4) Å
		c = 22,472(4) Å
25		α = 90°
		β = 101,474(14)°
		γ = 90°
30	Volumen	6204(2) Å ³
	Z	4
	Densidad (calculada)	1,785 Mg/m ³
35	Coeficiente de absorción	2,738 mm ⁻¹
	F(000)	3248
	Tamaño de cristal	0,46 x 0,38 x 0,21 mm ³
40	Rango de Theta para la toma de datos	1,44 a 24,98°
45	Rango de índices	-18 ≤ h ≤ 18, -21 ≤ k ≤ 0, 0 ≤ l ≤ 26
	Reflexiones recogidas	11182
50	Reflexiones independientes	10888 [R(int) = 0.0397]
	Completado	99,9%
	Transmisión más y mín.	0,5971 y 0,3657
55	Datos/restricciones/ Parámetros	10888 / 0 / 748
	GoF a F ²	1,024
60	Índice R final (I>2σ(I))	R1 = 0,0666, wR2 = 0,1746
	Índice R (totalidad de los datos)	R1 = 0,1257, wR2 = 0,2099
	Coeficiente de extinción	---
65	Mayor pico y agujero de difracción	1,767 y -1,686 e.Å ⁻³

ES 2 291 120 B2

Ejemplo 4



5 Obtención

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; $Cu(CO_3) \cdot Cu(OH)_2$], 3 mmol de ácido hipúrico [HipH] y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que tuviera lugar la reacción.

15 Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadieron 3 mmol de 1,10-fenantrolina al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado.

Estructura de Rayos X

La estructura coincide con la fórmula $[Cu(Hip)(phen)_2]^+(Hip)^- \cdot 4,5H_2O$.

20 Análisis elemental

Pierde agua y cristalinidad en contacto con el agua. Coincide con la fórmula $[Cu(Hip)(phen)_2]^+(Hip)^- \cdot 2H_2O$.

25

		%C	%H	%N
teórico	$C_{42}H_{36}CuN_6O_8$	61,80	4,45	10,30
experimental		61,59	4,47	10,27

30

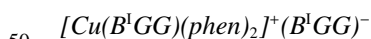
Espectro de masas de alta resolución (ESI-HRMS)

35

		masa exacta monoisotópica	
		teórica	experimental
$[Cu(Hip)(phen)_2]^+$	$C_{33}H_{24}CuN_5O_3$	601,1175	601,1172
$[Cu(phen)_2]^+$	$C_{24}H_{16}CuN_4$	423,0771	423,0883

45

Ejemplo 5



50

Obtención

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; $Cu(CO_3) \cdot Cu(OH)_2$], 3 mmol de *orto*-iodobenzoilglicina [B^1GGH] y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que tuviera lugar la reacción.

55

60 Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadieron 3 mmol de 1,10-fenantrolina al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado.

Análisis elemental

65 Se trata de un producto aceitoso, en el que aparentemente están presentes dos productos: $[Cu(B^1GG)(phen)_2]^+(B^1GG)^-$ y $[Cu(B^1GG)_2(phen)]$.

ES 2 291 120 B2

Espectro de masas de alta resolución (ESI-HRMS)

Están presentes los dos productos citados, además de detectarse de nuevo el complejo de Cu(I) $[Cu(phen)_2]^+$.

5

		masa exacta monoisotópica	
		teórica	experimental
$[Cu(B^I GG)(phen)_2]^+$	$C_{35}H_{26}CuIN_6O_4$	784,0456	784,0409
$[Cu(B^I GG)_2(phen)]Na^+$	$C_{34}H_{28}CuI_2N_6NaO_8$	987,9252	987,9205
$[Cu(phen)_2]^+$	$C_{24}H_{16}CuN_4$	423,0771	423,0849

10

15

Ejemplo 6

20



Obtención

25

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; $Cu(CO_3) \cdot Cu(OH)_2$], 3 mmol de *orto*-iodobenzoilglicina $[B^I GGH]$ y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C o superior (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que tuviera lugar la reacción.

30

Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadieron 3 mmol de 2,2'-bipiridilo al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se añadió a la disolución un exceso de ioduro potásico KI, se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado.

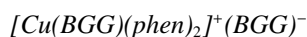
Estructura de Rayos X

35

La estructura coincide con la fórmula $[Cu(B^I GG)(bpy)_2]^+(I^-) \cdot 5H_2O$. No se ha podido realizar nada más, porque sólo ha dado unos pocos cristales y después un aceite.

40

Ejemplo 7



Obtención

45

Se colocaron 1 mmol de malaquita [carbonato básico de cobre; $Cu(CO_3) \cdot Cu(OH)_2$], 3 mmol de benzoilglicilglicina $[BGGH]$ y 100 ml de agua destilada en un matraz redondo esmerilado de 250 ml. Se calentó la mezcla con agitación a 100°C (1 atm de presión) y se dejó a reflujo (con un refrigerante para evitar la evaporación del disolvente) durante 2 horas para que tuviera lugar la reacción.

50

Pasado este tiempo, se filtró la disolución, se le añadieron 3 mmol de 1,10-fenantrolina al filtrado y se dejó hirviendo a reflujo durante dos horas más. Se volvió a filtrar en caliente la disolución y se dejó reposar a 25°C y 1 atm de presión durante 2 días para que cristalizara el producto deseado. Se obtuvieron cristales azules intensos de forma rómbica.

55

Análisis elemental

Coincide con la fórmula $[Cu(BGG)(phen)_2]^+(BGG)^- \cdot 6H_2O$.

60

		%C	%H	%N
teórico	$C_{46}H_{50}CuN_8O_{14}$	55,11	5,03	11,18
experimental		54,22	4,83	10,96

65

ES 2 291 120 B2

Spectro de masas de alta resolución (ESI-HRMS)

		masa exacta monoisotópica		
		teórica	experimental	
5	$[\text{Cu}(\text{BGG})(\text{phen})_2]^+$	$\text{C}_{35}\text{H}_{27}\text{CuN}_6\text{O}_4$	658,1390	658,1682
10	$[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{CuN}_4$	423,0771	423,0950

Estudio cinético de generación del complejo de cobre (I)

15 Se realizó un estudio cinético de la generación del complejo de cobre(I) a partir de las disoluciones de los compuestos de la invención a tiempos determinados hasta un máximo de 24 horas (figura 1). En la figura 1, se indican todas las especies detectadas siendo de gran trascendencia que después de 24 horas de disolución la especie mayoritaria es el complejo de cobre (I) $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$. Este hecho es tremendamente sorprendente ya que los complejos de cobre (I) son extraordinariamente reactivos, especialmente en disolución, en un ambiente donde pueda estar presente el oxígeno. Además, este complejo de cobre(I) se obtiene sin adición de ningún otro reactivo.

Efectos biológicos

Efectos antiproliferativos del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (análogos para $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^+$)

25 El cáncer se caracteriza por una proliferación celular descontrolada. Numerosas moléculas antitumorales ejecutan su actividad a través de la inhibición de la proliferación celular.

30 Se realizó un estudio en células de cultivo variando las concentraciones del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (obtenido tras la disolución de los compuestos de la presente invención, ver anteriormente) y se hizo un recuento del número de células en una cámara citométrica mediante el método de exclusión de azul tripán (figura 6). Se observó que a muy bajas concentraciones de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ se inhibía la proliferación de células tumorales (en particular, células A549 de adenocarcinoma pulmonar humano). Este efecto dependía de la concentración y la dosis administrada, lo cual descarta posibles efectos inespecíficos de este complejo. Por otro lado, se pudo observar que este efecto mostraba una gran potencia, ya que se obtuvo una inhibición marcada y estadísticamente significativa a concentraciones nanomolares.

Efectos pro-apoptóticos del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (análogos para $[\text{Cu}(\text{bpy})_2]^+$)

40 La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso altamente regulado que elimina las células sobrantes en un organismo. En embriones humanos, por ejemplo, se eliminan las células que forman membranas entre los dedos, residuos evolutivos que no aparecen en los sujetos maduros. En adultos, se eliminan de esta forma muchas células envejecidas, que son renovadas, y células con defectos genéticos, que puedan dar lugar a células tumorales. En muchos tipos de cáncer, los procesos apoptóticos están alterados y no se produce la muerte celular. El complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer. La figura 6 muestra la distribución de células en diferentes fases del ciclo celular en células A459 en ausencia o presencia del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$. Dicho complejo indujo un dramático efecto pro-apoptótico, ya que a muy bajas concentraciones la práctica totalidad de las células estudiadas habían entrado en apoptosis, caracterizada por la degradación del ADN y la aparición de un pico “sub G0/G1” en estudios de citometría de flujo.

50 El estudio de la apoptosis se amplió a través de análisis de microscopia y de cuantificación de la degradación de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP). Las imágenes de microscopia (figura 8) indicaron claramente la reducción de la proliferación celular (menor número de células), paralelo a un incremento en los procesos apoptóticos (pérdida de forma celular, disociación del sustrato, formación de cuerpo apoptóticos, etc.). La apoptosis es un fenómeno que implica la activación de unas proteasas denominadas caspazas, con la consiguiente degradación proteica. Uno de los primeros blancos atacados por las caspazas es la PARP. Esta proteína, de 113 kDa, se degrada inicialmente en dos fragmentos, uno de 89 kDa y otro de 24 kDa, aproximadamente. En la figura 8 se aprecia como la incubación en presencia de phen da lugar a la desaparición paulatina de la banda de 113 kDa (*) y a la aparición de la banda de 89 kDa (**). Estos datos indican claramente que phen induce apoptosis en células tumorales.

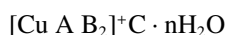
60 Si se analiza la viabilidad celular de algunos de los compuestos de la invención (figura 9) se observa que, todos los productos son suficientemente activos (a las 24 horas) en concentraciones entre 10 y 50 μM , aunque el $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{bpy})_2]^+(\text{I-hip})\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ya es activo a una concentración de 0,5 μM .

65 Todos los datos biológicos de los que se dispone indican que la phen y el bpy tienen una gran potencia antiproliferativa y pro-apoptótica en células tumorales humanas. Todos estos datos junto a las bajas concentraciones a las que se realiza su actividad, indican que este complejo tiene una elevada actividad antitumoral y, por lo tanto, puede utilizarse para el tratamiento de cáncer en humanos.

ES 2 291 120 B2

REIVINDICACIONES

1. Compuesto ternario **caracterizado** por el hecho de que presenta la fórmula general (I):



donde

A se selecciona de entre: I-hip, Hip, BGG y B¹GG;

B se selecciona de entre: phen y bpy;

C se selecciona entre I-hip⁻, Hip⁻, B¹GG⁻, BGG⁻ y I⁻; y

n, si existe, son las aguas de cristalización que pueden variar entre 1 y 7,

y donde dicho compuesto es distinto de [Cu(I-hip) (phen)₂] (I-hip⁻) · 7H₂O y [Cu (I-hip) (bpy)₂] (I-hip⁻) · 5H₂O, para su utilización como agente antitumoral.

2. Compuesto ternario según la reivindicación 1, en el que A es Hip, B es phen, C es Hip⁻ y n es 2, para su utilización como agente antitumoral.

3. Compuesto ternario según la reivindicación 1, en el que A es BGG, B es phen, C es BGG⁻ y n es 6, para su utilización como agente antitumoral.

4. Compuesto ternario según la reivindicación 1, en el que A es B¹GG, B es phen, C es B¹GG⁻, para su utilización como agente antitumoral.

5. Compuesto ternario según la reivindicación 1, en el que A es I-hip, B es bpy, C es I⁻ y n es 1, 5, para su utilización como agente antitumoral.

6. Compuesto ternario según la reivindicación 1, en el que A es B¹GG, B es bpy, C es I⁻ y n es 5, para su utilización como agente antitumoral.

7. Procedimiento de preparación de un compuesto ternario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:

a) Preparación de una suspensión de carbonato básico y ácido hipúrico seleccionado entre I-hip, Hip, BGG y B¹GG en agua.

b) Calentamiento a reflujo de la suspensión preparada.

c) Adición a la suspensión preparada en la etapa b) del ligando seleccionado entre 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridilo para formar una disolución.

d) Filtración de la disolución formada en la etapa c) y posterior enfriamiento para obtener un producto cristalizado.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/I-hipH/phen de 1:3:3.

9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/I-hipH/bpy de 1:3:3 con un exceso de KI al final de la etapa d).

10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/HipH/phen de 1:3:3.

11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/B¹GGH/phen de 1:3:3 con exceso de KI en la etapa d).

12. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/B¹GGH/bpy de 1:3:3.

13. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza una proporción de malaquita/BGGH/phen de 1:3:3.

14. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que las etapas a) b) c) y d) se llevan a cabo a P atmosférica.

15. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de ebullición.

ES 2 291 120 B2

16. Composición que comprende entre 0,5 y 50 μM del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para utilizar como agente antitumoral.

5 17. Composición según la reivindicación 16, que comprende entre 0,5 y 50 μM del compuesto $[\text{Cu}(\text{I-hip})(\text{phen})_2](\text{I-hip}^-) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, para utilizar como agente antitumoral.

18. Composición según la reivindicación 1-6, que comprende entre 10 y 50 μM del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para utilizar como agente antitumoral.

10 19. Utilización de un compuesto ternario según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer humano.

15 20. Utilización según la reivindicación 19, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer de pulmón.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1:

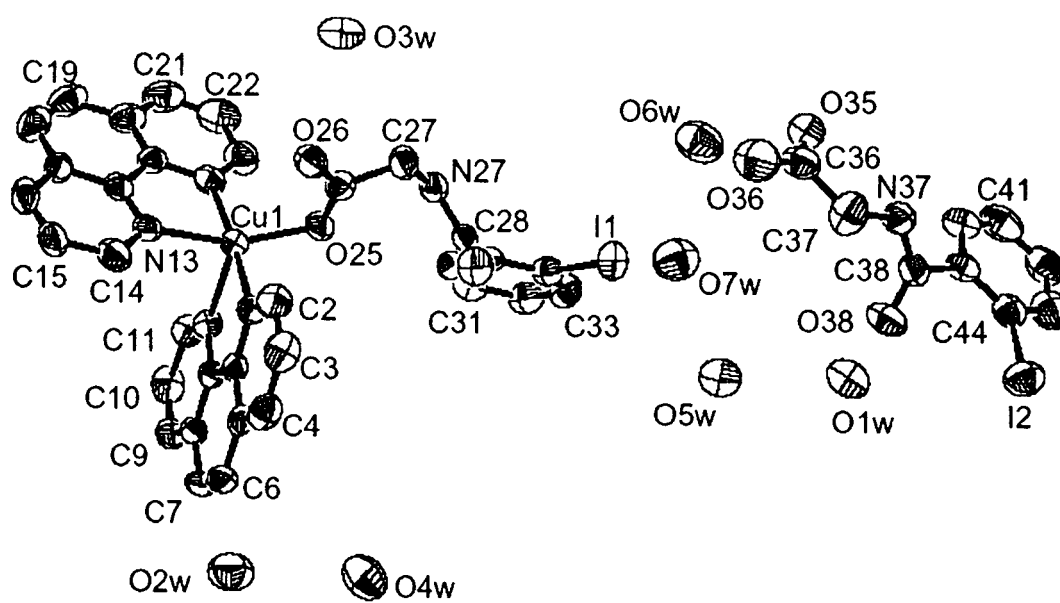


Figura 2:

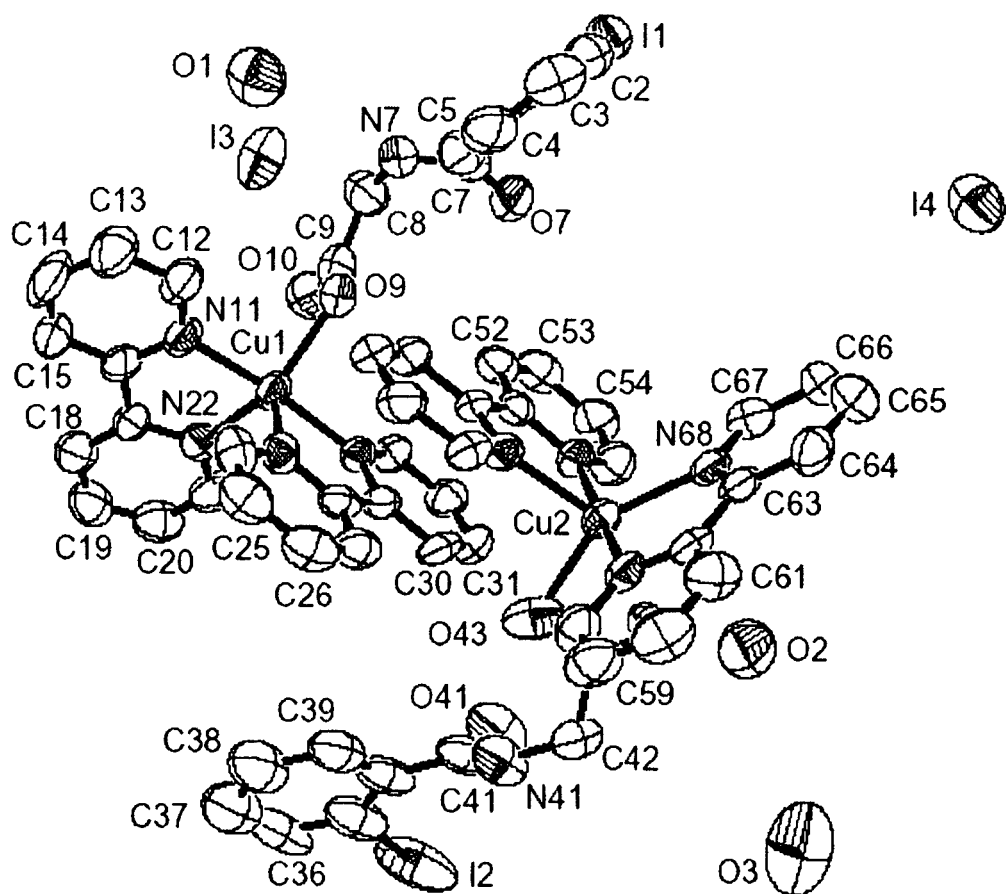


Figura 3:

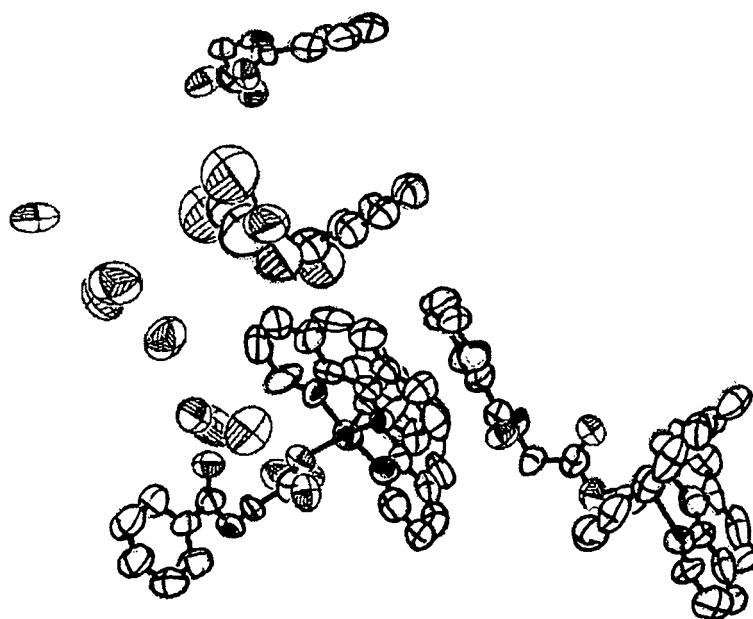


Figura 4:

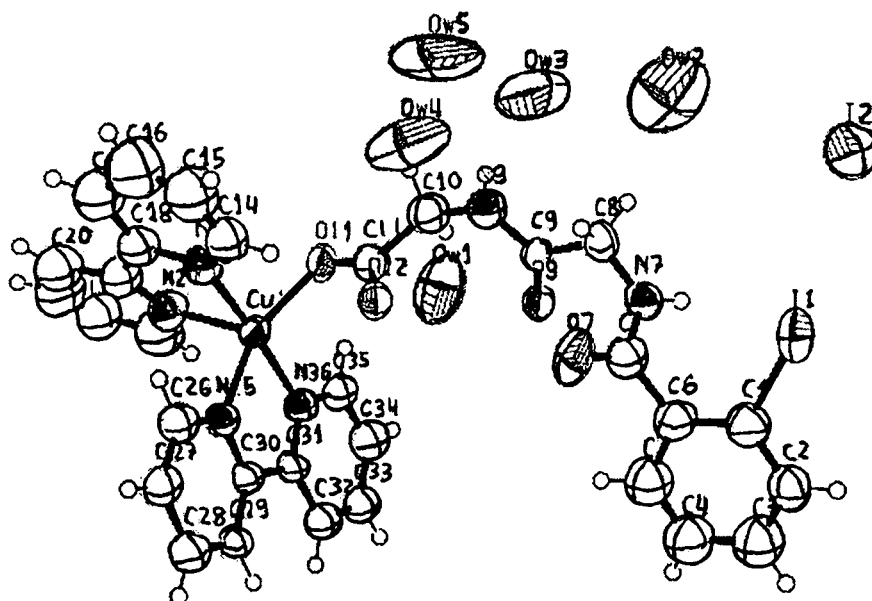


Figura 5:

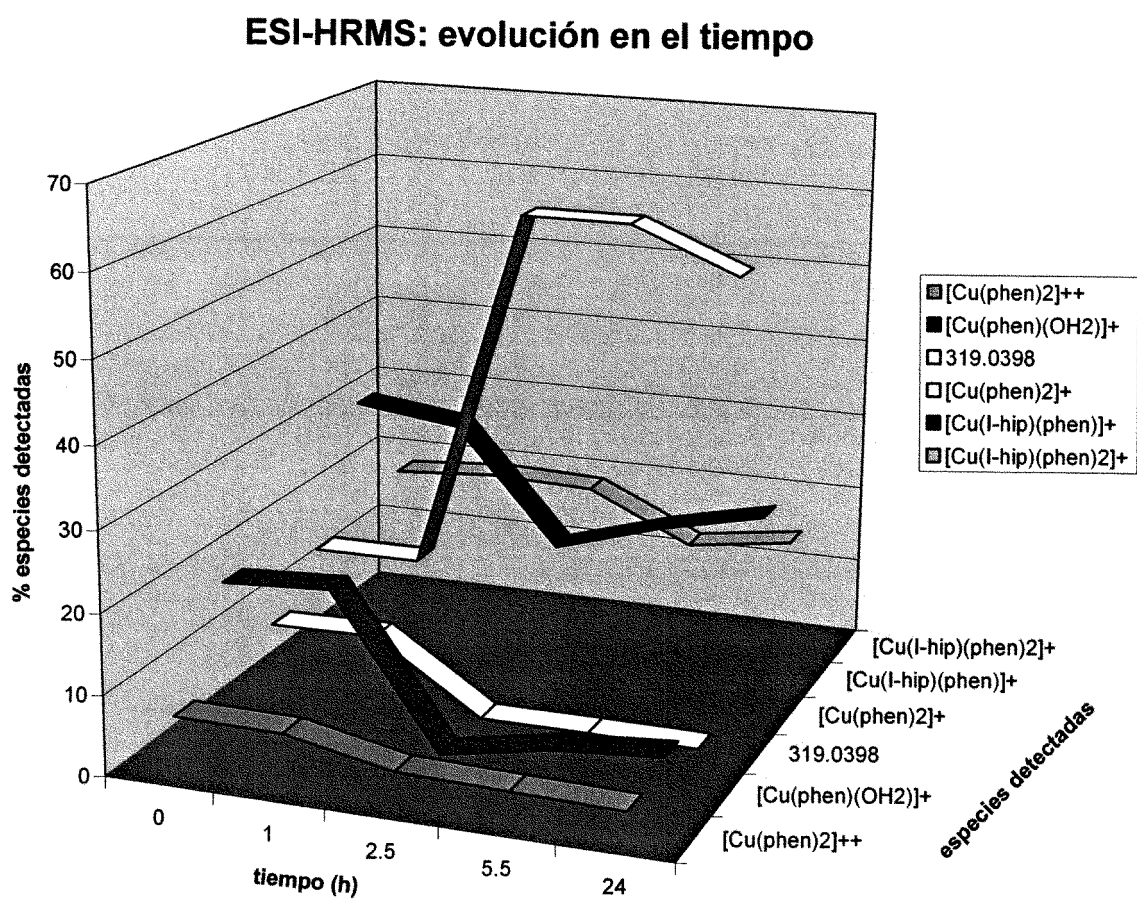


Figura 6:

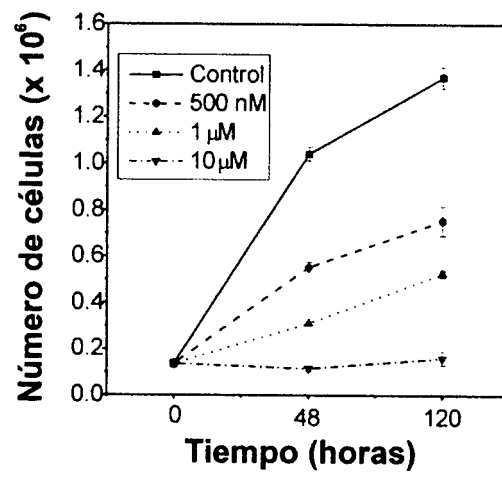


Figura 7:

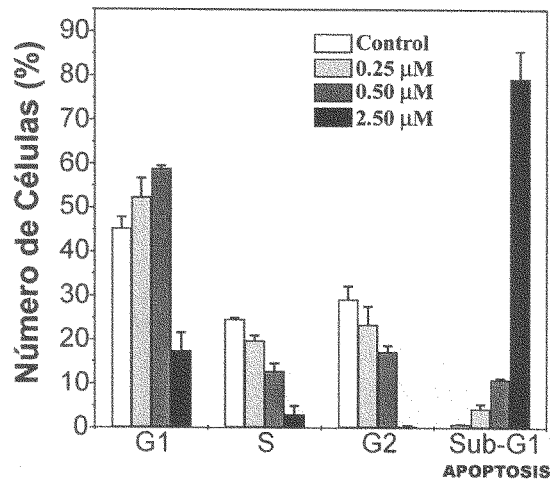
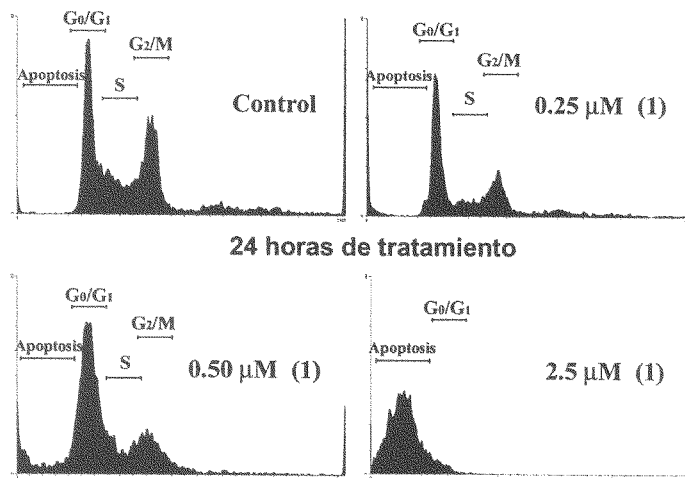
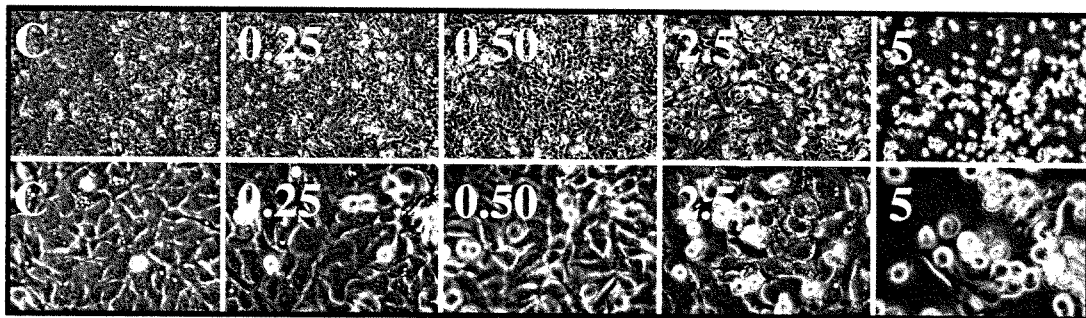


Figura 8:

a)



b)

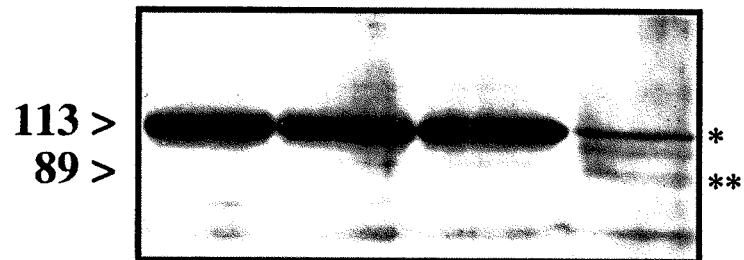
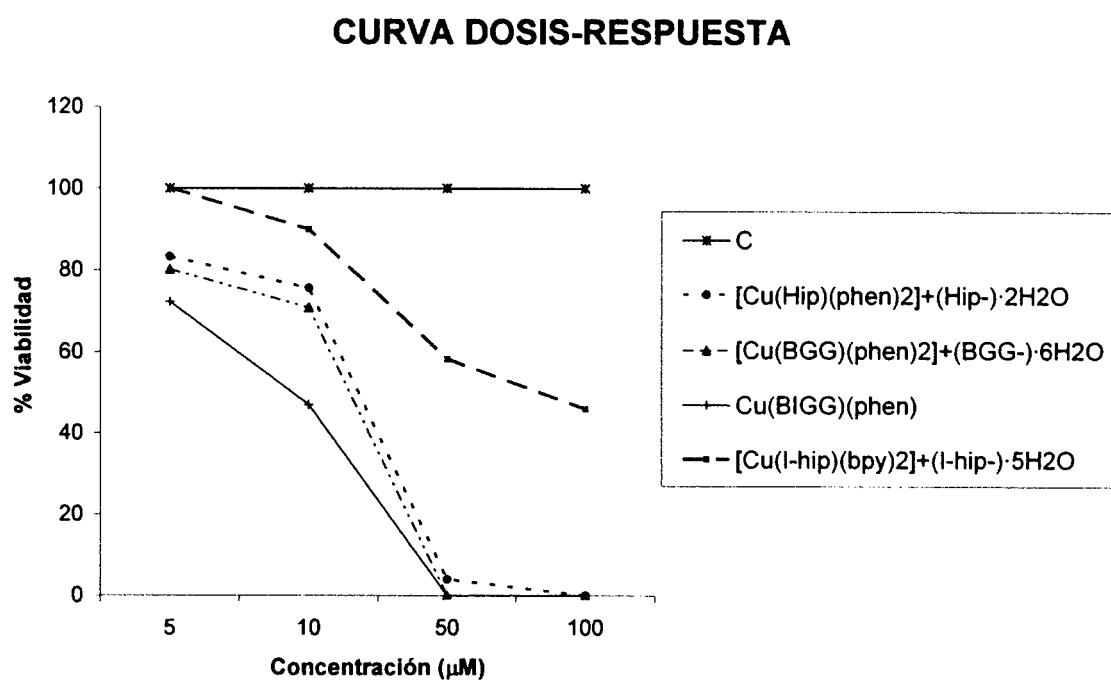


Figura 9:





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 291 120

② Nº de solicitud: 200601111

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.05.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TERRON, A. y col. Study of the interacción of ternary compounds of the type [Cu(o-iodohippurato)(phen) ₂] or [Cu(o-iodohippurato)(bpy) ₂] with DNA. 7th EUROBIC- European Biological Inorganic Chemistry Conference. Garmisch-Partenkirchen - Alemania. 29 Agosto - 2 Septiembre 2004. Poster (resumen). Recuperado de Internet: URL: http://www.eurobic7.uni-dortmund.de/Poster/Terron.pdf .	1,2
A	XIANG-LI WANG y col. Synthesis, crystal structure and DNA cleavage activities of copper (II) complexes with asymmetric tridentate ligands. Journal of Inorganic Biochemistry. 2004, Vol. 98, páginas 423-429. ISSN 0162-0134. Todo el documento.	1-21
A	GARCIA-RASO, A. y col. Synthesis, structure and nuclease properties of several ternary copper (II) peptide complexes with 1,10-phenanthroline. Journal of Inorganic Biochemistry. 2003, Vol. 95, páginas 77-86. ISSN 0162-0134. Todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

18.01.2008

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F 1/08 (2006.01)

A61K 31/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)