



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 747**

② Número de solicitud: 200802431

⑤ Int. Cl.:
C07D 473/00 (2006.01)
C07D 473/40 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 267/14 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)

⑫ PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **07.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

Fecha de la concesión: **31.05.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
20.05.2011

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **10.06.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES
Universidad de Jaén**

⑱ Inventor/es: **Marchal Corrales, Juan Antonio;
Boulaiz, Houria;
López Cara, Luisa Carlota;
Conejo García, Ana;
Espinosa Úbeda, Antonio;
Campos Rosa, Joaquín María;
Aránega Jiménez, Antonia;
Rodríguez Serrano, Fernando y
Gallo Mezo, Miguel Ángel**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Nuevas (RS)-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzocazepin-3-il)-7H ó 9H-purinas con actividad antitumoral.**

㉑ Resumen:
Nuevas (RS)-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7H ó 9H-purinas con actividad antitumoral, que encuentran aplicación en el tratamiento de tumores en animales y seres humanos. Los resultados experimentales obtenidos sobre líneas celulares tumorales y no tumorales de mama sugieren que los compuestos seleccionados posean una actividad antitumoral específica y selectiva.

ES 2 334 747 B2

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas (*RS*)-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7*H* ó 9*H*-purinas con actividad antitumoral.

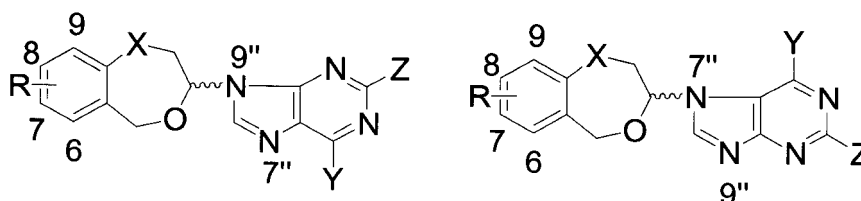
5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con nuevos compuestos derivados de (*RS*)-7- ó 9-(1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il)-7*H* ó 9*H*-purinas con actividad farmacológica antitumoral útiles. La invención se relaciona asimismo con un procedimiento para su preparación, con composiciones farmacéuticas que los comprenden, así como con su empleo en el tratamiento del cáncer, en particular en el tratamiento del cáncer de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos en humanos y animales.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer es una de las causas actuales más frecuentes de muerte en humanos y animales. Por ello se han llevado y se están llevando a cabo actualmente esfuerzos muy importantes, para sintetizar y desarrollar agentes antitumorales eficaces y seguros para el tratamiento del cáncer.

Los inventores de la presente invención han centrado sus esfuerzos recientemente en la síntesis, estudio y desarrollo de agentes antitumorales que no sean citotóxicos, ni dañinos, y dirigidos a la regulación del ciclo celular. En este sentido los inventores han sintetizado y evaluado la actividad biológica de una serie de compuestos *O,N*-acetales que incluyen un benzoxaheterociclo y diferentes bases nitrogenadas. Así, la solicitud de patente No. P200601538 divulga compuestos 2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodiheteroepin-3-il)purinas que presentan actividad antitumoral frente a diversas estirpes de cánceres y baja toxicidad frente a una línea celular sana (línea epitelial de mama normal MCF-10A). Dichos compuestos presentan las siguientes fórmulas generales:



40 En particular la P200601538 divulga compuestos en los que en el anillo heptagonal los heteroátomos presentes son O y X, donde X se selecciona de entre O, S y SO₂ y sus concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) sobre la línea celular humana derivada de cáncer de mama MCF-7.

Las actividades antitumorales de estos compuestos son notables y comparables a los agentes activos convencionalmente utilizados en terapia como el agente citotóxico 5-fluorouracilo (Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1457-1460).

En su esfuerzo por proporcionar agentes antiproliferativos mejorados los inventores posteriormente han divulgado nuevos compuestos, *O,N*-acetales y su síntesis en los que X en el anillo heptagonal es un átomo de N sustituido con un grupo nitrobenzénsulfonilo (Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Tetrahedron* 63 **2007** 5274-5286).

Los resultados sobre las actividades antiproliferativas de diversos compuestos *O,N*-acetales *N*-9'' y *N*-7'' purínicos o *N*-1'' y *N*-3'' pirimidínicos (las posiciones de sustitución del anillo de purina o el de pirimidina se indican con dobles primas) *in vitro* frente a la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 han sido recientemente publicadas (Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1457-1460). Estos resultados, han puesto de manifiesto, entre otros aspectos, que los compuestos antitumorales más potentes son los derivados de purina. También parecen en general más potentes los compuestos que presentan un anillo de 4,1-benzoxazepina frente a los compuestos que presenta un anillo de 4,1-benzoxatiepino o de 4,1-benzodioxepino.

A pesar de los continuados esfuerzos realizados en el desarrollo y estudio de agentes antitumorales, sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar nuevos compuestos antitumorales alternativos desarrollados a partir de los prototipos de los compuestos mencionados.

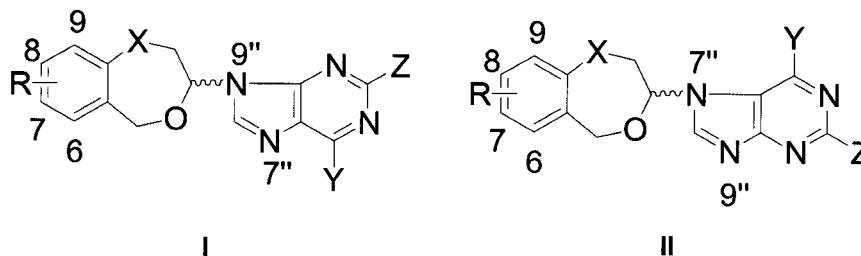
Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de fórmulas generales I y II:

5

10

15



20 donde,

X representa un grupo bencénsulfonamido sustituido en posición *orto*, *meta* o *para* por un grupo nitro, amino o fluoren-9-ilmetilcarbamato (FmocN);

Y y Z representan cada uno, independientemente entre sí, un grupo seleccionado del grupo formado por -Cl ó -I

R representa un sustituyente seleccionado del grupo formado por H, -Cl, -Br, -I, -F ó -CF₃, en las posiciones 7'' y/o 9'' del anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros.

sus sales farmacológicamente aceptables, derivados, profármacos y formas homoquirales (*R* ó *S*) de los mismos.

En el contexto de la presente invención el término “sales farmacológicamente aceptables, derivados, profármacos” se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato, hidrato, o cualquier compuesto que, una vez administrado a un animal o ser humano, es capaz de proporcionar de forma directa o indirecta un compuesto como los descritos en esta invención. La invención también incluye comprendida en su ámbito de protección, sales no farmacéuticamente aceptables, que pueden ser utilizadas en la obtención de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, profármacos y derivados puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica.

Por ejemplo las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se sintetizan en general a partir de los compuestos de la invención en forma de ácido o base libre, por adición de una cantidad estequiométrica de una base o ácido apropiado, en agua, en un disolvente orgánico o en mezclas de éstos.

Los compuestos de la invención pueden presentarse en forma cristalina como compuestos libres o solvatos (por ejemplo hidratos) estando ambas formas comprendidas en el ámbito de protección de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

Los compuestos de la invención de fórmulas generales I y II presentan un anillo de 4,1-benzoxazepina unido a través de su posición 3 al átomo de nitrógeno en posición 9'' de una base púrica en los compuestos de fórmula general I, o al átomo de nitrógeno en posición 7'' de una base púrica en los compuestos de fórmula general II. Por tanto la diferencia entre los compuestos I y II reside únicamente en su unión hemiaminámica.

En los compuestos de la invención el anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros, puede tener uno o dos sutituyentes R en las posiciones 7'' o 9'' o en ambas, y dichos R pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En una realización particular de la invención, en los compuestos de fórmulas generales I y II,

R es H;

X es grupo bencénsulfonamido sustituido en posición *orto* o *para* por un grupo nitro,

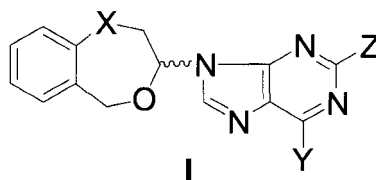
Z e Y, iguales o diferentes entre sí, se seleccionan de entre -Cl, -Br, y -I.

65

ES 2 334 747 B2

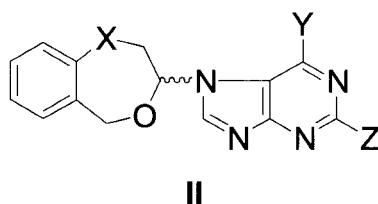
En otra realización particular los compuestos de la presente invención son los que se muestran en las siguientes Tablas 1 y 2:

TABLA 1



| Código | X | Y | Z |
|--------------------|----------------------------------|----|----|
| ACG-812b-F3 | <i>p</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |
| FC-26c | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |
| FC-35 | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | I | Cl |

TABLA 2



| Código | X | Y | Z |
|----------------|----------------------------------|----|----|
| FC-30b2 | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |

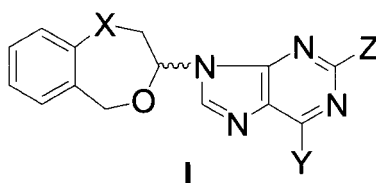
Los inventores han observado que los compuestos de la presente invención muestran mejores actividades antiproliferativas frente a la línea tumoral de cáncer de mama humano MCF-7, que las de los compuestos del estado de la técnica (solicitud de patente No. P200601538 y Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1457-1460). Además, los compuestos de la presente invención mostraron mayor citotoxicidad sobre la línea tumoral MCF-7, que sobre la línea celular mamaria no tumoral MCF-10A por lo que resultan más selectivos y específicos. Del mismo modo, el IT *in vitro* determinado ha sido de utilidad para comparar la mayor o menor efectividad de los compuestos de la invención sobre las líneas de estirpe mamaria.

En las Tablas 3 (compuestos de fórmula general I) y 4 (compuestos de fórmula general II), se muestran los datos estructurales de los compuestos, y los valores biológicos, incluyendo los ITs y se comparan con los datos de compuestos del estado de la técnica. La comparación demuestra las ventajas de los compuestos de la presente invención.

Las Tablas 3 y 4 resumen los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los compuestos de la invención, con compuestos divulgados en la solicitud de patente No. P200601538, y con los siete compuestos más activos divulgados en la comunicación del año 2008 (M. Díaz-Gavilán *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460).

ES 2 334 747 B2

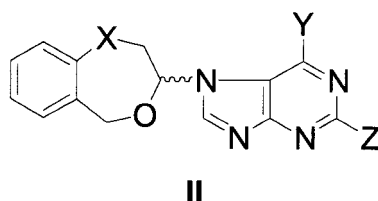
TABLA 3



| Código | X | Y | Z | CI ₅₀ MCF-7 (μM) | CI ₅₀ MCF-10A (μM) | IT ^a |
|-------------|---------------------------|----|----|-----------------------------|-------------------------------|-----------------|
| MB-90A | O | Cl | H | 4.63 ± 0.01 ^b | 4.17 ± 0.03 | 0.90 |
| KS-47A | O | Cl | Cl | 4.40 ± 0.88 ^b | 0.55 ± 0.01 | 0.12 |
| MN-84D | S | Cl | H | 5.46 ± 0.02 ^b | 1.85 ± 0.10 | 0.34 |
| MDG-798C | <i>p</i> NBS ^c | Cl | H | 2.73 ± 0.17 ^d | - | - |
| MDG-884A2-2 | <i>o</i> NBS ^e | Cl | H | 2.10 ± 0.69 ^d | - | - |
| MDG-828B | FmocN ^f | Cl | H | 0.67 ± 0.18 ^d | - | - |
| ACG-812b-F3 | <i>p</i> NBS ^c | Cl | Cl | 0.36 ± 0.01 | 1.82 ± 0.50 | 5.06 |
| FC-26c | <i>o</i> NBS ^e | Cl | Cl | 0.38 ± 0.03 | 1.53 ± 0.20 | 4.03 |
| FC-35 | <i>o</i> NBS ^e | I | Cl | 0.61 ± 0.04 | 0.35 ± 0.02 | 0.57 |

^aIT = CI₅₀ MCF-10A/ CI₅₀ MCF-7. ^bDatos tomados de la solicitud de patente P200601538. ^c*p*NBS = *p*-nitrobencénsulfonamido. ^dDatos tomados de la comunicación *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460. ^e*o*NBS = *o*-nitrobencénsulfonamido. ^fFmocN = fluorenil-9-il-metoxicarbamato.

TABLA 4



| Código | X | Y | Z | CI ₅₀ MCF-7 (μM) | CI ₅₀ MCF-10A (μM) | IT ^a |
|----------|---------------------------|-----|----|-----------------------------|-------------------------------|-----------------|
| KS-47B | O | Cl | H | 24.9 ± 1.83 ^b | 0.81 ± 0.01 | 0.03 |
| MN-116B | S | Cl | H | 3.55 ± 1.10 ^b | 1.68 ± 0.12 | 0.47 |
| MDG-884B | <i>o</i> NBS ^c | Cl | H | 0.92 ± 0.01 ^d | - | - |
| MDG-828C | FmocN ^e | Cl | H | 0.84 ± 0.09 ^d | - | - |
| MDG-958A | <i>p</i> NBS ^f | PhS | H | 0.86 ± 0.12 ^d | - | - |
| MDG-942B | <i>o</i> NBS ^c | PhS | H | 2.59 ± 0.57 ^d | - | - |
| FC-30b2 | <i>o</i> NBS ^c | Cl | Cl | 0.99 ± 0.09 | 1.26 ± 0.16 | 1.27 |

^aIT = CI₅₀ MCF-10A/ CI₅₀ MCF-7. ^bDatos tomados de la solicitud de patente P200601538.

^c*o*NBS = *o*-nitrobencénsulfonamido. ^dDatos tomados de la comunicación *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460. ^eFmocN = fluorenil-9-il-metoxicarbamato. ^f*p*NBS = *p*-nitrobencénsulfonamido.

ES 2 334 747 B2

Los compuestos de las Tablas 3 y 4, en los que X es O o S, muestran valores de CI_{50} comprendidos entre 4.63 y 3.55 μM , mientras que el rango de actividad de los cinco compuestos ejemplificados de esta invención está comprendido entre 0.36-0.99 μM . Este dato pone de manifiesto en consecuencia, actividades antiproliferativas comprendidas entre 3.6 y 12.9 veces superiores de los compuestos de la presente invención.

Por otra parte, los compuestos divulgados en la comunicación *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460, muestran actividades antiproliferativas importantes comprendidas entre los valores de CI_{50} de 0.67 y 2.73 μM .

Los compuestos de la invención presentan en general valores de CI_{50} mejores que los del estado de la técnica (P200601538; y la comunicación *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460), excepto, en el caso del derivado *FC-30b2*. No obstante la comparación entre *MDG-884B* y *FC-30b2* pone de manifiesto que los compuestos de la presente invención en los que Z e Y son ambos halógenos, presentan mejores actividades antiproliferativas.

De modo similar la comparación entre *MDG-884A2-2* con *FC-35* pone de manifiesto que los compuestos de la invención en los que Z e Y son ambos halógenos presentan mejores actividades antiproliferativas y lo mismo se desprende de la comparación entre *MDG-798C* y *ACG-812b-F3*.

En consecuencia, los datos biológicos apuntan al hecho experimental de que, en general, la presencia de dos átomos de halógeno en las posiciones 2" y 6" del resto de purina conlleva sorprendentemente a una mejora de la actividad antiproliferativa.

Una vez mostrada la mayor actividad antiproliferativa de los compuestos de esta invención con respecto a los compuestos de la técnica (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1457-1460; P200601538) se procedió a hacer un estudio comparativo de los ITs entre los compuestos de esta invención y los de la solicitud de patente P200601538.

Todos los compuestos de fórmulas generales I y II de la presente invención muestran valores elevados de IT (excepto *FC-35*) cuando se probaron sobre líneas de estirpe mamaria (MCF-7 y MCF-10A) destacando por encima de todos, los derivados *ACG-812b-F3* y *FC-26c*, con valores de ITs de 5.06 y 4.03, respectivamente. Además, los compuestos de P200601538 muestran valores de IT menores que 1, lo que indica que estos fármacos ejercen una mayor toxicidad sobre las células epiteliales mamarias normales.

Por tanto, los compuestos de la presente invención presentan un alto índice terapéutico experimental, con actividad citotóxica en general selectiva de cáncer de mama. Los ITs *in vitro* avalan su elevada selectividad sobre células tumorales y la baja toxicidad sobre células normales.

En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto seleccionado de entre los compuestos de fórmulas I y II, sus sales farmacológicamente aceptables, derivados, profármacos y formas homoquirales (*R* ó *S*) de los mismos, junto con al menos un excipiente farmacológica aceptable. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen entre otras, formas sólidas como comprimidos, cápsulas, gránulos etc., formas líquidas, como soluciones, suspensiones, o emulsiones. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de forma oral, tópica, parenteral etc.

En otro aspecto la invención se refiere a un compuesto seleccionado de entre los compuestos de fórmulas I y II, sus sales farmacológicamente aceptables, derivados, profármacos y formas homoquirales (*R* ó *S*) de los mismos, para su uso como medicamento.

En otro aspecto adicional la invención se refiere al empleo de al menos un compuesto seleccionado de entre los compuestos de fórmulas I y II, sus sales farmacológicamente aceptables, derivados, profármacos y formas homoquirales (*R* ó *S*) de los mismos, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer. En una realización particular dicho medicamento es para el tratamiento y/o profilaxis de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y los síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos.

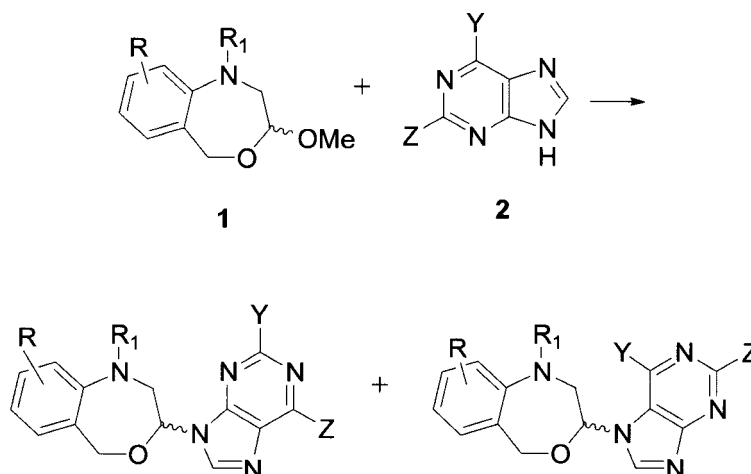
Otro aspecto adicional de la invención se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis del cáncer y de los síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos en necesidad de dicho tratamiento que comprende la administración de la menos una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula general I o II.

La administración de los compuestos o de las composiciones de la invención puede realizarse de acuerdo con cualquier método adecuado, como infusión intravenosa, preparaciones orales, administración intraperitoneal, intravenosa entre otras. La correcta dosificación dependerá de la formulación concreta, el modo de administración, y las particularidades del paciente, del tumor a tratar etc., tales como la edad, el peso corporal, de la combinación con otros fármacos, etc.

ES 2 334 747 B2

En otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de los compuestos de la presente invención. El procedimiento comprende la siguiente etapa de reacción que consiste en una condensación de Vorbrüggen entre un compuesto de partida de fórmula general (1) y una base púrica de fórmula general (2) según el siguiente Esquema 1:

Esquema 1



y donde R₁ es un grupo bencensulfonilo sustituido en posiciones *orto*, *meta* o *para* por un grupo nitro o amino, o un grupo fluoren-9-ilmetilcarbonilo (Fmoc);

R tiene los significados anteriormente mencionados para los compuestos de la invención, y

Z e, Y pueden ser iguales o distintos entre sí, y tener los significados anteriormente mencionados para los compuestos de la invención.

La condensación de Vorbrüggen se lleva a cabo de forma convencional tal y como se describe por ejemplo en (Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1457-1460; Díaz-Gavilán, M. *et al.*, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 5274-5286; Corrigendum: *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9023).

La condensación se realiza en presencia de los reactivos silanzantes, trimetilclorosilano (TCS), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), y cloruro estánnico como ácido de Lewis en acetonitrilo anhidro. En general se emplean 2.5 equivalentes de la purina correspondiente, TCS (4 equivalentes), HMDS (4 equivalentes), SnCl₄, (4 equivalentes), MeCN anhidro y la temperatura suele estar comprendida entre 45-50°C, durante 24 a 72 horas. La condensación da lugar a los regioisómeros cíclicos *N*-9'' y *N*-7''.

Por otra parte, algún compuesto de la presente invención de fórmula I, se prepara a partir de los compuestos de fórmula I, obtenidos de la condensación de Vorbrüggen, mediante transformaciones químicas convencionales (ver Ejemplo 3).

A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la invención, que se exponen para una mejor comprensión de la invención, y que en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de (*RS*)-2,6-dicloro-9-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (PC-26c), y (*RS*)-2,6-dicloro-7-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-7*H*-purina (FC-30b2)

Sobre una solución de (*RS*)-3-metoxi-1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepina (200 mg, 0.55 mmoles) y 2,6-dicloropurina (259 mg, 1.37 mmoles) en 2.5 mL de acetonitrilo anhidro a 0°C y bajo atmósfera de argón, se añadieron sucesivamente TCS (278 μ L, 2.20 mmoles), HMDS (453 μ L, 2.20 mmoles) y SnCl₄ (1M en CH₂Cl₂, 2.2 mL). Se dejó elevar lentamente la temperatura hasta 10°C antes de calentar a 50°C. Una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo la mezcla en agitación, bajo atmósfera de argón, durante 69 horas. Transcurrido ese

ES 2 334 747 B2

tiempo la mezcla se enfrió a 0°C y se añadieron 10 mL de agua. Se neutralizó con una solución de NaHCO₃ saturada y se extrajo con CH₂Cl₂. (3 x 30 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (1 x 30 mL) y con una solución saturada de NaCl (1 x 30 mL) y se secó (Na₂SO₄). El crudo se purificó mediante cromatografía flash utilizando una mezcla de EtOAc/Hexano 1/1. De esta forma se obtuvieron las siguientes dos fracciones: *FC-26c* (35.5 mg, 13%) y *FC-30b2* (5.5 mg, 2%):

(*FC-26c*). Sólido blanco; pf: 154-155°C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 8.18 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82-7.80 (m, 3H), 7.42-7.40 (m, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 10.1 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 4.72 (dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 13.2 Hz, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 153.68, 152.48, 152.38, 148.03, 143.70, 138.89, 137.75, 134.95, 133.71, 132.60, 132.55, 131.03, 130.56, 130.04, 129.58, 128.82, 125.02, 85.22, 72.12, 54.80. HR (LSIMS) calculado para C₂₀H₁₄Cl₂N₆NaO₅ (M+Na)⁺ 543.0021; encontrado 543.0020. Análisis elemental para C₂₀H₁₄Cl₂N₆O₅: C, 46.08; H, 2.71; N, 16.12; S, 6.15; encontrado: C, 46.10; H, 3.02; N, 16.43; S, 5.99.

(*FC-30b2*). Sólido blanco; pf: 172-174°C. ¹H-RMN (Acetona-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 8.93 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 2H), 7.94 (m, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.42-7.44 (m, 2H), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 10.2 Hz, 1H), 5.01-4.98 (m, 3H), 4.16 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 13.7 Hz, 1H). ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ (ppm) 163.88, 160.85, 152.18, 144.00, 139.25, 137.93, 136.29, 133.91, 132.67, 131.00, 130.89, 130.32, 129.96, 129.54, 128.63, 125.86, 121.01, 85.38, 70.40, 53.85. HR (LSIMS) calculado para C₂₀H₁₄Cl₂N₆O₅SNa (M+Na)⁺ 543.0021; encontrado 43.0018. Análisis elemental para C₂₀H₁₄Cl₂N₆O₅S: C, 46.08; H, 2.71; N, 16.12; S, 6.15; encontrado: C, 46.21; H, 3.08; N, 15.93; S, 6.00.

Ejemplo 2

Preparación de (*RS*)-2,6-dicloro-9-[1-(*p*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (*ACG-812bF3*)

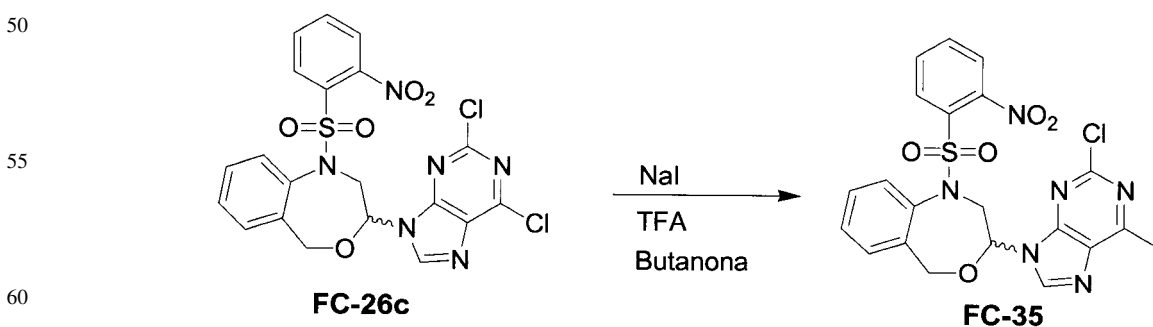
Se siguió el mismo procedimiento detallado en el Ejemplo 1 sustituyendo el *O,O*-acetal de partida [(*RS*)-3-metoxi-1-(*p*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepina], manteniendo las mismas relaciones molares. Se obtuvo el compuesto *ACG-812bF3*.

(*ACG-812bF3*) Sólido amarillento; pf: 173-175°C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 8.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.17-8.11 (m, 3H), 7.43-7.31 (m, 4H), 6.00 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 14.7 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 14.7 Hz, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 153.72, 152.59, 152.16, 150.79, 146.29, 143.41, 138.78, 136.64, 131.01, 130.52, 130.40, 129.54, 129.10, 129.05, 125.18, 84.78, 72.05, 54.56. HR (LSIMS) calculado para C₂₀H₁₄Cl₂N₆NaO₅S (M+Na)⁺ 543.0021; encontrado 543.0024. Análisis elemental para C₂₀H₁₄Cl₂N₆O₅S: C, 46.08; H, 2.71; N, 16.12; S, 6.15; encontrado: C, 46.00; H, 2.65; N, 15.99; S, 6.28.

Las síntesis de los compuestos que resultan de la sustitución del átomo de cloro en la posición 6" del anillo de purina por otro átomo de yodo (*FC-35*), se detalla a continuación:

Ejemplo 3

Preparación de (*RS*)-2-Cloro-6-iodo-9-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (*FC-35*)



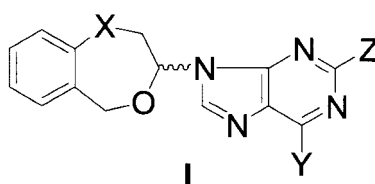
A una solución de *FC-26c* (150 mg, 0.28 mmoles) en 6 mL de butanona se le añadió NaI (839 mg, 5.60 mmoles), TFA (107.2 μL, 1.4 mmoles) a -10°C y se mantuvo a esta temperatura 6 horas. Tras evaporar el disolvente, el crudo se redisolvió en CH₂Cl₂ y se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NaHSO₄ (2 x 50 mL), H₂O (1 x 50 mL), una solución saturada de NaCl (1 x 50 mL) y se secó (Na₂SO₄). El producto (*FC-35*) se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente EtOAc/Hexano 1/1 (117 mg, 66%).

ES 2 334 747 B2

(FC-35) Sólido amarillento; pf: 129-130°C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): (ppm) 8.18 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.81-7.79 (m, 3H), 7.43-7.42 (m, 3H), 7.40-7.38 (m, 2H), 7.31-7.32 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.06 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 16.0 Hz, 1H), 5.04 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.73 (dd, *J* = 16.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.82-3.80 (m, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 153.10, 152.46, 152.34, 148.81, 147.86, 143.64, 138.85, 137.72, 137.68, 134.90, 133.68, 132.57, 132.52, 130.53, 130.00, 128.82, 124.99, 85.18, 72.12, 54.76. HR (LSIMS) calculado para C₂₀H₁₄ClIN₆NaO₅S (M+Na)⁺ 634.9377, encontrado 634.9381. Análisis elemental para C₂₀H₁₄ClIN₆O₅S: C, 39.20; H, 2.30; N, 13.71; S, 5.23; encontrado: C, 39.45; H, 2.15; N, 13.95; S, 5.00.

Los compuestos de fórmula general I de la invención que se han evaluado biológicamente se muestran en la Tabla 1:

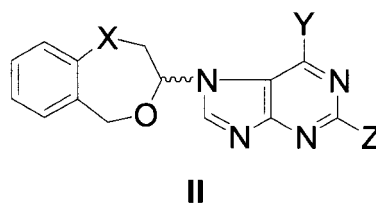
TABLA 1



| Código | X | Y | Z |
|--------------------|----------------------------------|----|----|
| ACG-812b-F3 | <i>p</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |
| FC-26c | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |
| FC-35 | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | I | Cl |

El compuesto de fórmula general II de la invención que se ha evaluado biológicamente se muestra en la Tabla 2:

TABLA 2



| Código | X | Y | Z |
|----------------|----------------------------------|----|----|
| FC-30b2 | <i>o</i> -nitrobencénsulfonamido | Cl | Cl |

Ejemplo 5

Determinación de las actividades biológicas

5.1 Líneas celulares

Se han ensayado los compuestos sobre la línea celular MCF-7 americana (ATCC HTB22) que es una línea tumoral de adenocarcinoma de mama. Es dependiente del receptor de estrógeno y es salvaje para p53.

ES 2 334 747 B2

5.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos de células se realizaron en cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) bajo condiciones de esterilidad. Los frascos de cultivo estériles (Falcon de 25 u 80 cm² de superficie útil) se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera al 5% de CO₂ y 90% de humedad. Durante el cultivo celular, las células tuvieron que ser sembradas en nuevos Falcons conforme se alcanzaba la saturación, despegándolas de la superficie de los frascos de cultivo mediante una solución de PBS-EDTA (0.02%) o de Tripsina (10x). Después se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos y lavadas dos veces con PBS, resuspendiéndolas en medio de cultivo.

Para el cultivo se utilizó el medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM) (Gibco, EE UU) (13.37 g de medio base), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow, Reino Unido) en calor húmedo entre 50 y 60°C durante 30 minutos. El medio se tamponó con NaHCO₃ y buffer Hepes (Flow) 1M pH 7.2 y se suplementó con 40 mg/L de gentamicina (Antibióticos S. A.), 500 mg/L de ampicilina (Antibióticos S. A.), 20 mL de L-glutamina (Flow) 200 mM y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 mL. Una vez preparado el medio de cultivo, se filtró con filtros Millex estériles de 0.22 µM (Millipore, Francia) y se añadió a los frascos.

5.3 Método de congelación celular

Para la congelación celular, las células se despegaron de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0.02%) o de Tripsina (10x), centrifugadas a 600 g durante cinco minutos y lavadas dos veces con PBS. El pellet celular se resuspendió en medio de congelación a razón de 0.5 x 10⁶ células por mL siendo introducidas inmediatamente en criotubos y éstos en el congelador a -80°C durante 24 h, siendo almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido tras este período.

Medio de congelación: suero fetal bovino (Sigma, S. L.), inactivado en calor húmedo durante 30 minutos, y dime-tilsulfóxido (DMSO).

5.4 Método de descongelación celular

La línea celular MCF-7 crioconservada en nitrógeno líquido se descongeló en calor húmedo. Inmediatamente después, las células se resuspendieron en PBS estéril, siendo centrifugadas a 1500 rpm durante cinco minutos, repitiéndose el proceso dos veces para eliminar los restos de DMSO. El pellet se resuspendió en medio de cultivo previamente filtrado y las células se depositaron en frascos de cultivo.

5.5 Tratamiento de la línea celular MCF-7 con los fármacos

Se siguió el siguiente protocolo: las células fueron despegadas de la superficie de los frascos de cultivo con PBS-EDTA (0,02%) o PBS-tripsina (10x) a 37°C, y se lavaron dos veces con PBS a una temperatura entre 0 y 10°C mediante centrifugación a 600 g durante 5 minutos. A continuación se diluyeron en medio Dubelcco's Eagle suplementado con suero fetal bovino hasta obtener cultivos de 5 x 10⁶ células. A partir de este momento se llevó a cabo la inducción con los compuestos antitumorales añadiendo las concentraciones deseadas de cada uno de ellos, permaneciendo en contacto con las células durante seis días. Se utilizaron como control en cada experimento cultivos paralelos de células MCF-7 sin compuestos. El medio de ambos cultivos, control y los tratados con los fármacos, fue reemplazado cada 48 h.

5.6 Cálculo de las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀)

Tras la inducción durante 6 días con los compuestos, a las concentraciones de 0.5, 1, 3, 5, 10 y 20 µM, de la línea celular en cultivo, y después de llevar a cabo un ensayo colorimétrico con sulforrodamina-B (SRB) que se especificará más adelante, se procedió a la medida de la absorbancia para una densidad óptica de 492 nm. Se construyeron las gráficas de densidad óptica (D. O.) (eje de ordenada) y concentración (eje de abscisa) de cada uno de los fármacos, y sobre las gráficas se calculó interpolando el valor de la CI₅₀ trazando la vertical de la curva del valor obtenido como media entre los dos valores extremos de la D. O. Se determinaron dos valores para cada punto de la curva, el experimento se repitió dos o tres veces y se estimaron los valores medios. Los resultados se resumen en las Tablas 3 y 4.

5.7 Ensayo colorimétrico

Tras períodos de 6 días de cultivo, las células fueron coloreadas con SRB mediante el siguiente protocolo:

1. El tapiz celular se lavó con PBS al 1% y se incubó con glutaraldehído durante 15-30 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 4°C, lavándose a continuación con PBS y dejándolo secar.
2. Las células así fijadas se tiñeron durante 15 minutos con SRB en ácido acético.
3. Posteriormente se lavó el tapiz con ácido acético y se dejaron secar las placas, de nuevo.
4. El colorante fijado sobre las células se solubilizó con una solución de Tris-base con agitación suave.

5. Alícuotas de 100 μ L se transfirieron a placas de 96 pocillos y se leyeron en un colorímetro Titertek multiscan.

5.8 *Células no tumorales*

5 Además de la línea tumoral para el estudio del cáncer de mama se utilizaron líneas celulares mamarias no tumorales en concreto la línea MCF-10A, con objeto de poder establecer comparaciones que permitan identificar mecanismos involucrados en el fenotipo maligno. Esta línea procede del epitelio de la glándula mamaria humana y fue establecida a través de un cultivo a largo tiempo en un medio libre de suero con baja concentración de calcio (H. Soule, C. M. McGrath, U.S. Pat. 5,026,637, dated June 25, 1991).

5.9 *Índices terapéuticos (IT) in vitro de los fármacos de esta invención y de otros seleccionados de la patente P200601538*

15 El índice terapéutico o IT constituye una medida del margen de seguridad de un medicamento. Se expresa numéricamente como una relación entre la dosis del medicamento que causa la muerte (dosis letal o DL) o un efecto nocivo en una proporción "x" de la muestra y la dosis que causa el efecto terapéutico deseado (dosis efectiva o DE) en la misma o mayor proporción "y" de la muestra. Este concepto se puede formular como:

20
$$IT = DL_{50}/DE_{50}$$

25 donde el número 50 significa el 50% de la población. El margen de seguridad es tanto mayor cuanto mayor es el valor del índice, siendo extremadamente reducido, y por tanto muy peligroso, el consumo del compuesto en cuestión cuando su valor se aproxima a 1.

De forma análoga, en la presente invención se ha definido el índice terapéutico *in vitro* o experimental de un compuesto como el cociente entre la CI_{50} de la línea celular normal y la CI_{50} de ese mismo compuesto en la respectiva línea celular tumoral.

5.10 *Selectividad y especificidad de los compuestos de la invención*

35 Se determinó la CI_{50} sobre MCF-7, y sobre MCF-10A y se calcularon los IT *in vitro* de los compuestos de la invención, y se compararon con los valores obtenidos para compuestos del estado de la técnica.

Las Tablas 3 y 4 resumen los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

40

45

50

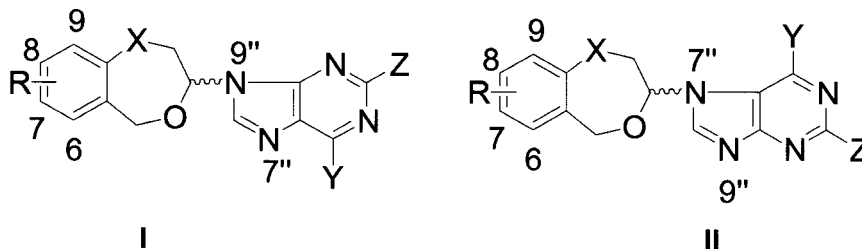
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I o de fórmula general II,



donde,

X representa un grupo bencénsulfonamido sustituido en posición *orto*, *meta* o *para* por un grupo nitro, amino o fluoren-9-ilmetilcarbamato;

Y representa un grupo seleccionado del grupo formado por -Cl ó -I

Z representa un grupo -Cl

R representa un sustituyente seleccionado del grupo formado por H, -Cl, -Br, -I, -F, -CF₃, en las posiciones 7 y/o 9 del anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros,

seleccionado del grupo formado por:

- (*RS*)-2,6-dicloro-9-[1-(*p*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (*ACG-812b F3*)

- (*RS*)-2,6-dicloro-9-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (*FC-26c*)

- (*RS*)-2-Cloro-6-iodo-9-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-9*H*-purina (*FC-35*)

- (*RS*)-2,6-dicloro-7-[1-(*o*-nitrobencénsulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-7*H*-purina (*FC-30b2*).

2. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según reivindicación 1, junto con al menos un excipiente farmacológica aceptable.

3. Compuesto según reivindicación 1, para su uso como medicamento.

4. Compuesto según la reivindicación 3, para su uso como medicamento para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, preferiblemente el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y los síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos.

5. Empleo de al menos un compuesto según reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer preferiblemente el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y los síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 747

② Nº de solicitud: 200802431

③ Fecha de presentación de la solicitud: **07.08.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | ES 2303444 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA & UNIVERSIDAD DE JAÉN) 01.08.2008, fórmulas generales I y II; página 6, líneas 30-42,53-63. | 1,2,4-8 |
| A | DÍAZ-GAVILÁN, M. et al. "Anticancer activity of (1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl)-pyrimidines and -purines against the MCF-7 cell line: Preliminary cDNA microarray studies". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2008, Volumen 18, Número 4, páginas 1457-1460. [Disponible en línea el 01 de Enero de 2008]. Ver especialmente página 1457, resumen; página 1458, figura 3; página 1459, esquema 1. | 1-8 |
| A | DÍAZ-GAVILÁN, M. et al. "Synthesis and reactivity of (RS)-6-chloro-7- or 9-(1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl)-7H- or 9H-purines bearing a nitrobenzenesulfonyl group on the nitrogen atom". Tetrahedron 2007, Volumen 63, Número 24, páginas 5274-5286. Ver especialmente página 5278, figura 2, compuestos 13 y 14; página 5275, esquema 1. | 1-8 |
| A | NÚÑEZ, M.C. et al. "Synthesis and anticancer activity studies of novel 1-(2,3-dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-3-yl)-uracil and (6'-substituted)-7- or 9-(2,3-dihydro-5H-1,4-benzodioxepin-3-yl)-7H- or 9H-purines". Tetrahedron 2006, Volumen 62, Número 4, páginas 11724-11733. Ver especialmente página 11724, resumen; página 11725, figura 2. | 1-8 |

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

08.02.2010

Examinador

G. Esteban García

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 473/00 (2006.01)

C07D 473/40 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 267/14 (2006.01)

A61K 31/553 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, ISI-WOK, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.02.2010

Declaración

| | | | |
|--|------------------|---------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | 3 | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1,2,4-8 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | 3 | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1,2,4-8 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | ES 2303444 A1 | 01-08-2008 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general I ó II derivado de benzodiazepina, una composición farmacéutica que comprende al menos uno de dichos compuestos, el empleo de al menos un compuesto de fórmula I ó II en la elaboración de un medicamento y un procedimiento para la preparación de dicho compuesto que comprende una reacción de condensación entre un compuesto de fórmula general (1) y una base púrica de fórmula general (2).

El documento D01 divulga una familia de compuestos con estructura de 2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepin-3-il)purinas con actividad antitumoral y fórmulas generales I y/ó II, entre las que se encontrarían las 2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiazepin-3-il)purinas, en las que X es un grupo bencenosulfonilamino sustituido en orto, meta o para por un grupo nitro o amino, o un grupo fluorenilmetilcarbamato. Dicha fórmula general, cuando el sustituyente Z es cloro e Y es cloro, bromo, iodo o -SPh, solapa con la fórmula general I ó II de la invención (ver página 4, fórmulas generales I y II). Estos compuestos se obtienen por condensación entre el derivado 3-metoxi-2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepínico con la base púrica, ácido de Lewis, trimetilclorosilano y 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (ver página 6, líneas 53-63).

El documento divulga también el empleo de los compuestos I y II en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, así como las formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto I ó II como ingrediente activo (ver página 6, líneas 30-42).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 4-8 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes).

Sin embargo, no se ha encontrado en el documento D01 ni en el estado de la técnica mencionado en el informe de búsqueda internacional sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicación 3, que se refiere a cuatro compuestos concretos que responden a la fórmula general I ó II en los que Z es cloro e Y es cloro o iodo.

En consecuencia, se considera que la invención definida en la reivindicación 3 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.