



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 343 880**

⑫ Número de solicitud: 200950054

⑬ Int. Cl.:
A61K 31/53 (2006.01)
C07D 495/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑭ Fecha de presentación: **07.05.2008**

⑮ Prioridad: **10.05.2007 EP 07380133**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2010**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.08.2010

⑱ Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES

⑲ Inventor/es: **Rodríguez Quesada, Ana;**
Martínez Poveda, Beatriz;
Medina Torres, Miguel Ángel;
Muñoz Chápuli, Ramón;
Fernández Medarde, Antonio;
Quintela López, José María y
Riguera Vega, Ricardo Jesús

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Piridotienotriazinas como compuestos antiangiogénicos.**

㉒ Resumen:
Piridotienotriazinas como compuestos antiangiogénicos.
La presente invención se refiere a derivados de piridotie-
notriazinas con actividad antioangiogénica y su uso en la
preparación de composiciones farmacéuticas o medica-
mentos para el tratamiento de enfermedades es las que
está implicado el proceso de la angiogénesis, como son
cáncer, obesidad, retinopatías diabáticas, degeneración
macular, hemangiomas, artritis, psoriasis y aterosclerosis.

ES 2 343 880 A1

DESCRIPCIÓN

Piridotienotriazinas como compuestos antiangiogénicos.

5 Sector técnico

La presente invención se relaciona con el uso de algunos derivados de piridotienotriazinas como compuestos antiangiogénicos y su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer, obesidad, retinopatías diabéticas, degeneración macular, hemangioma, artritis, psoriasis y aterosclerosis.

Técnica anterior

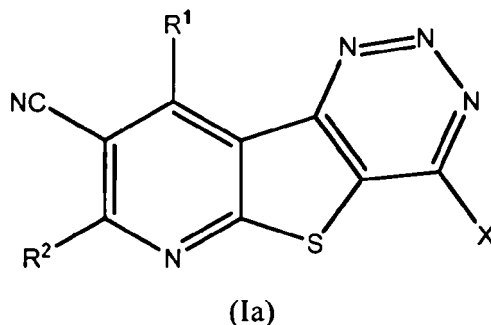
La angiogénesis es la generación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. En condiciones fisiológicas, la angiogénesis está bajo un control muy estricto y sólo tiene lugar durante el desarrollo embrionario y en procesos relacionados con el ciclo reproductor femenino, la reparación de fracturas y la cicatrización de heridas. Sin embargo, en muchos procesos patológicos (por ejemplo el crecimiento tumoral y su diseminación en las metástasis, enfermedades oftálmicas como retinopatía diabética y degeneración macular, hemangiomas, artritis, psoriasis, aterosclerosis...), la enfermedad se ha relacionado con una angiogénesis desregulada y continuamente activa (J. Nat. Med. 1995, 1, 27-31).

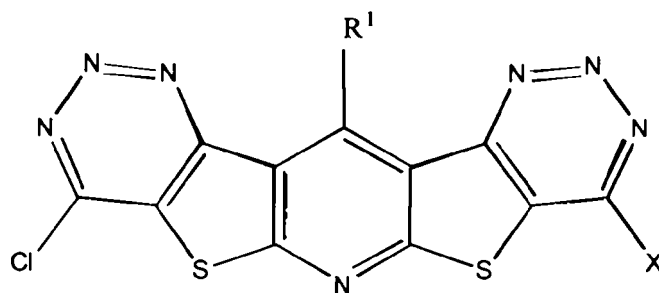
Aunque se desconocen todos los mecanismos que conducen a la angiogénesis patológica, las evidencias experimentales indican que el proceso final es el resultado de un balance entre factores pro-angiogénicos e inhibidores de la angiogénesis. Desde la pionera hipótesis de J. Folkman de que los tumores son dependientes de angiogénesis (J. New Eng. J. Med. 1971, 285, 1182-1186), ha quedado demostrado clínicamente que la inhibición o prevención de la angiogénesis supone una atractiva alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer y las otras enfermedades dependientes de la angiogénesis (Cáncer Res. 1998, 152, 341-352; Angiogenesis 1998, 2, 295-307).

El desarrollo de nuevos vasos es un complejo proceso que consta de varias etapas, que incluyen a activación de las células endoteliales por acción del estímulo angiogénico, la síntesis y liberación de proteasas que permitirán a las células endoteliales migrar, proliferar y finalmente diferenciarse para generar los nuevos tubos capilares. Cualquiera de estos pasos puede ser una diana para la intervención farmacológica de la angiogénesis.

Aunque la angiogénesis es un proceso altamente regulado en condiciones fisiológicas, un descontrol en esta regulación, conducente a una activación permanente de la angiogénesis es característica de una serie de patologías (que podríamos denominar "enfermedades dependientes de angiogénesis"), tal y como hemos comentado anteriormente. Así pues la desregulación de la angiogénesis puede ser la causa directa o bien exacerbar una determinada condición patológica. Por ejemplo, el crecimiento de la metástasis de un tumor sólido es dependiente de la angiogénesis. Con base a estos descubrimientos, surge una continua necesidad de compuestos que muestren una actividad antiangiogénica, debido a su potencial uso en el tratamiento de diversas patologías, y entre otras el cáncer.

Los derivados de piridotienotriazinas de fórmula general (Ia) o (Ib)





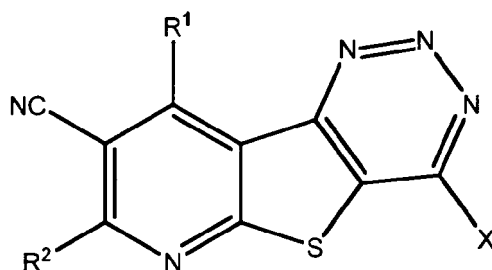
(Ib)

donde X es un átomo de halógeno, R¹ se selecciona de un grupo formado por hidrógeno, y un grupo fenilo sustituido o no sustituido, y R² se selecciona de un grupo formado por NH₂, NH-alquilo inferior, N-(alquilo inferior)₂, NH-bencilo, y piperidina-bencilo, son compuestos conocidos (Eur. J. Med. Chem. 1998, 33, 887-897, J. Med. Chem. 1999, 42, 4720-4724, y Eur. J. Med. Chem. 2003, 38, 265-275) que han sido descritos como inhibidores de la generación de óxido nítrico y prostaglandina E₂ por macrófagos murinos, como inhibidores de la producción de histamina por mastocitos, y como antiprotozoos frente a *Philasterides dicentrarchi*, pero la actividad antiangiogénica de los derivados de piridotienotriazinas de fórmula general (I) no se ha descrito previamente.

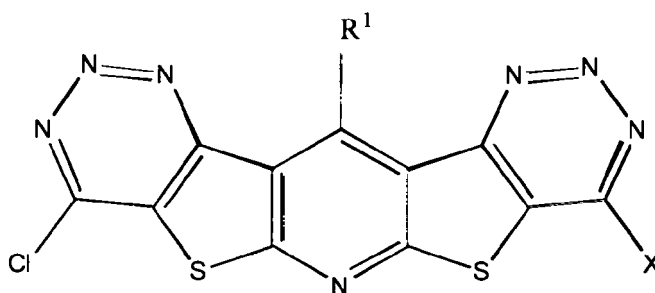
Divulgación de la invención

La presente invención está dirigida al uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis (en particular cáncer, enfermedades oftálmicas como retinopatía diabética y degeneración macular, hemangiomas, artritis, psoriasis, aterosclerosis...), de compuestos de fórmula general (Ia) o (Ib), de una sal aceptable farmacéuticamente, un derivado o profármaco.

Los derivados de piridotienotriazina de fórmula general (Ia) o (Ib)



(Ia)



(Ib)

donde X es un átomo de halógeno, R¹ se selecciona de un grupo formado por hidrógeno, y un grupo fenilo sustituido o no sustituido, y R² se selecciona de un grupo formado por NH₂, NH-alquilo inferior, N-(alquilo inferior)₂, NH-bencilo, y piperidina-bencilo.

5 En la definición anterior de compuestos de fórmula (Ia) o (Ib), los siguientes términos tienen el significado que se indica a continuación:

“Alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, neopentilo y hexilo.

10 “Halógeno” incluye F, Cl, Br y I.

Las referencias a un grupo fenilo sustituido en los compuestos de la presente invención se refieren al grupo fenilo que puede ser sustituido en una o más posiciones disponibles por uno o más grupos adecuados, tales como F, Cl, Br y I; ciano; hidroxilo; nitro; azido; alcanilo como un grupo alcanilo C1-6 como acilo y similares; carboxamido; grupos alquilo que incluyen aquellos que tienen entre 1 y 12 átomos de carbono, o de 1 a 6 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono; grupos alqueno y alquino, incluyendo aquellos grupos que tienen uno o más enlaces insaturados y de 2 a 12 átomos de carbono, o de 2 a 6 átomos de carbono; grupos alcoxilo que tienen uno o más oxígenos y de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; grupos ariloxilo como el fenoxilo; grupos alquiltio, incluyendo los que tienen uno o más enlaces tioéter y de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; grupos alkilsulfonilo incluyendo los que tienen uno o más enlaces sulfonilo y de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; grupos aminoalquilo tales como grupos que contengan uno o más átomos de N y de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, o de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; grupos arilo de 6 o más carbonos, en particular fenilo o naftilo y grupos aralquilos como el bencilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo sustituido opcionalmente puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo, y cada sustitución es independiente de la otra.

30 El término “una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco” se refiere a cualquier sal aceptable farmacéuticamente, éster, solvato, hidrato o cualquier otro compuesto que, tras la administración al receptor, sea capaz de producir (directa o indirectamente) un compuesto tal y como se describe aquí. La preparación de sales, profármacos y derivados podrá ser llevada a cabo por métodos ya conocidos.

35 Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (Ia) o (Ib) se sintetizan por métodos químicos convencionales a partir de compuestos que contienen un grupo ácido o básico. Generalmente estas sales se sintetizan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de dichos compuestos con cantidades estequiométricas de la base o ácido apropiados en agua, o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos. Generalmente son preferibles los medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetoni-
40 trilo. Ejemplos de sales de adición ácida son las sales de adición de ácidos minerales como por ejemplo hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato, fosfato y las sales de adición de ácidos orgánicos como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Ejemplos de sales de adición de álcali son sales inorgánicas como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales de álcalis orgánicos como, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y de aminoácidos básicos.

50 El término “profármaco” se usa en el sentido más amplio y se refiere a aquellos derivados que son convertidos *in vivo* en los compuestos de fórmula (Ia) o (Ib). Tales derivados incluyen, por ejemplo, compuestos en los que un grupo hidroxilo libre se convierte en un derivado esterificado.

Los compuestos de fórmula (Ia) o (Ib) pueden incluir enantiómeros dependiendo de su asimetría o diastereoisómeros. El uso de isómeros aislados o mezcla de los isómeros cae dentro del alcance de la presente invención.

55 Las composiciones farmacéuticas comprenden un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal aceptable farmacéuticamente, derivado, profármaco o estereoisómero junto con un agente portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

60 En una aplicación preferida las composiciones farmacéuticas serán en forma oral, sólida o líquida. Las dosis adecuadas para la administración podrán suministrarse en forma de comprimidos, cápsulas, siropes o disoluciones y podrán contener excipientes convencionales tales como agentes de unión, por ejemplo siropes, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; rellenos como lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes como estearato de magnesio; desintegrantes como almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables como el laurilsulfato sódico.

Las composiciones orales sólidas se pueden preparar por métodos convencionales de mezcla, relleno o comprimido. La remezcla se puede emplear para distribuir el agente activo en aquellas composiciones que empleen grandes cantidades de relleno. Tales operaciones son convencionales. Los comprimidos pueden por ejemplo prepararse por granulación seca o húmeda y cubrirse opcionalmente mediante métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica, en particular con un recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar también para administración parenteral, como disoluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma adecuada para la unidad de dosis. Se podrán usar los excipientes adecuados, tales como agentes de carga, agentes tamponadores o surfactantes.

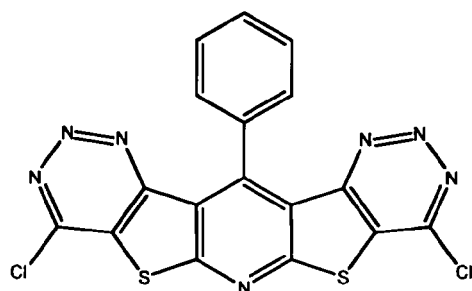
Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos estándares tales como los descritos o referidos en las farmacopeas españolas o estadounidenses y en textos de referencia similares.

La administración de compuestos de fórmula (Ia), (Ib) o sus composiciones puede ser por cualquier método adecuado, tales como infusión intravenosa, preparaciones orales, y administración intraperitoneal e intravenosa. La administración oral es preferida debido a la conveniencia para el paciente y el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

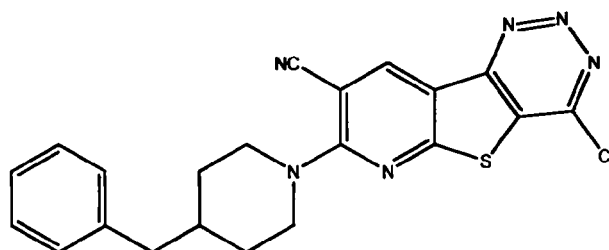
Generalmente la cantidad efectiva administrada de un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib) dependerá de la eficacia relativa del compuesto elegido, de la gravedad de la enfermedad a tratar y del peso del paciente. Los compuestos se administrarán típicamente una o más veces al día por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces al día, con dosis totales diarias en el rango de 0.1 a 1000 mg/kg/día.

Los compuestos de fórmula (Ia), (Ib), y sus correspondientes combinaciones pueden usarse con otros fármacos en una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o ser suministrados como una composición independiente para su administración simultánea o en un momento distinto.

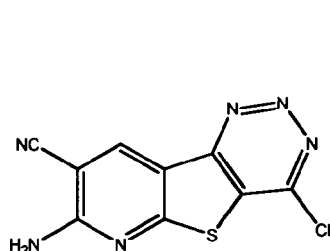
Los compuestos particularmente preferidos de los comprendidos en las fórmulas generales (Ia) o (Ib) son los compuestos I, II, III, y IV:



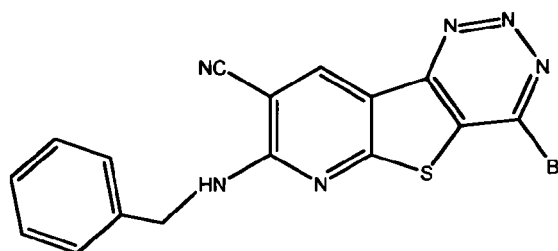
Compuesto I



Compuesto II



Compuesto III



Compuesto IV

El compuesto (I) se obtiene preferentemente como se describe en (Eur. J. Med. Chem. 1998, 33, 887-897), los compuestos II, III, y IV se obtienen preferentemente como se describe en (J. Med. Chem. 1999, 42, 4720-4724). De forma similar, cualquier compuesto de fórmulas (Ia) o (Ib) se puede obtener mediante los procedimientos estándares de síntesis orgánica y siguiendo la guía de los mencionados documentos.

Maneras de realización de la invención*Cultivos celulares*

Las células de aorta bovina (BAE) se mantuvieron en medio DMEM con glucosa (1 g/L), glutamina (2 mM), penicilina (50 IU/mL), estreptomycin (50 µg/mL), y anfotericina (1.25 µg/mL) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Br. J. Cáncer 1995, 71, 770-775). Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVE) se aislaron a partir de cordones umbilicales mediante digestión con colagenasa (J. Cell. Biol. 1988, 107, 1589-1598) y se mantuvieron en Medio 199 conteniendo HEPES (10 mM), L-glutamina (2 mM), heparina (10 mg/mL), penicilina (50 IU/mL), estreptomycin (50 µg/mL), y anfotericina (1.25 µg/mL), suplementado con 3 mg/L de suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS, Sigma) y 20% FBS en 5% CO₂ y 37°C.

Actividades de los compuestos I-IV

Ensayo de diferenciación de las células endoteliales: Formación de estructuras tubulares sobre Matrigel

Se cubrieron los pocillos de una placa de 96 con 50 µL de Matrigel (10.5 mg/mL) a 4°C y se les dejaron polimerizar a 37°C por al menos 30 min (FASEB J. 2002, 16, 261-263). Se añadieron a cada pocillo 5x10⁴ células BAE en 200 µL de DMEM. Para las células HUVE, se añadieron 2.5x10⁴ células en 200 µL Medio 199 suplementado con 5% FBS. Por último, se añadieron diferentes concentraciones de cada compuesto I-IV, incubando a 37°C en una cámara humidificada y con el 5% CO₂. Tras 7 horas de incubación, se observaron y fotografiaron los pocillos con ayuda de un microscopio invertido NIKON DIAPHOT-TMD (NIKON Corp., Tokio, Japón).

En la tabla I se muestran los resultados de la mínima concentración de compuestos I-IV (MIC) que daban una completa inhibición de la morfogénesis endotelial sobre Matrigel de células BAE y HUVE.

TABLA I

Células	MIC (µg/mL)			
	Compuesto I	Compuesto II	Compuesto III	Compuesto IV
BAE	0.9	1	0.2	5
HUVE	2.2	2.5	2.5	-

Ensayo de crecimiento celular

Se empleó el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en placas de 96 pocillos, según se describe en (Anticancer Res. 2001, 21, 3457-3460). Se incubaron 3x10³ BAE, 4x10³ HUVE en un volumen total de 100 µL de sus respectivos medios de crecimiento con diluciones seriadas de los compuestos I-IV. Tras 3 días de incubación (37°C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda) se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pocillo y la placa se incubó otras 4 horas (37°C). El formazano resultante se disolvió en 150 µL de 0.04 N HCl-2 propanol y su absorbancia se leyó a 550 nm con ayuda de un lector de placas. El valor de IC₅₀ se calculó como la concentración de compuesto que daba un 50% de la supervivencia celular del control sin tratar.

Los valores de IC₅₀ para los compuestos I-IV frente a células BAE y HUVE se muestran en la tabla II:

TABLA II

Células	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Compuesto I	Compuesto II	Compuesto III	Compuesto IV
BAE	6.2	3.9	1.2	2.4
HUVE	7.5	1.3	0.04	0.3

Ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM)

TABLA III

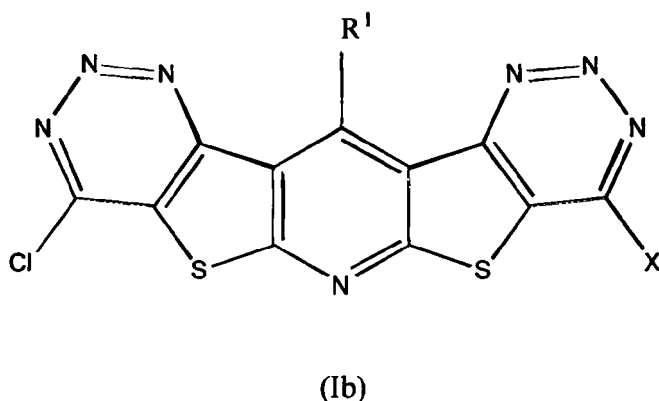
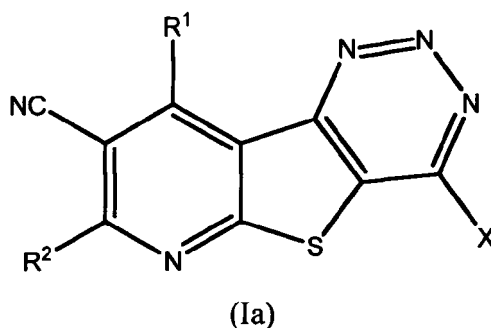
Dosis ($\mu\text{g}/\text{CAM}$)	Compuesto I	Compuesto II	Compuesto III	Compuesto IV
0	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)
0.02	20 (1/5)		0 (0/3)	
0.05	75 (3/4)	0 (0/4)	40 (2/5)	-
0.1	100 (4/4)	80 (4/5)	40 (2/5)	-
0.2	100 (3/3)	33 (2/6)	25 (1/4)	-
0.5	100 (3/3)	60 (3/5)	20 (1/5)	0 (0/3)
1	100 (4/4)	100 (4/4)	67 (2/3)	33 (1/3)
2	100 (4/4)	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (4/4)
5	100 (3/3)	-	-	25 (1/4)

El ensayo CAM se llevó a cabo como se describió en (FASEB J. 2002, 16, 261-263). Los huevos fertilizados de gallina se incubaron horizontalmente a 38°C en un incubador humidificado, se les abrió una ventana al día 3 de incubación y se procesaron al día 8. Los compuestos a analizar se añadieron a una disolución del 0.7% de metilcelulosa en agua. En una cámara de flujo laminar y sobre una superficie de Teflón, se secaron gotas de 10 μL de esta solución, que luego se implantaron sobre la CAM. Tras 48 horas de reincubación, dos personas observaron de forma independiente la CAM mediante un estereomicroscopio. El ensayo se consideró positivo cuando ambas personas reportaron una disminución significativa de la vascularización en el área tratada.

La tabla III resume la evaluación de la inhibición de la angiogénesis *in vivo* mediante el ensayo CAM por los compuestos I-IV. Los datos aparecen como porcentaje de inhibición. Entre paréntesis se indican el número de huevos con angiogénesis inhibida en sus CAMs por el número total de huevos tratados.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib)



donde X es un átomo de halógeno, R¹ se selecciona de un grupo formado por hidrógeno, y un grupo fenilo sustituido o no sustituido, y R² se selecciona de un grupo formado por NH₂, NH-alquilo inferior, N-(alquilo inferior)₂, NH-bencilo, y piperidina-bencilo, o una sal aceptable farmacéuticamente, profármaco o solvato del mismo; en la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis.

2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es cáncer.

3. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es retinopatía diabética.

4. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es degeneración macular.

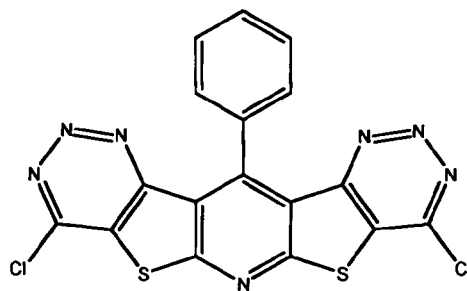
5. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es hemangiomas.

6. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es artritis.

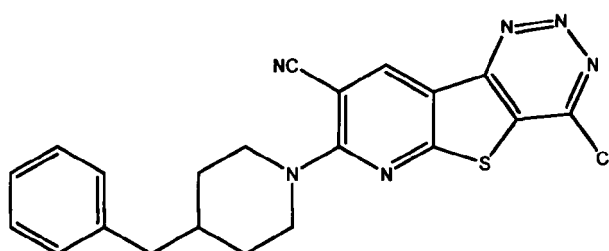
7. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es psoriasis.

8. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 donde la enfermedad dependiente de angiogénesis es aterosclerosis.

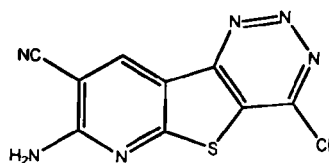
9. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 1-8 donde el compuesto de fórmula (Ib) es



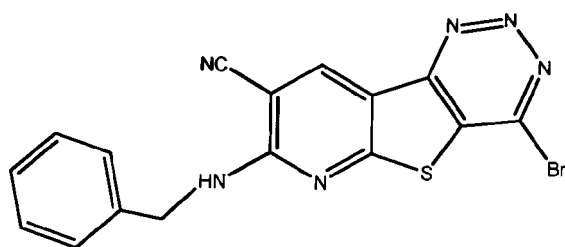
10. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 1-8 donde el compuesto de fórmula (Ia) es



11. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 1-8 donde el compuesto de fórmula (Ia) es



12. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 1-8 donde el compuesto de fórmula (Ia) es





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 343 880

⑫ Nº de solicitud: 200950054

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.05.2008

⑭ Fecha de prioridad: 10.05.2007

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EUROPEAN JOURNAL MEDICINAL CHEMISTRY 1998, vol. 33, páginas 887-897. QUINTELA et al., "Synthesis, antihistaminic and cytotoxic activity of pyridothieno- and pyridodithienotriazines" pág. 887 columna derecha, pág. 888 columna izquierda, tabla I compuestos 8 a-c, figura 4 compuesto 15, página 894 apartado 4.4 y apartado 5 último párrafo. Citada en la solicitud.	1-12
X	WO 02094193 A1 (HAMDI et al.) 28.11.2002, párrafos 002-005.	3-12
A	JOURNAL MEDICINAL CHEMISTRY 1999, vol. 42, páginas 4720-4724. QUINTELA et al., "Synthesis and pharmacological evaluation of some 8-cyanopyrido(3',2':4,5) thieno (3,2-d)triazine derivatives as inhibitors of nitric oxide and eicosanoid byosynthesis" tabla I compuestos 13-22. Citada en la solicitud.	1-12

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

02.09.2008

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/53 (2006.01)

C07D 495/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)