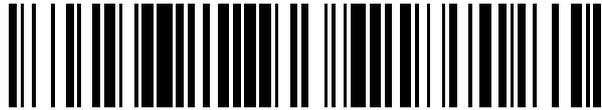


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 355 786**

21 Número de solicitud: 201050019

51 Int. Cl.:

**A61K 36/00**

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.12.2009**

30 Prioridad:  
**30.12.2008 ES 200900078**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2011**

Fecha de la concesión: **23.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **02.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**02.02.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
HOSPITAL REAL. CUESTA DEL HOSPICIO S/N  
18071 GRANADA, ES y  
UNIVERSIDAD DE JAEN**

72 Inventor/es:  
**ARANEGA JIMENEZ, ANTONIA;  
ALVAREZ DE MANZANEDA ROLDAN, ENRIQUE;  
CHAHBOUN, RACHID;  
RODRIGUEZ SERRANO, FERNANDO;  
BOULAIZ, HOURIA;  
MARCHAL CORRALES, JUAN ANTONIO;  
MELGUIZO ALONSO, CONSOLACION;  
PERAN QUESADA, MACARENA;  
PRADOS SALAZAR, JOSE CARLOS y  
MESSOURI, IBTISSAM**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE MEROSSESQUITERPENOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS  
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL.**

57 Resumen:

Análogos sintéticos de merosesquiterpenos y compuestos relacionados con actividad antitumoral. La invención se refiere a las propiedades antitumorales frente a tumores sólidos, tales como los cánceres de mama, neuroblastomas, pulmón, colorrectal, hepático y páncreas tanto en humanos como en animales, de compuestos sintéticos que presentan una estructura merosesquiterpénica relacionada con los metabolitos marinos del tipo puupehenona.

ES 2 355 786 B1

## DESCRIPCIÓN

Análogos sintéticos de merosesquiterpenos y compuestos relacionados con actividad antitumoral.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con las propiedades farmacológicas antitumorales útiles de nuevos compuestos sintéticos de estructura merosesquiterpénica y compuestos relacionados, similares a los metabolitos marinos del tipo puupehona frente a tumores sólidos, tales como los cánceres de mama, neuroblastomas, pulmón, colorrectal, hepático y páncreas, y frente a síndromes mieloproliferativos agudos y crónicos tanto en humanos como en animales. Además, la invención se relaciona con las fórmulas farmacéuticas que comprenden dichos compuestos en su uso farmacológico.

**Antecedentes de la invención**

15 El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la existencia de una proliferación anormal de células. Lo que confiere la característica de malignidad a esta proliferación celular es su capacidad para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia.

En términos absolutos, el cáncer es la primera causa de muerte en España, con 94.100 muertes en 2003 (59.500 en hombres y 34.600 en mujeres), lo que supuso el 25,6% de todas las defunciones. El carcinoma mamario es el cáncer de mayor prevalencia en la mujer, aunque también se presenta en hombres. Se estima que 216.000 mujeres han manifestado la enfermedad en la Unión Europea durante el año 2000 [Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. *Breast cancer in Europe. ENCR Fact Sheets of the International Agency for Research on Cancer. (2002) Vol. 2*], El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en hombres de la Unión Europea, y la tercera en mujeres. En dicho territorio, el cáncer de pulmón tuvo una mortalidad estimada de 171.990 varones y 64.100 mujeres durante 2006. [Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol (2007); 18:581-92*]. Por último, el cáncer colorrectal es el segundo cáncer más frecuente en España, siendo responsable del 11.5% del total de muertes provocadas por cáncer en hombres y del 14.9% en mujeres [López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gomez B. *Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III (2003)*].

El tratamiento del cáncer en general depende de una gran cantidad de factores, siendo las principales estrategias la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia fotodinámica y algunas que están en fase experimental como la terapia génica.

35 En el cáncer de mama se usan agentes como el tamoxifeno, taxanos, paclitaxel y doxorubicina [Glück S. *Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: optimal use of epirubicin. Oncologist (2005); 10(10):780-91*]. Por otro lado, como quimioterapia adyuvante en el cáncer de pulmón se puede utilizar el cisplatino y taxol-carboplatino, cisplatino-vinorelbina, cisplatino-docetaxel y carboplatino-docetaxel. Como agentes quimioterapéuticos de segunda línea actualmente destacaremos el docetaxel, premetrexed y los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como erlotinib y gefitinib. Por último, bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea el factor de crecimiento vasculo endotelial ha sido usado en combinación con paclitaxel y carboplatino [de Cos Escuin JS, Delgado IU, Rodríguez JC, López MJ, Vicente CD, Miranda JA. *Stage IIIA and IIIB non-small cell lung cancer: results of chemotherapy combined with radiation therapy and analysis of prognostic factors. Arch Bronconeumol (2007). 43 (7):358-65*]. En el cáncer de colon, se ha demostrado que el medicamento quimioterapéutico 5-fluorouracilo incrementa la posibilidad de cura en ciertos pacientes. En los últimos cinco años se ha incorporado otros compuestos como irinotecan, oxaliplatin y capecitabina, así como anticuerpos monoclonales frente a dianas moleculares como cetuximab y bevacizumab [Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. *Colorectal cancer. Lancet (2005); 365:153-165*].

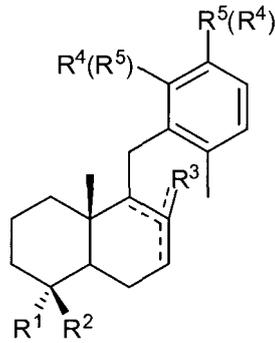
50 La aplicación de los fármacos antineoplásicos anteriormente mencionados en este tipo de patologías, aunque provocan una respuesta parcial mejorando el pronóstico de los pacientes, provocan efectos adversos a veces limitantes en cuanto a su capacidad de ser aplicados, que justifican la necesidad de desarrollar nuevos compuestos con mayor efectividad y menor toxicidad.

55 Debemos destacar dentro de las toxicidades que provocan los compuestos antitumorales que actualmente se emplean, la aparición de infecciones principalmente en el tracto urinario y en el tracto superior de las vías respiratorias. Además pueden aparecer trastornos sanguíneos, cardíacos, renales, inmunológicos, del sistema nervioso, y trastornos gastrointestinales. [Bonomi P, Kim K, Chang A, Johnson D *Phase III trial comparing etoposide and cisplatin versus Taxol with cisplatin-GCSF versus taxol-cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. Proc Am Soc Clin Oncol (1996); 15:382-7*; Hainsworth JD, Urba WJ, Hon JK, Thompson KA, Stagg MP, Hopkins LG. *One-hour paclitaxel plus carboplatin in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: result of a multicentre, phase II trial. Eur J Cancer (1998); 34:654-8*].

65 Todas estas alteraciones son uno de los factores que limitan la aplicación de los tratamientos actuales con agentes quimioterapéuticos. El desarrollo de nuevos agentes que mejoren la respuesta antitumoral, provocando menores efectos secundarios es un elemento clave para que mejore de forma significativa el pronóstico de los pacientes afectos de cánceres sólidos tales como los de mama, neuroblastoma, pulmón y colorrectal, hepático y páncreas, así como en el caso de síndromes mieloproliferativos.

**Descripción de la invención**

En un primer punto, la invención reivindica las propiedades antitumorales frente a tumores sólidos, tales como los cánceres de mama, neuroblastomas, pulmón, colorrectal, hepático y páncreas, y frente a síndromes mieloproliferativos agudos y crónicos tanto en humanos como en animales, de compuestos sintéticos que presentan una estructura mero-



**1**

Donde:

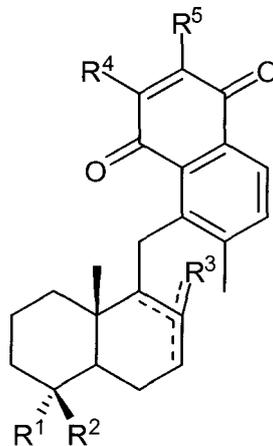
Las líneas punteadas indican las tres posiciones posibles, y excluyentes entre sí, de un doble enlace.

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan, independientemente, un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COOH, -COR, -COOR, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo.

R<sup>3</sup> representa un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR (donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo), cuando el doble enlace es endocíclico, y R<sup>3</sup> representa un grupo metileno o un oxígeno cuando el doble enlace es exocíclico.

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, representan independientemente un grupo seleccionado de entre -H, -R, -CHO, -COR, -CN, -COOH, -COOR, -CF<sub>3</sub>, -COOCO-, -SO<sub>2</sub>R, -NO<sub>2</sub>, -COCl, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH=CH<sub>2</sub>, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR y halógeno; donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o arilo.

y



**2**

Donde:

Las líneas punteadas indican las tres posiciones posibles, y excluyentes entre sí, de un doble enlace.

5  $R_1$  y  $R_2$  representan, independientemente, un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo.

10  $R^3$  representa un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR (donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo), cuando el doble enlace es endocíclico, y  $R_3$  representa un grupo metileno o un oxígeno cuando el doble enlace es exocíclico.

15  $R^4$ ,  $R^5$  representan independientemente un grupo seleccionado de entre -H, -OH, -R, -OR y halógeno, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o arilo.

La presente invención se centra en la utilización de dichos compuestos, en sus cantidades terapéuticas adecuadas y a través de cualquier método o medio de administración, en la terapia antitumoral tanto para el tratamiento como para la profilaxis del cáncer.

20 En un segundo punto, la reivindicación se extiende a las fórmulas farmacéuticas utilizadas para el tratamiento del cáncer que comprendan la utilización de al menos uno de los compuestos de la invención, independientemente del resto de componentes activos o de los excipientes que formen parte de dicho medicamento o fórmula farmacéutica.

25 En un tercer punto, la presente invención contempla del mismo modo, los derivados de los compuestos miembros de las familias objeto de la invención, así como las formas químicas de sales, combinaciones con ácidos y bases de dichos compuestos.

30 A continuación se expondrán algunos ejemplos concretos que permitan clarificar el objeto de la presente invención, sin que se entienda por ello, como la limitación del alcance de la invención. Se describirá la determinación de la capacidad antitumoral de miembros de las familias de compuestos que responden a las fórmulas generales I y II respectivamente.

### 1. Líneas celulares

35 La actividad antitumoral de diferentes compuestos que responden a las fórmulas generales I y II, respectivamente, ha sido evaluada utilizando las siguientes líneas celulares tumorales:

40 - MCF7: línea celular de tipo epitelial derivada a partir de un adenocarcinoma de la glándula mamaria humana, de una paciente de etnia caucásica de 69 años. Las células expresan receptores de estrógenos y el oncogén WNT7B, y entre los productos celulares que producen se encuentran proteínas de unión al factor tipo-insulina, BP-2, BP-4 y BP-5. La línea celular está catalogada en la ATCC (American Type Culture Collection) bajo el código HTB-22.

45 - T84: línea celular de morfología epitelial aislada a partir de una metástasis pulmonar de un carcinoma colorrectal de un paciente de 72 años de edad. Las células de esta línea presentan receptores para un amplio grupo de hormonas y neurotransmisores, y entre los productos celulares que expresan se encuentra el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la queratina. La línea está catalogada en la ATCC con el código CCL-248.

50 - A549: línea celular que fue establecida en 1972 a partir de un explante procedente de tejido carcinomatoso de pulmón de una paciente caucásica de 58 años de edad. Se caracterizan por producir queratina. Su código de la ATCC es CCL-185.

Las 3 líneas celulares fueron obtenidas a través del Servicio de Cultivos Celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### 55 2. Mantenimiento de los cultivos

60 Los cultivos de células se realizaron en una cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) bajo condiciones de esterilidad. Los frascos de cultivo estériles Falcon (25 o 75 cm<sup>2</sup>, Corning Costar), se mantuvieron en una estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

65 Para el cultivo de las líneas MCF-7 y A-549 se utilizó el medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) (13,37 gr de medio base), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) en calor húmedo a 56°C durante 30 minutos. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO<sub>3</sub> al 7,5%, y 10 ml buffer Hepes (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 1M pH 7,2 y suplementado con 40 mg/l de gentamicina (Antibióticos S.A), 500 mg/l de ampicilina (Antibióticos S.A), 10 ml de L-glutamina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) 200 mM, 0,1 IU/ml de Insulina bovina (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml.

Para el cultivo de la línea T-84 se utilizó una mezcla con una relación 1:1 del medio de cultivo anterior y Ham F12, y la cantidad final de suero fetal bovino inactivado fue del 5%. En ambos casos, una vez preparado el medio de cultivo fue filtrado con filtros Millex estériles de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, France) y conservado en frascos estériles.

5 Durante el cultivo celular las células tuvieron que ser resembradas en nuevos envases Falcon, conforme se alcanzaba la confluencia celular. Para ello, las células fueron lavadas dos veces con PBS (Tampón salino de fosfato, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), con un volumen de 0,2 ml/cm<sup>2</sup>, y despegadas con 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de tripsina-EDTA (0,25% Tripsina, 0,02% EDTA en PBS, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA).

10 Transcurrido el tiempo necesario, se bloqueó la acción de la tripsina mediante la adición del correspondiente medio de cultivo con suero fetal. Tras centrifugar, el pellet de células se resuspendió en medio de cultivo estéril y tras realizar el conteo del número total de células con cámara de Neubauer, se diluyeron los pellets hasta obtener una concentración de  $2 \times 10^4$  células/ml, que fueron dispuestas en nuevos frascos de cultivo.

15 Para el conteo de las células mediante cámara de Neubauer, se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de las suspensiones celulares, sobre las que se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán al 0,5%, para poder determinar la viabilidad de las células. Las mezclas se dispusieron en cámaras de Neubauer y se contabilizaron 5 cuadrantes, de manera que el número de células/mL se obtuvo mediante la siguiente fórmula: Media del número de células contabilizadas en los 5 cuadrantes x factor dilución (2) x  $10^4$ .

20

### 3. Método de congelación celular.

25 Para la congelación celular, las células fueron despegadas de la superficie de los frascos de cultivo mediante el protocolo descrito anteriormente, hasta obtener un pellet celular que fue resuspendido en medio de congelación a razón de  $0,5 \times 10^6$  células por ml, siendo introducidas inmediatamente en criotubos y éstos en el congelador a  $-80^\circ\text{C}$  durante 24 h, para posteriormente ser almacenadas definitivamente en nitrógeno líquido.

30 El medio de congelación empleado estaba constituido por suero fetal bovino (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) inactivado en calor húmedo a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 min, y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

### 4. Método de descongelación celular

35 Para la descongelación de la línea celular, los criotubos fueron sacados del contenedor de nitrógeno líquido e introducidos en una cubeta de agua a  $37^\circ\text{C}$ . Una vez descongelado el criotubo se enjuagó con alcohol de 70% y se abrió en condiciones de esterilidad. Se resuspendió el contenido de los criotubos en medio de cultivo estéril a  $37^\circ\text{C}$ , se lavaron dos veces con medio nuevo para eliminar los restos de DMSO y se procedió a realizar un conteo con cámara de Neubauer, para poder obtener una suspensión celular con una concentración de  $2 \times 10^4$  células/ml, que finalmente fue sembrada en nuevos frascos de cultivo.

40

### 5. Preparación de los compuestos a ensayar

45 Los compuestos que se han utilizado como ejemplos de cada una de las familias con fórmula general tipo 1 y 2 respectivamente fueron:

- Fórmula General 1 (TABLA 1)

50

Código	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
1	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	COOMe	COOMe
1b	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	OH	COOMe
3	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	COOMe	H
4	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	CN	H

60

65

- Fórmula General 2 (TABLA 2)

Código	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
6	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	H	H
7	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	H	OMe
8	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	OMe	H
11	CH <sub>3</sub>	COOMe	CH <sub>2</sub>	OH	H

Los compuestos, protegidos mediante patente ES200800837, partieron de una forma sólida que fue resuspendida en DMSO puro hasta obtener una concentración de entre 1,8 a 3 mg/mL en función del peso molecular de cada uno de los compuestos. Las soluciones stock fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

#### 6. Tratamiento de las líneas celulares con los compuestos

El tratamiento de las líneas celulares se desarrolló siguiendo el siguiente protocolo: células de las diferentes líneas fueron despegadas de la superficie de cultivo con una mezcla de tripsina-EDTA (0,25% Tripsina, 0,02% EDTA en PBS, Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), lavadas, resuspendidas en medio de cultivo y contadas mediante cámara de Neubauer, tal y como se describió anteriormente. A continuación se sembraron en placas estériles de 24 pocillos a razón de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen final de 1 mL del medio de cultivo correspondiente. Transcurridas 24 h de incubación en estufa de CO<sub>2</sub>, se procedió a cambiar el medio de cultivo y a añadir concentraciones crecientes de los compuestos a ensayar, que oscilaron en un rango de entre 0.1 a 60  $\mu$ M. El grupo control no recibió ninguna dosis de compuesto. A continuación, se dejaron las placas incubar 72 h y se volvió a cambiar el medio y a adicionar compuesto nuevo. Después de pasar otras 72 h se dio por finalizado el tiempo de inducción con los compuestos.

#### 7. Método para la determinación del valor de las concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos

Al cabo de los 6 días de inducción de las células con los compuestos a concentraciones crecientes, se procedió a cuantificar el número de células presente en cada uno de los pocillos. Para ello se utilizó una técnica de cuantificación colorimétrica con Sulforrodamina-B (SRB) [Papazisis K. T., Geromichalos G. D., Dimitriadis K. A., Kortsaris A. H. *Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. J Immunol Methods* (1997); 208(2): 151-8] tal y como se describe a continuación:

1. Se aspiró el medio de cultivo de las placas.
2. Se fijaron las células mediante la adición de 300  $\mu$ L de ácido tricloroacético (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA) al 10% frío (4°C) en cada uno de los pocillos, y se dejó en la nevera a 4°C durante 30 minutos.
3. Después se realizaron 3 lavados con agua destilada y se dejaron secar las placas.
4. Posteriormente, se procedió a teñir las células con 500  $\mu$ L/pocillo de SRB al 0.4% en ácido acético al 1% durante 20 min a temperatura ambiente.
5. Se eliminó la SRB, se lavaron tres veces las placas con ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente en oscuridad.
6. Se solubilizó la SRB fijada a las células con 500  $\mu$ L/pocillo de una solución 10 mM Tris-base (pH 10.5) con agitación suave.
7. Alícuotas de 100  $\mu$ L se transfirieron a placas de 96 pocillos por triplicado y se leyeron las densidades ópticas en un colorímetro Titertek multiscan con un filtro para una longitud de onda de 492 nm.

Los valores de densidades ópticas obtenidas en un lector de placas Multiskan-Ex (Thermo Scientific), fueron transformados en el correspondiente valor de número de células, mediante el empleo de una recta de regresión ajustada anteriormente, considerando valores conocidos de número de células y sus densidades ópticas resultantes.

## 8. Acción de los compuestos sobre el crecimiento de las líneas tumorales

En la tabla 4 aparecen los valores de  $CI_{50}$  de los compuestos que ejemplifican la invención:

TABLA 4

Código	Línea celular		
	MCF-7	A-549	T-84
	Media $CI_{50}$ en $\mu M \pm$ Desv. Estándar		
<b>Fórmula I</b>			
<b>1</b>	33,01 $\pm$ 2,79	19,89 $\pm$ 0,22	25,04 $\pm$ 0,24
<b>1b</b>	45,06 $\pm$ 6,5	26,96 $\pm$ 0,14	40,02 $\pm$ 0,23
<b>3</b>	40,41 $\pm$ 9,75	28,14 $\pm$ 0,45	29,02 $\pm$ 0,48
<b>4</b>	39,63 $\pm$ 6,00	20,17 $\pm$ 0,21	23,66 $\pm$ 4,40
<b>Fórmula II</b>			
<b>6</b>	0,35 $\pm$ 0,10	1,38 $\pm$ 0,83	0,559 $\pm$ 0,13
<b>7</b>	16,02 $\pm$ 0,40	17,51 $\pm$ 0,75	16,74 $\pm$ 0,62
<b>8</b>	28,63 $\pm$ 0,80	10,53 $\pm$ 1,80	14,70 $\pm$ 3,06
<b>11</b>	38,37 $\pm$ 5,30	41,17 $\pm$ 2,70	30,01 $\pm$ 3,92

En la línea celular MCF7, los compuestos de estructura tipo I dieron lugar a unos valores de  $CI_{50}$  por encima de 30  $\mu M$ , mientras que en términos generales, en las otras dos líneas los valores fueron inferiores a lo observado en MCF-7, destacando el valor del compuesto 1 y 4 sobre la línea A-549.

Entre los compuestos de estructura tipo II, el número 6 dio como resultado el mejor valor de actividad de todos los compuestos evaluados en las tres líneas. El resultado obtenido con MCF-7 ha sido el más activo, con un valor de 0,35  $\pm$  0,10  $\mu M$ , del orden de 5 veces más potente que el resultado alcanzado con un control positivo, establecido mediante el tratamiento de células de la misma línea celular con el fármaco antitumoral 5-Fluorouracilo.

La estructura merosesquiterpénica del compuesto 6, relacionada con los metabolitos tipo puupehenona otorga a este tipo de estructuras una importante actividad biológica. Además, de los cuatro representantes de su grupo, el compuesto 6 tiene una constitución más simple, carente de sustituyentes OMe y OH en posiciones  $R^4$  y  $R^5$ , que a tenor de los resultados representados en la tabla 4, reducen sensiblemente la actividad, especialmente los que ocupan las posiciones  $R^4$ . Aunque en estos ensayos el compuesto 6 muestra mayor especificidad frente a la estirpe tumoral de mama, en las otras dos líneas celulares, A-549 y T-84, la actividad del compuesto también fue muy importante, mejorando en ambos casos el valor del control positivo.

En resumen, y tras los ensayos realizados, la presente invención tiene como objetivo el uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, para el tratamiento del cáncer, donde dichos compuestos son seleccionados de la familia determinada por las fórmulas generales 1 y 2, especialmente el de aquellos compuestos que se obtienen cuando  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = COOMe$  y  $R^3 = CH_2$ .

En los experimentos realizados, destaca la efectividad frente a células tumorales de los compuestos de fórmula general 1 en los que  $R^4 = COOMe$  ó OH y  $R^5 = COOMe$  y en los que  $R^4 = COOMe$  ó CN y  $R^5 = H$  y los compuestos de fórmula general 2 en los que  $R^4 = H$  y  $R^5 = H$  ó OMe y en los que  $R^4 = OMe$  ó OH y  $R^5 = H$ .

Dentro de las numerosas aplicaciones para el tratamiento del cáncer, destacan las aplicaciones frente al cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal.

Otro de los objetivos de esta invención sería la fabricación de un medicamento o fórmula farmacéutica que comprendiese cualquiera de los compuestos mencionados para el tratamiento de cáncer, en especial para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal.

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, donde dichos compuestos son seleccionados de la familia determinada por las fórmulas generales 1 y 2, donde

a) La fórmula general de la familia de compuestos del tipo 1 es:

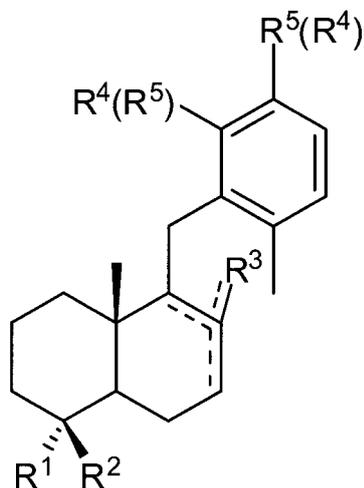
10

15

20

25

30



1

Donde:

35

Las líneas punteadas indican las tres posiciones posibles, y excluyentes entre sí, de un doble enlace.

40  $R^1$  y  $R^2$  representan, independientemente, un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo.

45  $R^3$  representa un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR (donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo), cuando el doble enlace es endocíclico, y  $R^3$  representa un grupo metileno o un oxígeno cuando el doble enlace es exocíclico.

50  $R^4$  y  $R^5$ , representan independientemente un grupo seleccionado de entre -H, -R, -CHO, -COR, -CN, -COOH, -COOR, -CF<sub>3</sub>, -COOCO-, -SO<sub>2</sub>R, -NO<sub>2</sub>, -COCl, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH=CH<sub>2</sub>, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR y halógeno; donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o arilo.

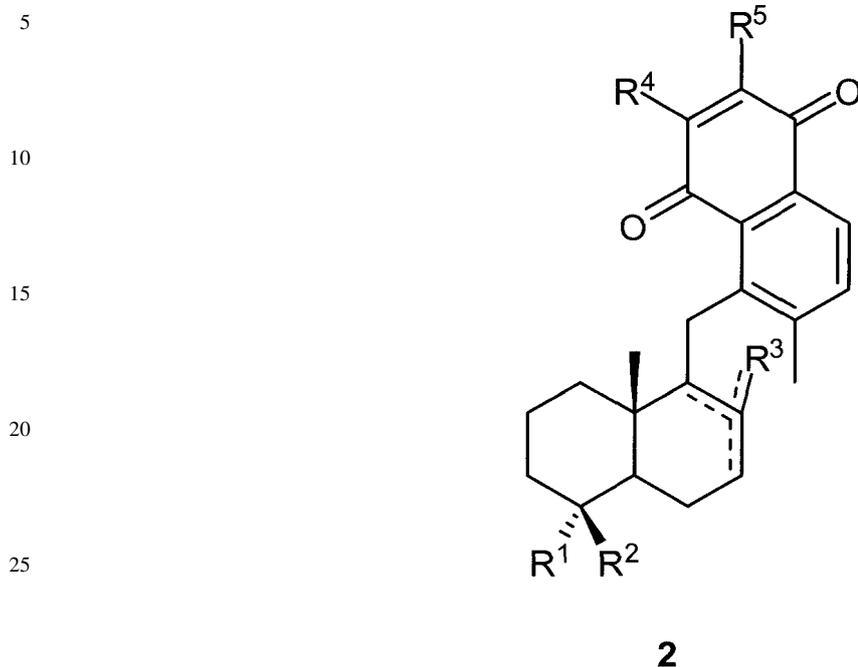
50

55

60

65

b) La fórmula general de la familia de compuestos del tipo 2 es:



30

Donde:

Las líneas punteadas indican las tres posiciones posibles, y excluyentes entre sí, de un doble enlace.

35

$R^1$  y  $R^2$  representan, independientemente, un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR, -OCHO, -OCOCH<sub>3</sub>, -OH, -OR, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo.

40

$R^3$  representa un grupo seleccionado de entre -R, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OR, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -COR, -COOH, -COOR (donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, o arilo), cuando el doble enlace es endocíclico, y  $R^3$  representa un grupo metileno o un oxígeno cuando el doble enlace es exocíclico.

45

$R^4$ ,  $R^5$  representan independientemente un grupo seleccionado de entre -H, -OH, -R, -OR y halógeno, donde -R representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o arilo.

50

2. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{COOMe}$  y  $R^3 = \text{CH}_2$ .

55

3. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, seleccionados de la familia determinada por la fórmula 1, según reivindicación 2, **caracterizado** porque  $R^4 = \text{COOMe}$  ó OH y  $R^5 = \text{COOMe}$ .

60

4. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, seleccionados de la familia determinada por la fórmula 1, según reivindicación 2, **caracterizado** porque  $R^4 = \text{COOMe}$  ó CN y  $R^5 = \text{H}$ .

65

5. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales y sales farmacológicamente aceptables de los mismos, seleccionados de la familia determinada por la fórmula 2, según reivindicación 2, **caracterizado** porque  $R^4 = \text{H}$  y  $R^5 = \text{H}$  ó OMe.

6. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales, sales farmacológicamente aceptables de los mismos, seleccionados de la familia determinada por la fórmula 2, según reivindicación 2, **caracterizado** porque  $R^4 = \text{OMe}$  ó OH y  $R^5 = \text{H}$ .

7. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales, sales farmacológicamente aceptables de los mismos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento

y/o profilaxis frente a cánceres sólidos, especialmente los cánceres de mama, neuroblastomas, pulmón, colorrectal, hepático y páncreas, y frente a síndromes mieloproliferativos agudos y crónicos tanto en humanos como en animales.

5 8. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales, sales farmacológicamente aceptables de los mismos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis frente cáncer de mama

10 9. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales, sales farmacológicamente aceptables de los mismos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis frente cáncer de pulmón.

15 10. Uso de merosesquiterpenos, sus derivados, formas homoquirales, sales farmacológicamente aceptables de los mismos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis frente cáncer colorrectal.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201050019

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2009

③② Fecha de prioridad: **30-12-2008**

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K36/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	A F BARRERO et al., Tetrahedron 1999, vol 55, págs. 15118-15208. "Synthesis and antitumor activity of Puupehedione and related compounds", pág 1582 primer párrafo, pág 15191.	1-10
A	E PÉREZ-GARCÍA et al., Journal of Natural Products 2005, vol 68 (5), págs 653-658. "Merosesquiterpenes from two sponges of the genus Dysidea", resumen.	1-10

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  
23-04-2010

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/4

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

A61K

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,CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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 se publica.

**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	A F BARRERO et al., Tetrahedron 1999, vol 55, págs. 15118-15208. "Synthesis and antitumor activity of Puupehedione and related compounds", pág 1582 primer párrafo, pág 15191.	1999
D02	E PÉREZ-GARCÍA et al., Journal of Natural Products 2005, vol 68 (5), págs 653-658. "Merosesquiterpenes from two sponges of the genus Dysidea", resumen.	2005

**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**

La solicitud se refiere al uso de merosesquiterpenos sintéticos del tipo puupehenona de fórmulas 1 y 2 (reivindicación 1) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

El documento D1 se considera el más próximo del estado de la técnica; divulga la síntesis de puupehediona y compuestos relacionados (ver página 1582 y en concreto los compuestos 7 y 8) y se estudia la actividad antitumoral de varios de ellos (ver página 15191 de D1). El documento D2 divulga las estructuras (compuestos 2-5) de algunos merosesquiterpenos y menciona la actividad antitumoral de dos de ellos.

Aunque los compuestos descritos en la solicitud son también de tipo merosesquiterpeno, sus fórmulas difieren estructuralmente de los compuestos divulgados en D1 y D2, además no se puede considerar que un técnico en la materia pueda llegar a concluir la actividad de los compuestos de la solicitud ya que ésta requiere un esfuerzo inventivo mediante un estudio experimental y no es previsible a priori.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-10 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva, de acuerdo con los requerimientos establecidos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.