



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 722**

51 Int. Cl.:
C07D 473/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02293256 .0**
96 Fecha de presentación : **29.11.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1308447**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **Derivado de purina para usar en el tratamiento de un trastorno proliferativo.**

30 Prioridad: **01.12.1995 FR 95 14237**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.09.2011

73 Titular/es: **Centre National de la Recherche
Scientifique (C.N.R.S.)
3, rue Michel-Ange
75796 Paris Cédex 15, FR
Institut Botanique Expérimentale**

72 Inventor/es: **Meijer, Laurent;
Bisagni, Emile;
Legraverend, Michel y
Strnad, Miroslav**

74 Agente: **Ruo Null, Alessandro**

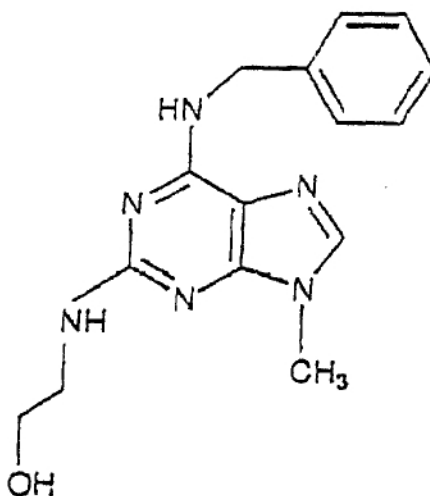
ES 2 364 722 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

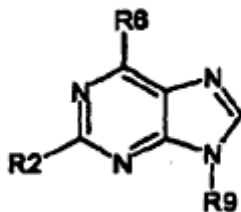
DESCRIPCIÓN

Derivado de purina para usar en el tratamiento de un trastorno proliferativo

- 5 **[0001]** La invención tiene por objeto un compuesto para usar para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- [0002]** El estudio de los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular ha permitido demostrar la función reguladora de las cdk. Estas proteínas están constituidas por al menos dos subunidades, una subunidad catalítica (cuyo cdc2 es el prototipo) y una subunidad reguladora (ciclina). Se han descrito ocho cdk, cdk1 (=cdc2), cdk2-cdk8.
- 10 **[0003]** A excepción de cdk3, para la que no se conoce ninguna ciclina asociada, éstas cdk están reguladas por asociación transitoria con un miembro de la familia de las ciclinas: ciclina A (cdc2, cdk2), ciclina B1-B3 (cdc2), ciclina C (cdk8), ciclina D1-D3 (cdk2-cdk4-cdk5-cdk6), ciclina E (cdk2), ciclina H (cdk7).
- 15 **[0004]** Cada uno de estos complejos está implicado en una fase del ciclo celular. La actividad de las cdk está regulada por modificación post-traducciona, por asociaciones transitorias con otras proteínas y por modificación de su localización intracelular. Los reguladores de las cdk comprenden activadores (ciclinas, cdk7/ciclina H, fosfatasas cdc25), las subunidades p9^{CKS} y p15^{cdk-BP} y las proteínas inhibidoras (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p21^{Cip1}, p18, p27^{Kip1}).
- 20 **[0005]** Paralelamente a las investigaciones puramente fundamentales sobre los mecanismos reguladores de la división celular, la importancia de las desregulaciones de las quinasas ciclinas dependientes en el desarrollo de tumores humanos ha quedado demostrada por numerosos estudios. Así, se ha observado la sobreexpresión de ciclinas D y E en numerosos tumores, la sobreexpresión de cdc2, las propiedades oncogénicas de las ciclinas D y A, la expresión temporal anormal de quinasas ciclinas dependientes, la mayor desregulación de los inhibidores proteicos (mutaciones, deleciones).
- 25 **[0006]** Los reguladores del ciclo de división celular son objeto de muchísimos estudios clínicos (utilización como marcadores indicativos para el tratamiento).
- 30 **[0007]** Estos resultados estimulan en gran medida los esfuerzos para obtener una comprensión detallada de los mecanismos reguladores del ciclo celular. Asimismo, conducen a la investigación, por selección, de las moléculas inhibidoras de quinasas ciclinas dependientes.
- 35 **[0008]** Se han descrito muchos inhibidores de quinasas, como la butirolactona, el flavopiridol y la 2(2-hidroxietilamino)-6-benzilamino-9-metilpurina, denominada olomucina. Los trabajos relativos a la olomucina los han descrito Veseley y col. en el artículo indicado con la referencia (1) en el listado de referencias bibliográficas que figura al final de la descripción.
- 40 **[0009]** Este inhibidor de cdc2, de gran eficacia (su Cl_{50} es de 7 μ M) es muy selectivo (se han ensayado más de 35 quinasas), responde a la siguiente fórmula:



- 45 **[0010]** Los trabajos de los autores de la invención en este campo les han llevado a elaborar una nueva molécula particularmente interesante, que inhibe cdc2 en pequeñas dosis, conservando al mismo tiempo la especificidad enzimática de la olomucina para usar para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- [0011]** La invención se refiere a un compuesto de fórmula I



en la que

R2 representa un grupo 1-D, L- hidroximetilpropilamino;

R6 representa un grupo benzilamino; y

R9 representa un grupo isopropilo;

y los isómeros ópticos o la mezcla racémica de los mismos; para usar para el tratamiento de un trastorno proliferativo.

[0012] Más particularmente, el trastorno proliferativo tratado es el cáncer.

[0013] De manera general, este compuesto constituye un inhibidor de proteínas quinasas de gran interés.

[0014] El compuesto definido anteriormente se obtiene según los métodos clásicos de la síntesis orgánica. Se utiliza un derivado de purina de partida cuyas sustituciones permiten introducir los grupos deseados.

[0015] Usando, por ejemplo, un derivado de purina 2-cloro, 6-benzilamino, es posible introducir un grupo isopropilo en posición 9, por reacción, por ejemplo, con el halogenuro de isopropilo correspondiente.

[0016] La reacción con un aminoalcohol permitirá después introducir, en posición 2, el grupo hidroximetilpropilamino en lugar del grupo cloro.

[0017] Según un aspecto de gran interés, el compuesto de la invención, sus isómeros ópticos o la mezcla racémica de los mismos, para usar para el tratamiento para un trastorno proliferativo, posee propiedades inhibitoras de quinasas de gran selectividad. Estos efectos inhibitorios son reversibles.

[0018] Las cdk desempeñan una función central en el inicio, el desarrollo y la terminación de eventos del ciclo celular, las moléculas inhibitoras de cdk son susceptibles de limitar una proliferación celular no deseada como el cáncer.

[0019] Las quinasas más especialmente sensibles a los efectos inhibitorios de este compuesto son las cdc2, cdk2 y cdk5.

[0020] Su inhibición se obtiene con dosis muy pequeñas del compuesto de fórmula I.

[0021] La 2-(1-D,L-hidroximetilpropilamino)-6-benzilamino-9-isopropilpurina, en lo sucesivo denominada también roscovitina, presenta una CI_{50} de 0,65 μ m. Sin embargo, este derivado, que constituye un inhibidor de gran eficacia y de gran selectividad frente a los cdk, cdc2, cdk2 y cdk5 tiene, de manera inesperada, efectos sobre las quinasas erk 1 y erk 2 similares a los de la olomucina. La selectividad es por tanto claramente superior frente a las quinasas ciclinas dependientes. Esta ventaja, permite eliminar las interferencias con las vías de transducción de señales aguas arriba que implican las quinasas erk 1 y erk 2 en numerosas respuestas celulares distintas de la división celular.

[0022] Los estudios realizados sobre el compuesto de fórmula I, sus isómeros ópticos o la mezcla racémica de los mismos, han demostrado que tiene, además de sus propiedades inhibitoras específicas de quinasas, efectos celulares y sobre la apoptosis de gran interés.

[0023] Así, a una concentración muy baja (micromolar), puede inhibir la transición profase/metafase, como se demuestra por experimentos realizados en ovocitos de estrellas de mar y en embriones de erizos, y que se indican en los ejemplos.

[0024] Sobre extractos acelulares de sapo africano, puede inhibir al mismo tiempo, el factor promotor de la fase M y la síntesis de ADN.

[0025] De manera ventajosa, estos efectos celulares se obtienen a concentraciones muy bajas de derivados.

- 5 [0026] Se sabe que se han realizado varios estudios sobre las relaciones existentes entre el ciclo celular y la apoptosis. Varias vías conducen células a la apoptosis, algunas de las cuales son dependientes de quinasas y otras, por el contrario, no parecen necesitar estas enzimas. Se ha demostrado que la apoptosis puede inducirse en la etapa G1 ó G2 y como consecuencia de daños en el ADN, ciertas células se detienen en la etapa G1 y entonces se induce una vía apoptótica dependiente de p53.
- 10 [0027] En otras situaciones, parece que las células se detienen en la fase G2/M, en respuesta a los daños causados al ADN y se observa la activación de una vía apoptótica independiente de p53.
- 15 [0028] Esta vía resulta ser particularmente importante para la terapia de tumores en los que se observa una pérdida activa de p53.
- [0029] Por tanto, se mide el interés de disponer, con el compuesto de fórmula I, sus isómeros ópticos o la mezcla racémica de los mismos, medios para estimular una apoptosis independiente de p53 en las células detenidas en la fase G2 por daño en el ADN usando agentes tales como mitoxantrona o cisplatino.
- 20 [0030] A estas diferentes propiedades ventajosas, se añade el interés de una ausencia de citotoxicidad del compuesto de fórmula I, de sus isómeros ópticos o de la mezcla racémica de los mismos.
- [0031] La invención por tanto se refiere al aprovechamiento de las propiedades antimetabólicas del compuesto de fórmula I, de sus isómeros o de la mezcla racémica de los mismos, en particular sus propiedades para la elaboración de composiciones farmacéuticas.
- 25 [0032] Estas composiciones farmacéuticas contienen una cantidad eficaz de al menos un compuesto de purina, tal como se define anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéutico inerte.
- 30 [0033] Estas composiciones son particularmente apropiadas como medicamentos antimetabólicos, en particular para la quimioterapia de cánceres.
- [0034] Estas composiciones contienen en este caso principios activos de otros medicamentos. Se citará principalmente su asociación con medicamentos antimetabólicos, tales como los basados en taxol, cis-platino, agentes intercalantes de ADN y otros.
- 35 [0035] Los envasados con vistas a la venta, en particular el etiquetado y las instrucciones de uso, y ventajosamente el embalaje, se elaboran en función de la aplicación terapéutica prevista.
- 40 [0036] Estas composiciones farmacéuticas se administran en diferentes formas, más especialmente por vía oral o inyectable.
- [0037] Para la administración por vía oral, se recurre en particular a comprimidos, cápsulas, pastillas, cápsulas de gelatina y gotas. Estas composiciones contienen ventajosamente de 1 a 100 mg de principio activo por unidad de toma, preferentemente de 10 a 40 mg.
- 45 [0038] Otras formas de administración comprenden soluciones inyectables por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, elaboradas a partir de soluciones estériles o esterilizables. Igualmente, puede tratarse de suspensiones o de emulsiones.
- 50 [0039] Estas formas inyectables contienen, por unidad de toma, de 1 a 50 mg de principio activo, preferentemente de 10 a 30 mg.
- [0040] A título indicativo, la posología utilizable en seres humanos corresponde a las siguientes dosis: así por ejemplo, se administra al paciente en una o varias tomas de 10 a 50 mg/día para el tratamiento de tumores.
- 55 [0041] En los siguientes ejemplos se indican otras características y ventajas de la invención y se muestran en las figuras 1 a 8, en las que:
- 60 - la figura 1, representa los resultados de cinéticas en condiciones lineales a partir de ensayos relativos a la actividad de la p34^{cdc2}/ciclina B a diferentes concentraciones de roscovitina,
- la figura 2, el porcentaje de rotura de la vesícula germinal de ovocitos de estrella de mar en función de la concentración de roscovitina,
- las figuras 3 y 4 representan respectivamente los efectos de la roscovitina sobre la maduración de ovocitos de estrellas de mar la defosforilación de la tirosina de p34^{cdc2} *in vivo*,
- 65 - la figura 4, los efectos de la roscovitina sobre el ciclo mitótico de embriones de erizos,
- la figura 5, estos embriones detenidos en la etapa de profase tardía, y
- la figura 6, los efectos de la roscovitina sobre la síntesis de ADN *in vitro* y la actividad MPF,

- la figura 7, representa los efectos de la roscovitina sobre la inhibición del crecimiento de células L1210 y la detención de su ciclo celular en G2/M, en la figura 7A se representa el crecimiento de células L1210 después de dos días de exposición a diversas concentraciones de roscovitina (media \pm desviación típica relativa al crecimiento de célula de control no tratada), en la figura 7B se representan las medias (\pm desviación típica) de la distribución del ciclo de células ya cultivadas durante 48 horas en presencia o en ausencia de roscovitina 60 μ M,
- la figura 8, representa el efecto de inhibición de la roscovitina sobre la fosforilación *in vivo* de vimentina a nivel de sitios específicos en cdc2.

10 MATERIAL Y MÉTODOS

Productos químicos

15 [0042] El ortovanadato de sodio, 1-metiladenina (1MeAde), EGTA, EDTA, MOPS, β -glicerofosfato, ditioneitol (DTT), fluoruro de sodio, nitrofenil-fosfato, leupeptina, aprotinina, inhibidor de tripsina de soja, benzamidina, histona H1 (tipo III-S), proteína básica de mielina, caseína, protamina sulfato, isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), Sefarosa 4B activada por CNBr, medio LB, glutatión y bolitas de glutatión-Sefarosa: todos estos productos son como los comercializados por Sigma Chemicals.

20 [0043] Los análogos de purina se disuelven generalmente de manera que se disponen en soluciones de almacenamiento de 100 mM en DMSO. La concentración final de DMSO en la mezcla de reacción es inferior al 1% (v/v).

25 [0044] El [γ -³²P]-ATP es un producto de Amersham.

[0045] La proteína GST-Retinoblastoma se expresa en bacterias y se purifica en bolitas de glutatión-Sefarosa como se ha descrito anteriormente en (1) y(2).

Tampones

Tampón de homogeneización:

35 [0046] 60 mM de β -glicerofosfato, 15 mM de p-nitrofenil-fosfato, 25 mM de MOPS (pH 7,2), 15 mM de EGTA, 15 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 mM de vanadato de sodio, 1 mM de NaF, 1 mM de fenilfosfato, 10 μ g de leupeptina/ml, 10 μ g de aprotinina/ml, 10 μ g de inhibidor de tripsina de soja ml y 100 μ M de benzamidina.

[0047] Tampón C: composición del tampón de homogeneización, pero con 5 mM de EGTA, sin NaF y sin inhibidores de proteasa.

40 Preparación de extractos de ovocitos de estrella de mar en fase M

45 [0048] Para obtener preparaciones de extractos de ovocitos a gran escala, se extirpan las gónadas de *Marthasterias glacialis* maduras y se incuban con 10 μ M de 1-MeAde en agua de mar natural filtrada sobre Millipore hasta la oviposición. Todos los ovocitos se encuentran entonces en fase M. Se separan del medio de incubación por centrifugación, se congelan directamente en nitrógeno líquido y se mantienen a -80°C (ver (1) y (3)).

[0049] Los ovocitos en fase M se homogeneizan en el tampón de homogeneización a razón de 2 ml/g de ovocitos.

50 [0050] Tras la centrifugación durante 45 minutos a 100.000 g, el sobrenadante se recupera y se utiliza directamente para la purificación por cromatografía de afinidad de la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B sobre bolitas de p9^{CKShs1}-Sefarosa (ver (1) y (4)).

Enzimas

55 [0051] Las actividades de las quinasas se determinan a 30 °C en el tampón C, a menos que se indique lo contrario. Los valores de los blancos se restan de los datos y las actividades se calculan en pmoles de fosfato incorporado en el aceptor de proteína para una incubación de 10 minutos.

60 [0052] Los controles se utilizan con disoluciones apropiadas de DMSO.

[0053] La fosforilación del sustrato se determina, en este caso, por autorradiografía tras SDS-PAGE.

65 . Se purifica la p34^{cdc2}/ciclina B a partir de ovocitos de la fase M de estrellas de mar por cromatografía de afinidad sobre las bolitas de p9^{CKShs1}-Sefarosa en las que se eluyen con p9^{CKShs1}, como se ha descrito anteriormente (ver (2), (3) y (5)).

- [0054]** Para la determinación, se utiliza 1 mg de histona H1 (Sigma tipo III-S)/ml, en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP (3,000 Ci/mmol, 1 mCi/ml) en un volumen final de 30 μl (ver (1) y (6))
- 5 **[0055]** Después de un tiempo de incubación de 10 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$, se depositan alícuotas de 25 μl de sobrenadante en papel de fosfo celulosa Whatman P81 y, después de 20 segundos, se lavan los filtros 5 veces (durante al menos 5 minutos cada vez) en una solución de 10 ml de ácido fosfórico por litro de agua.
- 10 **[0056]** Los filtros húmedos se transfieren a ampollas de centelleo de plástico de 6 ml, después se añaden 5 ml de fluido de centelleo ACS (Amersham) y se mide la radioactividad en un contador Packard.
- [0057]** La actividad quinasa se expresa en pmoles de fosfato incorporado en la histona H1 durante 10 minutos de incubación o en porcentaje de actividad máxima.
- 15 **[0058]** Para realizar los experimentos de cinética en condiciones lineales, se usa, como se ha descrito anteriormente, el sistema de ensayos de punto final para la quinasa p34^{cdc2} pero, sobre la base de ensayos preliminares, se usan concentraciones apropiadas, no saturantes, de sustrato.
- 20 **[0059]** La quinasa p34^{cdc2}/ciclina B se añade para obtener una actividad lineal con relación a la concentración de enzima y al tiempo.
- [0060]** En la mayoría de los casos, esto necesita una dilución enzimática de 3 a 10 veces en el tampón C.
- 25 **[0061]** Los datos de velocidad se expresan en pmoles incorporados en el sustrato por segundo, por cantidad de enzima añadida. Las constantes de inhibición aparentes se determinan por análisis gráfico.
- . Las p33^{cdk2}/ciclina A y p33^{cdk2}/ciclina E se reconstituyen a partir de extractos de células de insecto sf9 infectadas por diferentes baculovirus.
- 30 **[0062]** Las ciclinas A y E son proteínas de fusión de GST-ciclinas y los complejos se purifican sobre bolitas de glutatión-Sefarosa.
- [0063]** Las actividades quinasa se determinan con 1 mg/ml de histona H1 (Sigma, tipo IIIS), en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP, durante 10 minutos, en un volumen final de 30 μl , como se describe para la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B.
- 35 . La p33^{cdk5}/p25 se purifica a partir de cerebro bovino (7), pero no se utiliza la etapa de cromatografía Mono S.
- [0064]** Las fracciones activas recuperadas a partir de la columna de Superosa 12 se reúnen y se concentran hasta obtener una concentración final de aproximadamente 25 μg de enzima/ml.
- 40 **[0065]** La determinación de la quinasa se efectúa con 1 mg/ml de histona H1 (Sigma, tipo IIIS), en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP, durante 10 minutos en un volumen final de 30 μl , como se describe para la p34^{cdc2}/ciclina B.
- 45 . La p33^{cdk4}/ciclina D1, se obtiene a partir de lisados de células de insecto. Cdk4 es un producto de construcción GST-cdk4 y el complejo activo se purifica sobre bolitas de glutatión-Sefarosa.
- [0066]** Su actividad quinasa se determina con una proteína purificada GST-retinoblastoma en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP, en un volumen final de 30 μl .
- 50 **[0067]** Después de 15 minutos de incubación se añade tampón de Laemmli (2 x 30 μl).
- [0068]** El sustrato fosforilado se resuelve mediante SDS-PAGE al 10% y se analiza por autorradiografía por exposición durante aproximadamente 14 horas en MP Hiperfilm y densitometría.
- 55 . La p33^{cdk6}/ciclina D2 se obtiene a partir de lisados de células de insecto (8). Para los ensayos, se procede como se ha indicado anteriormente para la proteína p33^{cdk4}/ciclina D1.
- . Las quinasas MAP: la GST-erk1 (9), clonada a partir de un banco humano HepG2, se expresa en bacterias, se purifica sobre bolitas de glutatión-Sefarosa y se ensaya con 1 mg de proteína básica de mielina por ml en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP, como se ha descrito para la quinasa p34^{cdc2}/ciclina B.
- 60 **[0069]** Las proteínas erk1 y erk2 marcadas con histona, se activan *in vitro* por MAPKK, se purifican (afinidad-Ni y Mono Q) y se ensayan, como se ha descrito anteriormente, durante 10 minutos, en un volumen final de 30 μl .
- 65 . La subunidad catalítica de la quinasa cAMP-dependiente, purificada a partir de corazón de bovino se ensaya con 1 mg de histona H1 por ml, en presencia de 15 μM de [γ - ^{32}P] ATP, como se ha descrito anteriormente para

la p34^{cdc2}/ciclina B.

[0070] La quinasa cGMP-dependiente (10), purificada hasta la homogeneidad a partir de músculo liso de traquea de origen bovino se ensaya con 1 mg de histona H1 por ml, en presencia de 15 µM de [γ -³²P] ATP, como se ha descrito anteriormente para la p34^{cdc2}/ciclina B.

- La caseína quinasa 2 se aísla del citosol de hígado de rata (11) y se ensaya con 1 mg de caseína por ml y 15 µM de [γ -³²P] ATP. El sustrato se deposita sobre filtros Whatman 3MM y se lava con 10 % de TCA (P/V).
- La quinasa de la cadena ligera de miosina purificada de molleja de pollo (12) se ensaya en presencia de 100 nM de calmodulina, 100 µM de CaCl₂, 50mM de HEPES, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT y 0,1 mg de BSA/ml con pH 7,5, usando un péptido de síntesis de base del sitio de fosforilación de la cadena ligera de miosina de músculo liso (KKRPQRATSNVFAM, 50 µM) y en presencia de 15 µM de [γ -³²P] ATP, en un volumen final de 50 µl.

[0071] La incorporación de fosfato radioactivo se controla en filtros de fosfocelulosa como se ha descrito anteriormente.

- La ASK- γ , homóloga en la planta de GSK-3, se expresa como proteína de fusión GST en *E.coli* (13) y se purifica sobre glutatión-Sefarosa. La actividad de la quinasa ASK- γ , se determina durante 10 minutos a 30 °C, con 5 µgm, de proteína básica de mielina, en presencia de 15 µM de [γ -³²P] ATP, en un volumen final de 30 µl. La proteína básica de mielina fosforilada se recupera en papel de fosfocelulosa Whatman P81 como se ha descrito anteriormente para la p34^{cdc2}/ciclina B.
- El dominio tirosina quinásico del receptor de la insulina (14) se sobreexpresa en un sistema de baculovirus y se purifica hasta la homogeneidad. Su actividad quinasa se determina durante 10 minutos a 30 °C con 5 µg de Raytide (Oncogène Sciences), en presencia de 15 µM de [γ -³²P] ATP, en un volumen final de 30 µl. El producto Raytide fosforilado se recupera en papel de fosfocelulosa Whatman P81 como se ha descrito anteriormente para la p34^{cdc2}/ciclina B.

Ejemplo 1: Síntesis de la roscovitina

[0072] La síntesis se efectúa en 3 etapas y comprende en primer lugar la preparación de 1) 6-benzilamino-2-cloropurina, después 2) de 6-benzilamino-2-cloro-9-isopropilpurina, y 3) de 6-benzilamino-2-R-(1-etil, 2-hidroxi-etilamino)-9-isopropilpurina.

1) Síntesis de 6-benzilamino-2-cloropurina:

[0073] Se procede como describe Hocart en Phytochemistry 1991, 30, 2477-2486.

2) Síntesis de 6-benzilamino-2-cloro-9-isopropilpurina (I)

[0074] Se somete a agitación a temperatura ambiente, durante tres días, una mezcla de 6-benzilamino-2-cloropurina (3,7 g; 14,2 mmol), de carbonato de potasio (11g; 80/mmol) y de bromuro de isopropilo (8,2 ml; 87 mmol) en 100 ml de DMSO absoluto. Por cromatografía de capa fina [CHCl₃-MeOH (98:2)], se constata la ausencia de 6-benzilamino-2-cloropurina. Se elimina por destilación al vacío por debajo de 50 °C el DMSO y el exceso de bromuro de isopropilo. El residuo se reparte entre el agua y el acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora al vacío.

[0075] Por cristalización en MeOH, se obtienen 3,51 g (82%) de producto; P.F. 181-182 °C; UV (MeOH): $\lambda_{m\acute{a}x}$ 273,5; IR (Nicolet 205, KBr, DRIFT cm⁻¹ 1713,1626,1572,1537,1497,1471,1456,1425,1398,1355,1314,1292,1255, 1228, 1202.

3) Síntesis de 6-benzilamino-2-R-(1-etil-2-hidroxi-etilamino)-9-isopropil-purina (II), derivado racémico:

[0076] Se calienta en un horno a 160-165°C, durante 3 h 30, una ampolla sellada, en la que se ha hecho el vacío, que contiene 2,7 g (8,95 mmol) de I y 17 ml (0,18 mol) de R(-)-2-amino-1-butanol (Fluka 90%, R:S>9:1). Se evapora el exceso de amina a una temperatura inferior a 50 °C, y se purifica el producto en una columna de cromatografía usando cantidades en aumento de MeOH en CHCl₃, es decir 0, después 2, y 3%.

[0077] Por cristalización en acetato de etilo, se obtienen 2,2 g de II (69%); P. F. 132-134 °C, [α]= +35,1 (c = 0,29, CHCl₃). Espectrografía de masa [Finnigam MAT 90, BE geometría 70 eV, temperatura de la fuente 250 °C, corriente de emisión 1 mA, voltaje de aceleración 5 keV, entrada directa, temperatura DIP entre 190-220°C. El HRMS se ha efectuado por el método de superposición de picos usando Ultramark 1600 F (PCR Inc.; FI.; EEUU) como patrón] 354.2167 (M+, C₁₉H₂₆N₆O calc. 354.2168, 27%), 325 (7%), 324 (29%), 232 (100%), 295 (3%), 282 (7%), 281 (3%), 217 (6%), 185 (5%) 134 (3%), 91 (34%). FTIR (Nicolet 205; KBr, DRIFT, cm⁻¹): 1622, 1610, 1547, 1540, 1452, 1389, 1370, 1261, 1068.

Ejemplo 2: Estudio de las propiedades inhibitoras de quinasas de la roscovitina y de sus efectos sobre el ciclo celular.

5 a) estudio de las propiedades inhibitoras de quinasas.

[0078] Se midieron las actividades de las enzimas indicadas en la siguiente tabla, después de añadir roscovitina u olomucina, según concentraciones en aumento. Estas actividades se han medido con sustratos apropiados (histona H1, proteína básica de mielina, caseína, etc.) con 15 μ M de ATP.

10 **[0079]** Las CI_{50} se han calculado a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas. El signo (-) significa que no se ha observado ningún efecto inhibitor. La concentración más elevada ensayada figura entre paréntesis.

TABLA 2

Enzima	CI_{50} (μ M) Roscovitina	Olomucina
cdc2/ciclina B	0,65	7
cdc2/ciclina A	0,7	7
cdc2/ciclina E	0,7	7
cdc4/ciclina D1	> 1000	> 1000
cdk5/p35	0,16	3
cdk6/ciclina D3	> 500	> 250
GST-erk1	30	30
erk1	34	50
erk2	14	40
PK cAMP-dependiente	> 1000	> 2000
PK cGMP-dependiente	-(1000)	> 2000
Quinasa de la cadena ligera de miosina	90	> 1000
Caseína quinasa 2	-(1000)	> 2000
ASK- γ (planta GSK-3)	220	130
insulina-receptor tirosina quinasa	70	400
c-src	250	-
v-abl	> 1000	-

15 . inhibición de cdc2, cdk2 y cdk5.

[0080] El examen de estos resultados muestra que la roscovitina presenta una actividad 10 veces más elevada que la olomucina frente a las cdc2 y cdk2 diana y 20 veces más elevada frente a cdk5.

20 **[0081]** Comparativamente, su efecto parece limitado, como se observa con la olomucina sobre las quinasas cdk4/ciclina D1 y cdk6/ciclina D2 (las CI_{50} son superiores a 100 μ M). Esta ausencia de efecto se ha confirmado con cdk4 procedente de diferentes fuentes. Procediendo en condiciones idénticas, la GST p16^{INR4A} inhibe la cdk4/ciclina D1.

25 . especificidad del efecto inhibitor

[0082] Como se puede constatar, la mayor parte de las quinasas se inhiben de forma débil o nula.

30 **[0082]** Aunque la roscovitina presenta una eficacia al menos 10 veces superior a la de la olomucina frente a sus dianas cdk, su efecto inhibitor es muy similar al de la olomucina frente a erk1 y erk2. También resulta necesaria una concentración 40 veces más elevada de roscovitina para inhibir erk1 (20 veces para erk 2) de manera similar a la inhibición de cdc2.

- b) Efecto sobre el ATP

35 **[0084]** Para estudiar el mecanismo de acción de la roscovitina, se realizaron experimentos de cinética en presencia de concentraciones en aumento de roscovitina, con variación de los niveles del ATP (de 0,1 a 0,5 mM), la concentración de histona H1 se mantuvo constante a 0,7 mg/ml.

- [0085] Los resultados se indican en la figura 1.
- 5 [0086] Estos resultados muestran que la roscovitina actúa como inhibidor competitivo para el ATP. Teniendo en cuenta la linealidad de las pendientes en función de las concentraciones de roscovitina, se la califica como inhibidor lineal. La constante de inhibición aparente K_i es de 1,2 μM .
- 10 [0087] El análisis de la estructura del co-cristal de roscovitina y de cdk2 confirma que la roscovitina se une, como la olomucina, en la zona de enlace con el ATP y que su ciclo de purina está orientado como el de la olomucina, es decir, de manera totalmente diferente del ciclo purina del ATP.
- . c) Estudio del efecto sobre la síntesis de ADN y la actividad MPF.
- 15 [0088] Se indican los resultados de experimentos realizados en numerosos tipos celulares.
- . efecto sobre la maduración de ovocitos de estrella de mar y sobre la defosforilación de la tirosina de $p34^{\text{cdc2}}$ in vivo.
- 20 [0089] Se tratan ovocitos de estrellas de mar, detenidos en la profase, durante 15 minutos, con concentraciones en aumento de roscovitina antes de añadir la hormona 1-MeAde (1 μM). Transcurridos 30 minutos, se anota el % de rotura de la vesícula germinal (GVBD). Estos valores se indican en la figura 2 en función de la concentración de roscovitina (en μM). La roscovitina inhibe la rotura de la envoltura nuclear con una CI_{50} de 5 μM (la CI_{50} de la olomucina, procediendo en las mismas condiciones, es de 30 μM). Estos resultados se muestran en la figura 2.
- 25 [0090] Como ya se ha observado con la olomucina, la roscovitina disminuye, pero no inhibe, la defosforilación de la tirosina de $p34^{\text{cdc2}}$ in vivo. Se tratan ovocitos con 10 μM de roscovitina durante 15 minutos antes de añadir 1 μM de 1-MeAde al tiempo 0. Los extractos se preparan en diferentes tiempos y se cargan sobre una columna de bolitas de $p9^{\text{ckshs1}}$ -Sefarosa
- 30 [0091] Las proteínas que se han unido a las bolitas se resuelven por SDS-PAGE antes de efectuar una transferencia de Western con anticuerpos anti-PSTAIRE. La figura 3 presenta una fotografía de la transferencia de Western. Las formas fosforiladas de $p34^{\text{cdc2}}$ aparecen en la parte superior y las formas defosforiladas en la parte inferior.
- 35 [0092] Así pues, la roscovitina no inhibe la activación de cdc2, sino su actividad. La defosforilación de la tirosina de $p34^{\text{cdc2}}$ se cataliza mediante cdc25 y precede normalmente a la activación de la quinasa cdc2 en la transición G2/M. Además, la quinasa cdc2 fosforila y sobreactiva la fosfatasa de cdc25. La roscovitina ha podido provocar por tanto una interrupción a nivel cdc2 quinasa, lo que implica una disminución de la defosforilación.
- 40 . efectos sobre el ciclo mitótico de embriones de erizo.
- [0093] Se añade roscovitina 60 minutos después de la fertilización. 120 minutos después de la fertilización se toma el porcentaje de embriones divididos. Los resultados se muestran en la figura 4.
- 45 [0094] Se constata que ésta provoca una parada en el estado profase tardía, que es dependiente de dosis.
- [0095] La CI_{50} es de 10 μM . (Incluso a 100 μM , la olomucina sólo provoca una ralentización de la transición profase/metafase, pero no detiene a las células en profase).
- 50 [0096] Se observa un gran núcleo en los huevos así detenidos por la roscovitina como se muestra en la figura 5.
- [0097] Esta detención resulta totalmente reversible. En efecto, tras varios lavados con agua de mar, los huevos entran de nuevo en los ciclos mitóticos y se desarrollan en larvas plúteo normales. Estos resultados se obtienen incluso a concentraciones elevadas de roscovitina de 100 μM .
- 55 . efectos sobre la síntesis del ADN in vitro y la actividad MPF en extractos de huevos de sapo africano.
- [0098] Los ensayos se realizan según (15), procediendo como se describe en (1) para la olomucina.
- 60 [0099] Se incuban extractos de sapo africano detenidos en la fase metafase con roscovitina y con cromatina de esperma.
- [0100] Con concentraciones de roscovitina que varían de 0 a 5 μM , los cromosomas se mantienen muy condensados y no hay ninguna envoltura nuclear visible. A una concentración de 10 μM , y por encima, aparecen núcleos de interfase con la cromatina parcialmente descondensada y una envoltura nuclear intacta, lo que demuestra que la actividad MPF se ha inhibido (la CI_{50} es de 5 μM).
- 65

[0101] También se ha estudiado la síntesis del ADN procediendo como se describe en (1) para la olomucina.

5 [0102] También se añadió roscovitina y cromatina de esperma, a un extracto de huevos detenidos en la fase metafase.

[0103] El extracto se dejó a continuación en la fase interfase por adición de CaCl_2 (15) y (16). La síntesis del ADN total se midió 3 h más tarde mediante incorporación de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ en material precipitable mediante el TCA.

10 [0104] Como muestra la figura 6, la roscovitina inhibe la replicación con una CI_{50} de 15 μM .

[0105] La invención proporciona de esta manera nuevas purinas dotadas de propiedades inhibitorias de cdc2/ciclina B de especificidad elevada.

15 **Ejemplo 3: Propiedades bioquímicas y efectos de la roscovitina en células de mamíferos**

Método

20 Selección *in vitro* de células tumorales humanas

[0106] Se cultivaron sesenta líneas celulares de tumores humanos que comprendían nueve tipos de tumores durante 24 horas antes de someterse a una exposición continua de 48 horas a 0,01-100 μM de roscovitina. Para calcular la citotoxicidad, se usó un ensayo de proteína sulforhodamina B.

25 Cultivo de célula L1210

[0107] Usando un hemocitómetro, se contaron células L1210 extraídas de cultivos en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640 complementado con suero de ternero fetal al 10%, penicilina y estreptomycin, dispuestas a una tasa de 5×10^4 células por mililitro en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en presencia o en ausencia de diversas concentraciones de roscovitina o de olomucina, y después, se incubaron a 37 °C con CO_2 al 5%. Para invertir el efecto roscovitina, las células L1210 cultivadas durante dos días en presencia o en ausencia de roscovitina se lavaron con PBS para eliminar cualquier traza de producto activo, se contaron y se volvieron a poner en medio recién preparado que no contenía ningún producto activo (roscovitina u olomucina). El crecimiento celular se midió diariamente usando el ensayo con tetrazolio en microcultivo. El análisis del ciclo celular se realizó sobre células fijadas en etanol, tratadas con RNasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y teñidas con yoduro de propidio. La toma de datos se realizó usando un citómetro de flujo Coulter (HiLeah, FI, EEUU) EPICS Elite (marca registrada) y el análisis de estos datos se realizó con un programa informático Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, EEUU) (marca registrada). Todos los ensayos se repitieron tres veces y todos los experimentos se repitieron al menos dos veces.

40 Fosforilación de vimentina *in vivo*

[0108] Para estudiar la fosforilación *in vivo* de la vimentina por la quinasa cdc2, las células se trataron o no con roscovitina 60 μM durante 48 horas antes de una exposición de la colcemida 10 ng/ml durante dos horas más. Después, los extractos celulares se colocaron para migración sobre un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron por transferencias de Western y se incubaron con anticuerpos 4A4. Estos anticuerpos reaccionan de forma cruzada con la vimentina fosforilada por cdc2, pero no reaccionan ni con la vimentina fosforilada por otras quinasas (proteína quinasa cAMP dependiente, proteína quinasa C, proteína quinasa Ca^{2+} calmodulina-dependiente) ni con la vimentina no fosforilada: los anticuerpos 4A4 reconocen específicamente la vimentina que está fosforilada al nivel de su resto Ser-55 por la quinasa cdc2 en el momento de la entrada en mitosis de la célula.

50 Resultados

[0109] La roscovitina (0,01-100 μM ; exposición durante 48 horas) se ensayó en 60 líneas celulares humanas tumorales que comprendían nueve tipos de tumores (leucemia, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama). Todas las líneas celulares presentaron una sensibilidad equivalente a la roscovitina. El valor medio CI_{50} es de 16 μM (mientras que en el caso de la olomucina es de 60,3 μM). No se ha observado ninguna correlación entre la sensibilidad de las líneas celulares a la roscovitina y la presencia de p53 silvestre o mutado. El método de análisis Compare ha mostrado que los efectos de la roscovitina y del flavopiridol son comparables.

[0110] En cuanto a los efectos de la roscovitina en el crecimiento de la línea celular L1210, se observó una inhibición dependiente de la dosis muy clara del crecimiento, como muestra la figura 7A. En la figura 7A se representa el crecimiento celular en función de la concentración de roscovitina o de olomucina. Las curvas son sensiblemente idénticas tras dos y tres días de cultivo, como se ha observado con las células tumorales mencionadas anteriormente. La roscovitina es aproximadamente cuatro veces más eficaz que la olomucina para inhibir el crecimiento celular (CI_{50} de 40 μM para la roscovitina y 160 μM para la olomucina). Aunque la mayor parte

de las células son viables ($96 \pm 2\%$ por exclusión con azul de Tripano) tras un tratamiento de 48 horas con roscovitina $60 \mu\text{M}$, se mantienen irreversiblemente detenidas, incluso después de abundantes lavados. Las células expuestas a $120 \mu\text{M}$ de roscovitina mueren rápidamente. Los efectos de la roscovitina sobre la distribución del ciclo celular se estudiaron a continuación por citometría de flujo. Con $60 \mu\text{M}$ de roscovitina, las células permanecen detenidas en G1 y se acumulan en G2 como muestra la figura 7B donde se representan las proporciones (%) de cada fase del ciclo celular observado (G1, S, G2/M) en presencia o en ausencia de roscovitina.

[0111] Con objeto de identificar la diana molecular *in vivo* de la roscovitina, se han utilizado anticuerpos 4A4. Los resultados se ilustran en la figura 8 donde se representan las proteínas totales extraídas de las células tratadas (+) o no tratadas (-) con roscovitina y después resueltas en SDS-PAGE antes de la transferencia de Western con los anticuerpos 4A4. Las células no tratadas se detienen en metafase y acumulan vimentina fosforilada por cdc2. Por el contrario, las células tratadas con roscovitina no presentan vimentina fosforilada por cdc2, lo que muestra que, en efecto, cdc2 se ha inhibido *in vivo* y que las células se han detenido antes de la metafase.

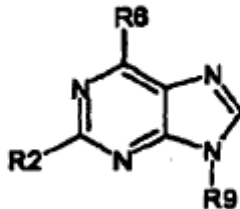
15 Referencias Bibliográficas

[0112]

- 1 - Vesely y cols. ((1994) Eur. J. Biochem. 224, 771-786.11.
- 2 - Azzi y cols. (1994) J. Biol. Chem. 269, 13279-13288.
- 3 - Baratte y cols. (1992) Anticancer Res. 12; 873-880.
- 4 - Azzi y cols. (1992) Eur. J. Biochem. 203, 353-360.
- 5 - Richardson y cols. (1990) Genes and Developments 4, 1332-1344.
- 6 - Meijer y cols. (1991) EMBO J 10; 1545-1554.
- 7 - Lew y cols. (1992) J. Biol. Chem. 267, 13383-13390.
- 8 - Meyerson y cols. (1994) Molecul. Cellul. Biol. 14, 2077-2086.
- 9 - Charest y cols. (1993) Molecul Cellul Biol. 13, 4679-4690.
- 10 - Landgraf y cols. (1989) Eur. J. Biochem. 181, 643-650.
- 11 - Pinna, L.A. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1054, 267-284.
- 12 - Craig y cols. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3278-3284.
- 13 - Bianchi y cols. (1994) Mol. Gen. Genet. 242, 337-345.
- 14 - Kallen y cols. (1990) Biochem. Biophys. Res. Comm. 168, 616-624.
15. Blow y cols. (1986), Cell 47, 577-587.
16. Blow (1993) J. Cell-Biol. 122, 993-1002

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I,



5 en la que

10 R² representa un grupo 1-D, L- hidroximetilpropilamino;
 R⁶ representa un grupo benzilamino; y
 R⁹ representa un grupo isopropilo;
 y los isómeros ópticos o la mezcla racémica de los mismos;
 para usar para el tratamiento de un trastorno proliferativo

2 . El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el trastorno proliferativo tratado es el cáncer.

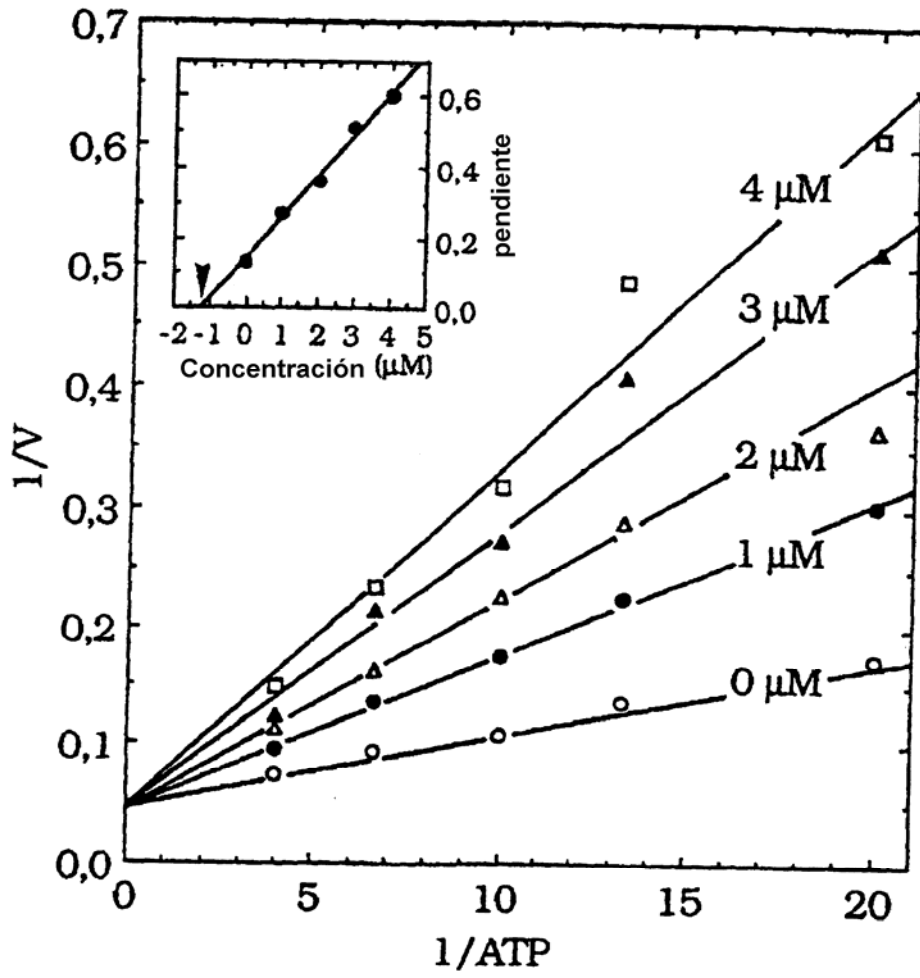


Figura 1

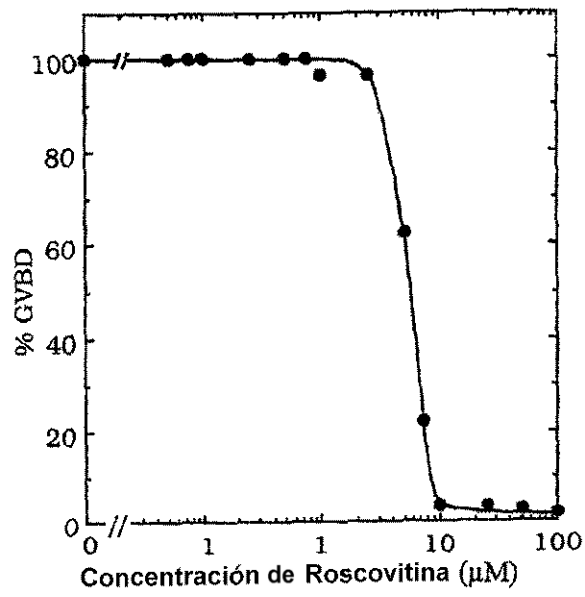


FIGURA 2

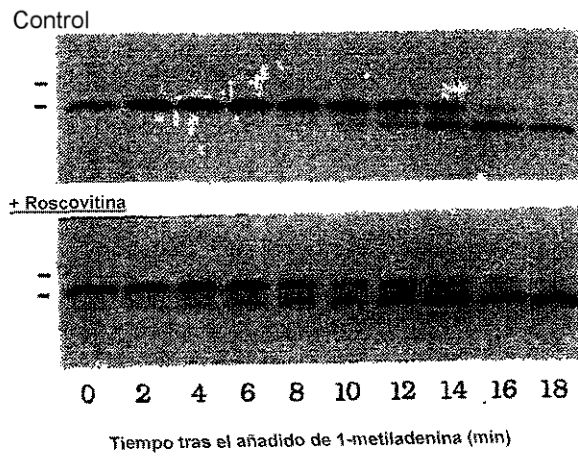


Figura 3

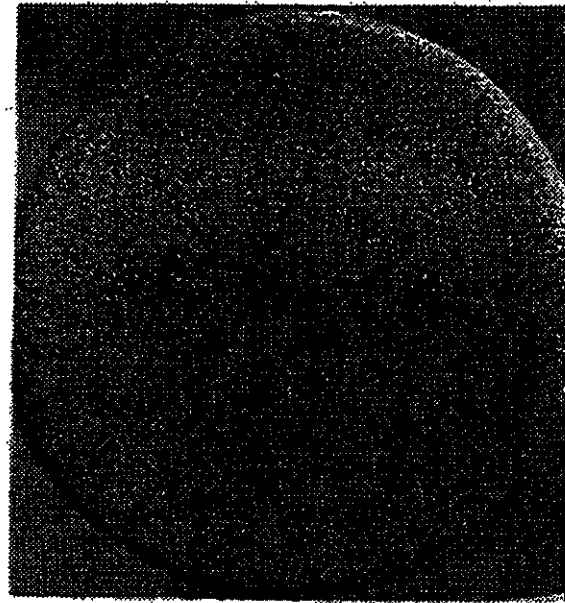


Figura 5

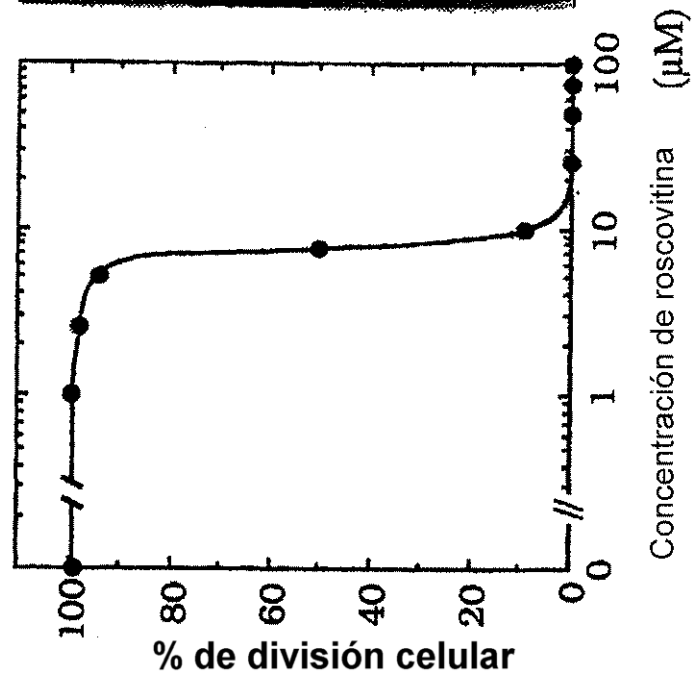


Figura 4

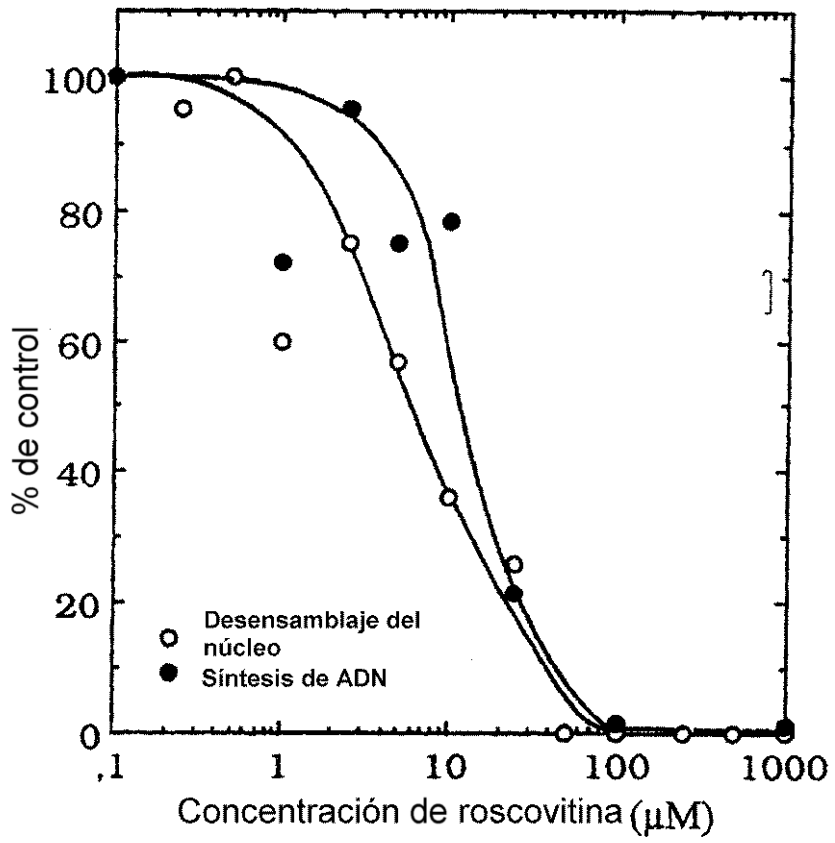


Figura 6

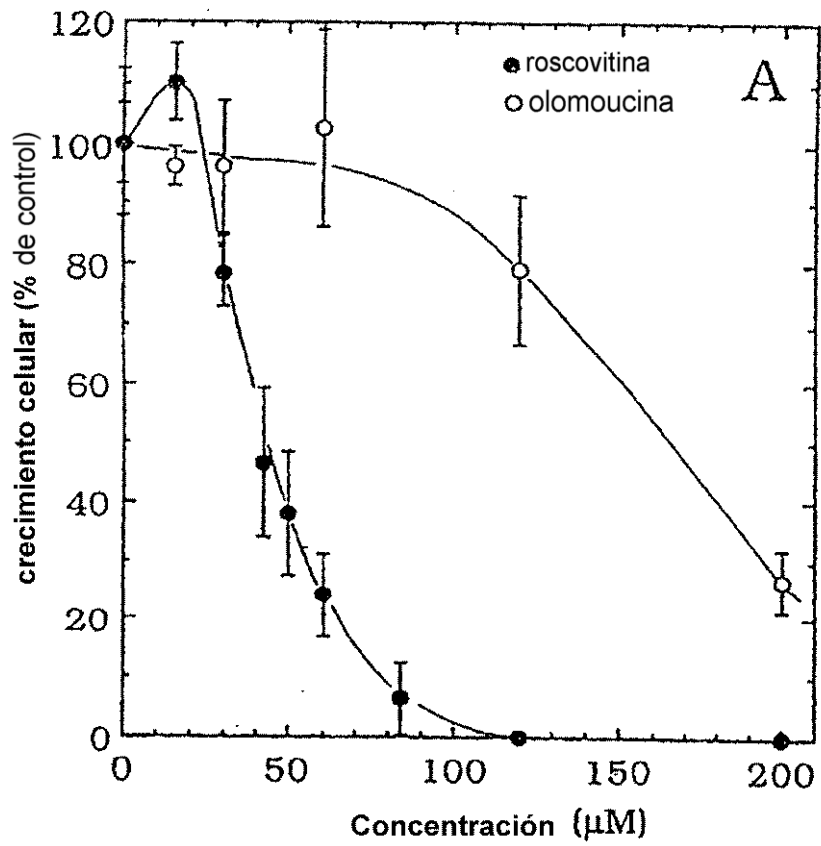


Figura 7a

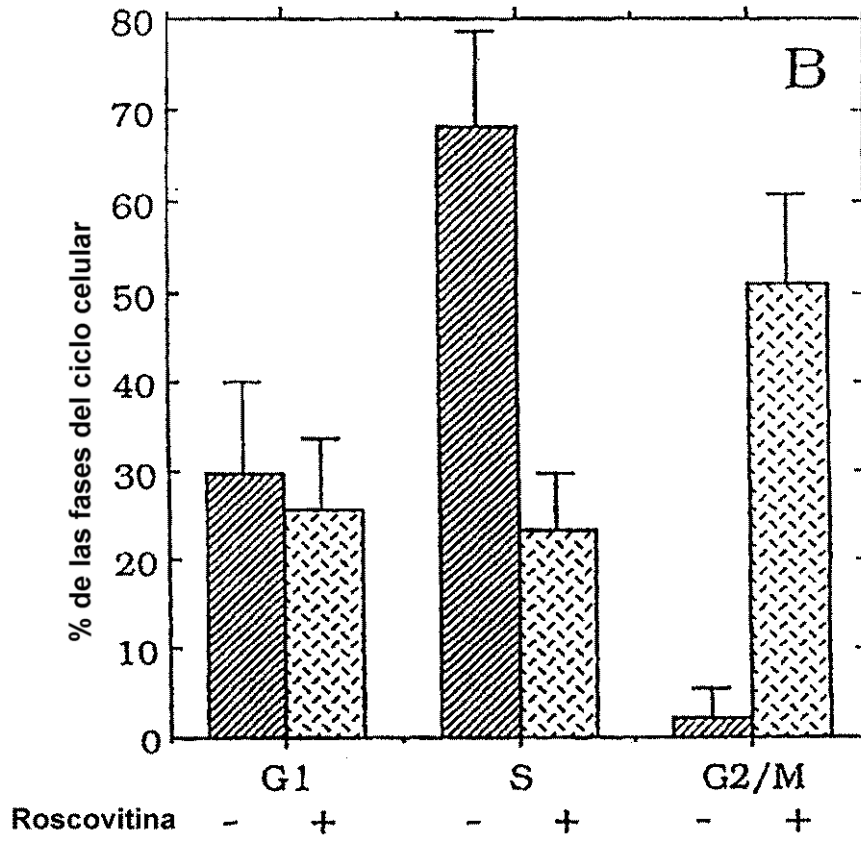


Figura 7b

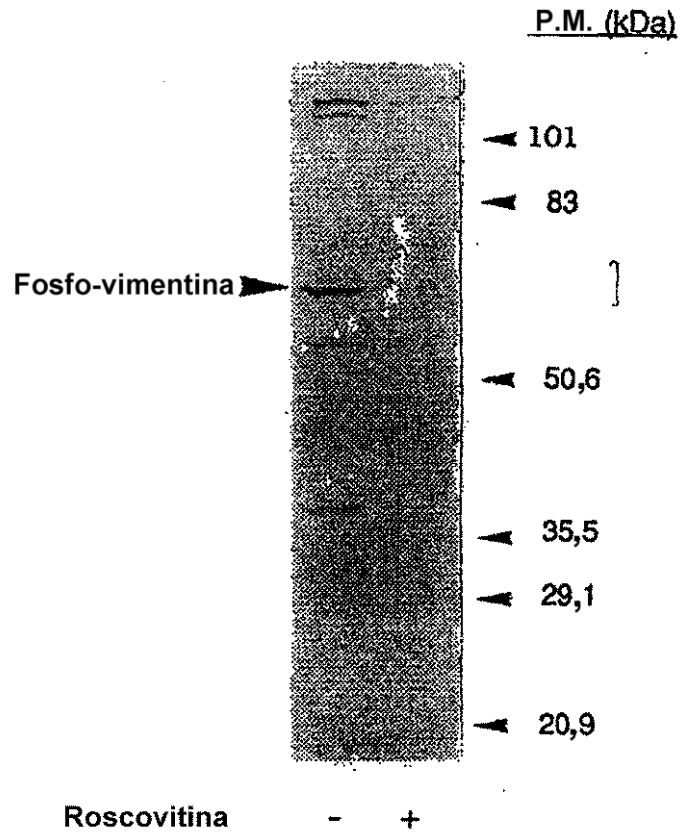


Figura 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos no de patentes citados en la descripción

- 10
- **Hocart.** *Phytochemistry*, 1991, vol. 30, 24774-2486 [0073]
 - **Vesely et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 224, 771-786.11 [0112]
 - **Azzi at al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 13279-13288 [0112]
 - **Baratte et al.** *Anticancer Res.*, 1992, vol. 12; 873-880 [0112]
 - **Azzi et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 203, 353-360 [0112]
- 15
- **Richardson et al.** *Genes and Developments*, 1990, vol. 4, 1332-1344 [0112]
 - **Meijer et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10; 1545-1554 [0112]
 - **Lew et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 13383-13390 [0112]
 - **Meyerson et al.** *Molecul. Cellul. Biol.*, 1994, vol. 14, 2077-2086 [0112]
 - **Charest et al.** *Molecul Cellul Biol.*, 1993, vol. 13, 4679-4690 [0112]
 - **Landgraf et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1989, vol. 181, 643-650 [0112]
- 20
- **Pinna, L.A.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, vol. 1054, 267-284 [0112]
 - **Craig et al.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 3278-3284 [0112]
 - **Blanchi et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 242, 337-345 [0112]
 - **Kallen et al.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1990, vol. 168, 616-624 [0112]
- 25
- **Blow et al.** *Cell*, 1986, vol. 47, 577-587 [0112]
 - **Blow.** *J. Cell-Biol.*, 1993, vol. 122, 993-1002 [0112]