



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 372 242**

② Número de solicitud: 201030726

⑤ Int. Cl.:
C07D 249/08 (2006.01)
C01G 55/00 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.05.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.01.2012

⑦ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Souza Castelo, María Pilar y
Matesanz García, Ana Isabel**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Compuesto di{3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexil tiosemicarbazonato)platino (II)}, procedimiento de síntesis y su aplicación como fármaco antitumoral.**

⑤ Resumen:

Compuesto di{3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexil tiosemicarbazonato)platino (II)}, procedimiento de síntesis y su aplicación como fármaco antitumoral.

La presente invención se refiere al compuesto di{3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexil tiosemicarbazonato) platino (II)}, a su procedimiento de síntesis, a composiciones farmacéuticas que lo comprenden, así como a su uso como agente antitumoral.

DESCRIPCIÓN

Compuesto di{3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexil tiosemicarbazonato) platino (II)}, procedimiento de síntesis y su aplicación como fármaco antitumoral.

Campo de la invención

La invención se encuadra en el ámbito de la industria farmacéutica y, en concreto, se refiere a un derivado de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(tiosemicarbazona), a composiciones que lo comprenden y a su uso como agente antitumoral.

Antecedentes

Los derivados de platino como el cis-diamindicloroplatino(II), cisplatino o *cis*-platino (*cis*-DDP), se encuentran entre los fármacos más utilizados en quimioterapia del cáncer [Cisplatino, Bernhard Lippert Ed. Wiley-VCH. 1999; Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy, Kelland, L. y Farrell, N. Humana Press 2000; Rosenberg, B y col., *Nature*, 1969, 222, 385-386]. La diana celular principal de los compuestos antitumorales de platino es el ADN. El platino se une covalentemente al ADN produciendo distorsiones en la estructura de la doble hélice, que impiden su replicación y su reparación conduciendo a la muerte celular. Estos fármacos salvaron miles de vidas, sin embargo su utilidad clínica está restringida debido al desarrollo de resistencia al fármaco, severos y adversos efectos secundarios y el limitado espectro de tumores frente a los cuales son activos. Otra de las desventajas que presentan es la alta toxicidad como nefrotoxicidad, hematotoxicidad o neurotoxicidad que disminuyen su eficiencia terapéutica.

Cientos de moléculas similares al cisplatino han sido sintetizadas variando la naturaleza de los sustituyentes de los grupos amino y/o del ligando saliente con el fin de encontrar otros compuestos que obtengan estos efectos, sin embargo solo unos pocos se encuentran en fase clínica [Wong, E. y col., *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2451-2466; Guo, Z. y col., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38, 1512-1531]. Esto puede ser explicado por considerar la misma diana que el cisplatino. Así, en la actualidad, la investigación se centra en la búsqueda de nuevos agentes con mecanismos de acción diferentes al del cisplatino.

La enzima ribonucleótido reductasa (RR) implicada en la síntesis del ADN se encuentra sobreexpresada en las células tumorales por lo que constituye una excelente diana para la terapia del cáncer. Los compuestos de la familia de las tiosemicarbonas α -(N)-heterocíclicas, (N)-TSCs, son los inhibidores más efectivos de la RR y muchos de ellos han presentado propiedades antitumorales demostrando que son capaces de vencer la resistencia adquirida al cisplatino. De entre estos compuestos, la 3-aminopiridin-2-carboxalheído tiosemicarbazona (Triapine[®]) es de particular interés [Finch, R.A. y col., *Biochem. Pharmacol.*, 2000, 59, 983-991; Finch, R.A. y col., *Adv. Enzyme Regul.*, 1999, 39, 3-12; Alvero, A.B. y col., *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 2006, 13, 145-152].

También se han descrito derivados de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(tiosemicarbazona) [Matesanz, A.I. y Souza, P., *J. Inorg. Biochem.*, 2007, 101, 245-253] que han demostrado una importante actividad antitumoral tanto en su forma libre como formando complejos de paladio y platino. No obstante, en la mayoría de los casos son necesarias concentraciones un tanto más elevadas de estos compuestos con respecto al cisplatino para lograr una efectiva inhibición del crecimiento de las líneas celulares tumorales.

Aunque el cisplatino sigue siendo el quimioterapéutico más importante, es necesario encontrar otros compuestos activos en aquellas líneas celulares que se han hecho resistentes a él, y que presenten una menor citotoxicidad, para ser administrados solos o en terapia combinatoria.

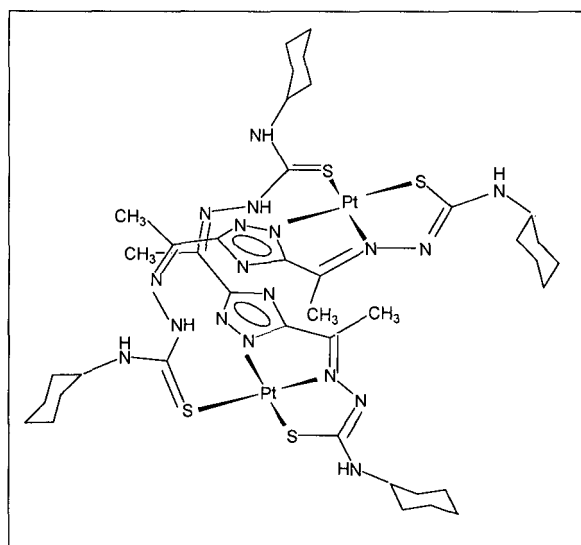
Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que un complejo de platino, en concreto, di[3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexil tiosemicarbazonato) platino(II)] [Pt(μ -H₃L¹)₂] presenta una elevada actividad antiproliferativa (dentro del rango micromolar) en las líneas celulares tumorales A2780 y A2780cisR siendo capaz de vencer la resistencia al cisplatino, que expresada como factor de resistencia (FR) es de 1.3 para [Pt(μ -H₃L¹)₂] frente a 6.9 para el cisplatino [FR = IC₅₀(A2780cisR)/IC₅₀(A2780)]. Este compuesto también ha demostrado inhibir el crecimiento celular en la línea de cáncer de pulmón humano NCI-H460. El mencionado compuesto de la invención, al igual que otras tiosemicarbonas α -(N)-heterocíclicas, tiene como diana la enzima ribonucleótido reductasa (RR).

Como característica adicional señalar que el mencionado compuesto presenta una baja nefrotoxicidad comparada con el compuesto antitumoral de referencia cisplatino.

El método de síntesis desarrollado para la obtención de este compuesto tiene además una buena economía de átomos, es fácilmente reproducible y conlleva un coste medio. Esto, unido a las ventajas de baja nefrotoxicidad, alta actividad antitumoral y capacidad de vencer la resistencia al cisplatino, le hace ser un candidato adecuado para ser utilizado en la preparación de nuevos medicamentos con actividad antitumoral, suministrado, bien solo, o en terapia de combinación.

Por tanto, en un aspecto la invención se relaciona con el complejo di [3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazonato) platino(II)] de fórmula (I):



(I)

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende:

- a) la reacción de *N*-ciclohexiltiosemicarbazonato con 3,5-diacetil-1,2,4-triazol en una proporción de al menos 2:1;
- b) la reacción del producto obtenido en la etapa a) con una sal de platino.

En otro aspecto, la invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la invención hace referencia al compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer.

Por último, la invención se refiere también al uso del compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de cáncer.

Descripción detallada de la invención

El compuesto de la invención puede estar en forma de sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, o en forma de solvatos, preferiblemente solvatos farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo" se refiere a sales o solvatos que, cuando se administran al receptor, pueden proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula (I) tal como el descrito en el presente documento. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere preferiblemente a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o una reacción no favorable similar, tal como trastornos gástricos, mareo y similares, cuando se administra a un ser humano o animal. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno de estado o federal o está incluido en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida de modo general para su uso en animales, y de manera más particular en seres humanos. Las sales farmacéuticamente no aceptables también se encuentran dentro del alcance de la invención porque pueden ser útiles para preparar sales farmacéuticamente aceptables.

ES 2 372 242 A1

El término "solvato" según esta invención ha de entenderse como que significa cualquier forma del compuesto activo según la invención que tiene otra molécula (lo más probablemente un disolvente polar) unida al mismo mediante enlace no covalente. Ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato. Preferiblemente, los solvatos son, preferiblemente, solvatos farmacéuticamente aceptables.

La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se sintetizan a partir del compuesto original, que contiene uno o más restos básicos, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido inorgánico tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, etc., y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, etc.

Una forma farmacéuticamente aceptable preferida es la forma cristalina, incluyendo tal forma en una composición farmacéutica. En el caso de sales y solvatos, los restos de disolvente e iónicos adicionales también deben ser no tóxicos. El compuesto de la invención puede presentar diferentes formas polimórficas, se pretende que la invención englobe todas estas formas.

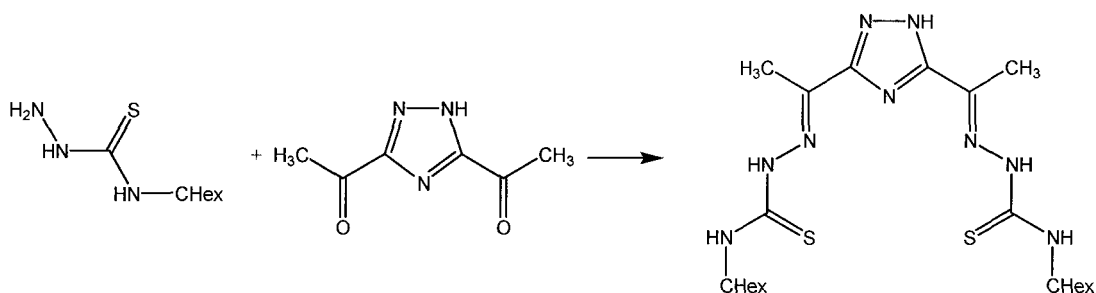
El compuesto de la invención también pretende incluir compuestos que difieren sólo en presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto para la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o en ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , se encuentran dentro del alcance de esta invención.

El compuesto de la presente invención representado por la fórmula (I) descrita anteriormente puede incluir isómeros tales como el isómero *cis* o el isómero *trans*.

Síntesis del compuesto de fórmula (I)

El compuesto de fórmula (I) de la presente invención se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

- la reacción de *N*-ciclohexiltiosemicarbazida con 3,5-diacetil-1,2,4-triazol en una proporción de al menos 2:1 para dar lugar al compuesto 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazona), H_5L^1 , según el siguiente esquema sintético:



y

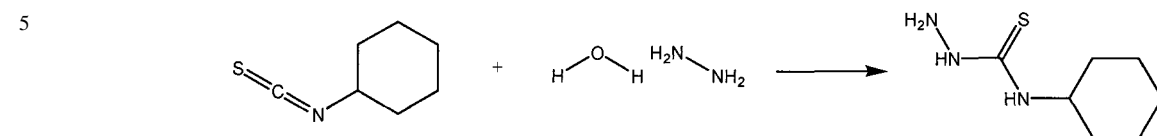
- la reacción del producto obtenido en la etapa a) con una sal de platino para obtener un compuesto de fórmula (I).

De manera conveniente, la reacción de la etapa a) se lleva a cabo bajo agitación, utilizando etanol como disolvente, y manteniendo la disolución resultante a reflujo durante aproximadamente 5 horas.

La formación del complejo de platino de la presente invención se realiza en presencia de una fuente de iones platino (II) adecuada. En una realización particular, la sal de platino que conduce a la formación del complejo de platino de la invención es tetracloroplatinato (II) potásico (K_2PtCl_4). Típicamente, dicha fuente de Pt se encuentra en una disolución acuosa, sobre la que se adiciona el ligando coordinante, que en este caso es la 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazona).

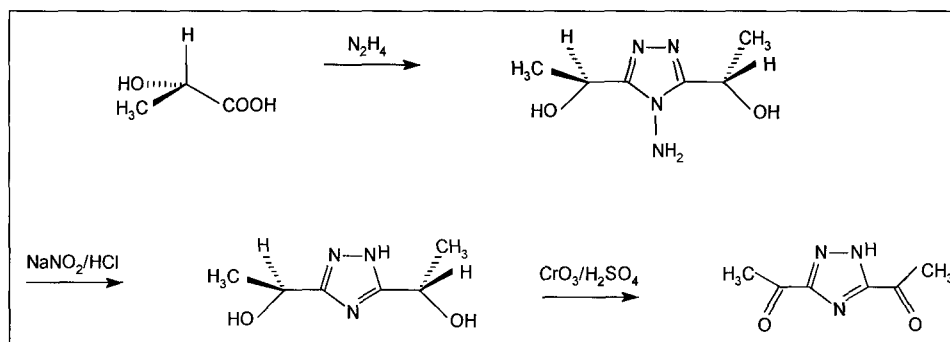
ES 2 372 242 A1

La obtención de la *N*-ciclohexiltiosemicarbazida se puede efectuar mediante la reacción de isotiocianato de ciclohexilo e hidrato de hidracina por métodos conocidos en la técnica:



Por su parte, el compuesto 3,5-diacetil-1,2,4-triazol se puede obtener por reacción de 3 equivalentes de hidrato de hidracina y dos equivalentes de ácido L-láctico según el procedimiento descrito por Alonso, J.M. y col. en *Heterocycles*, 26, 989, 1987. Un esquema del procedimiento de esta síntesis se detalla a continuación.

15



Los productos de partida se encuentran disponibles comercialmente.

Composiciones farmacéuticas

35

Una característica importante del compuesto de la invención es su bioactividad y, en particular, su actividad citotóxica. Así, según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

50

Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica.

55

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

60

La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser mediante cualquier método adecuado, tal como infusión intravenosa, preparaciones orales y administración intravenosa e intraperitoneal. Se prefiere que se usen tiempos de infusión de hasta 24 horas, más preferiblemente 1-12 horas, siendo de 1-6 horas lo más preferido.

65

Asimismo, pueden administrarse composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención mediante encapsulación en liposomas o nanoesferas, en formulaciones de liberación sostenida o mediante otros medios de administración habituales.

ES 2 372 242 A1

Las formulaciones se pueden preparar según métodos convencionales tales como los que se describen en las Farmacopeas Española, Europea o de Estados Unidos de América, o en textos de referencia similares, por ejemplo “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

5 La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación y el sitio, huésped y tumor particulares que se están tratando. También deben tenerse en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, estado del huésped, combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. Puede llevarse a cabo la administración de manera continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

10 El compuesto y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición aparte para la administración al mismo tiempo o en un tiempo diferente.

15 *Usos del compuesto de fórmula (I)*

Un aspecto adicional de la presente invención lo constituye un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

20 Un aspecto adicional de la invención es el compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (1) tal como se ha definido anteriormente, o una sal o un solvato del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del

25 cáncer.

Las actividades antitumorales de estos compuestos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón y cáncer de ovario. El Ejemplo 2 ilustra la actividad antitumoral de compuestos representativos de la presente invención sobre distintas líneas celulares representativas de diversos tumores (carcinoma de ovario humano, carcinoma de ovario humano con resistencia adquirida al cisplatino, carcinoma pulmonar, de células no pequeñas, humano).

En el contexto de la presente invención, el término “tumor” se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto benignas como malignas, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

35 El término “cáncer” se refiere o describe cualquier condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por una proliferación o crecimiento celular incontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

Preferiblemente, dicha condición se selecciona entre cáncer de pulmón y cáncer de ovario.

40 El compuesto de la invención puede usarse con, al menos, otro agente antitumoral o quimioterapéutico para proporcionar una terapia de combinación. El al menos otro fármaco puede formar parte de la misma composición, o puede proporcionarse como una composición separada para la administración al mismo tiempo o a tiempos diferentes.

45 Un “agente antitumoral” o “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes antitumorales que pueden utilizarse en combinación con el compuesto de la invención incluyen cualquier agente antitumoral que tenga como diana el ADN. Debido a que estos agentes antitumorales presentan una diana diferente a la del compuesto de la invención, la administración combinada de los mismos puede provocar un efecto aditivo o sinérgico. En una realización particular, dichos agentes antitumorales adicionales se seleccionan entre

50 cisplatino y carboplatino.

El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de esta memoria descriptiva significa la administración de un compuesto o una formulación según la invención para mejorar o eliminar la enfermedad.

55 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplos

60 *Materiales y medidas*

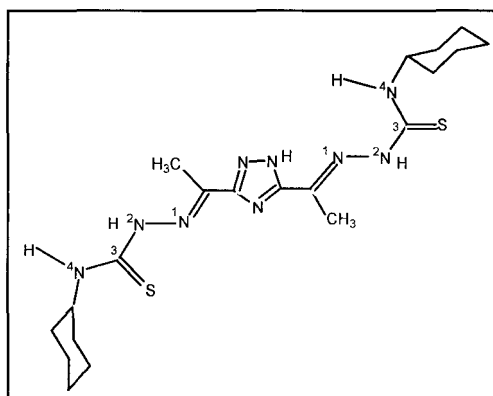
Los disolventes utilizados y los reactivos de partida, hidrato de hidracina, ácido *L*-láctico, isotiocianato de ciclohexilo, y tetracloroplatinato(II) potásico, son productos comercialmente disponibles. La ⁴*N*-ciclohexiltiosemicarbazida, fue preparada a partir de isotiocianato de ciclohexilo y hidrato de hidracina y la dicetona 3,5-diacetil-1,2,4-triazol fue preparada a partir hidrato de hidracina y ácido *L*-láctico.

ES 2 372 242 A1

Los análisis elementales fueron realizados en un microanalizador LECO CHNS-932. Los espectros de masas fueron realizados en un equipo VG AutoSpec, mediante bombardeo con átomos rápidos (FAB) utilizando alcohol 3-nitrobenzílico como matriz. Los espectros de resonancia magnética nuclear de proton (^1H -RMN) en disolución de $\text{DMSO}-d_6$, fueron registrados en un equipo BRUKER AMX-300. Los espectros de infrarrojo, en pastillas de KBr, fueron registrados en un equipo Bomen-Michelson ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$).

1. Síntesis del compuesto $[\text{Pt}(\mu\text{-H}_3\text{L}^1)]_2$

1.1. Síntesis de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazona) $[\text{H}_3\text{L}^1]$, $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{S}_2$



Sobre una disolución etanólica de ^4N -ciclohexiltiosemicarbazida conteniendo 0.346 g (2 mmol) en 20 mL se añadieron, lentamente y con agitación, 0.153 g, (1 mmol) de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol, disueltos en 20 mL de etanol. La disolución resultante se mantuvo a reflujo durante 5 horas. Una vez fría, se concentró a la mitad de su volumen precipitando un sólido amarillo que se filtró, se lavó con etanol frío y éter dietílico y se secó a vacío.

El producto obtenido (rendimiento del 55%) presenta un punto de fusión de 213°C y su caracterización se ha llevado a cabo por las técnicas habituales: ^1H -RMN, IR, MS(FAB $^+$) y análisis elemental.

Análisis elemental

Encontrado: C, 51.70; H, 7.20, N, 26.95; S 13.15%

Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{S}_2$: C, 51.85; H, 7.15, N, 27.20; S 13.80%.

MS (FAB $^+$ con mNBA matriz), $m/z = 464.3$ para $[\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{S}_2+\text{H}]^+$.

IR (KBr, cm^{-1}), $\nu = 3323$ (f, NH-triazol); $\nu = 3226, 3099$ (d, $^2\text{NH}, ^4\text{NH}$); $\nu = 2932, 2853$ (f, CH); $\nu = 1547$ (f, CN), $\nu = 853$ (d, CS-tioamida IV).

(f-fuerte, d-débil)

^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, ppm), $\delta = 15.29$ (s, NH-triazol); $\delta = 12.57$ (s, ^2NH); $\delta = 10.75$ (s, ^4NH); $\delta = 8.37, 8.34$ (d, ^4NH), $\delta = 8.20, 8.17$ (d, ^4NH), $\delta = 4.30$ (s, CH); $\delta = 2.37$ (s, CH_3 -triazol) $\delta = 1.91\text{-}1.57$ (m, CH_2 -axial); $\delta = 1.43\text{-}1.31$ (m, CH_2 -ecuatorial).

(s-singlete, d-doblete, m-multiplate)

ES 2 372 242 A1

1.2. Síntesis de di [3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazonato) platino(II)], $[Pt(\mu-H_3L^1)]_2 \cdot C_{40}H_{62}N_{18}S_4Pt_2 \cdot 16H_2O$

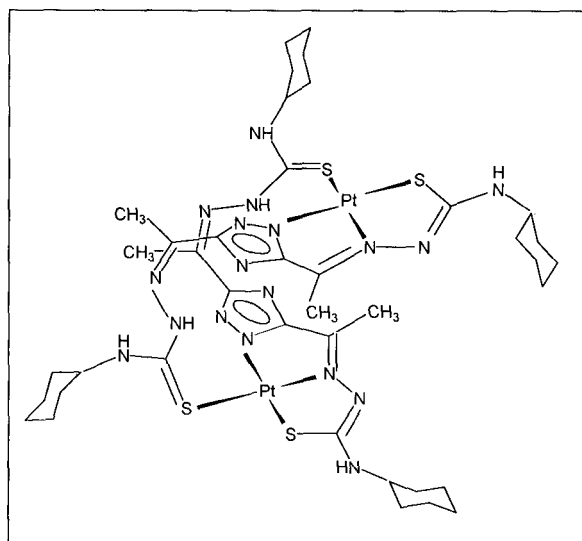
5

10

15

20

25



30

Una disolución acuosa (5 mL) de tetracloroplatinato potásico (0.093 g, 0,2 mmol) se añadió lentamente sobre una suspensión metanólica (20 mL) de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazona) (0,083 g, 0,2 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación durante 15 horas a temperatura ambiente y el sólido naranja resultante se filtró, se lavó metanol y éter dietílico y se secó a vacío.

35

El producto obtenido (rendimiento del 32%) descompone a 289°C y su caracterización se ha llevado a cabo por las técnicas habituales: 1H -RMN, IR, MS(FAB⁺) y análisis elemental.

Análisis elemental

Encontrado C, 29.60; H, 5.21, N, 15.89; S 8.19%

40

Calculado para $C_{40}H_{62}N_{18}S_4Pt_2 \cdot 16H_2O$: C, 30.00; H, 5.90, N, 15.70; S 8.0%.

MS (FAB⁺ con mNBA matriz), m/z = 1313.4 para $[Pt(H_3L^2)]_2 + H]^+$.

45

IR (KBr, cm^{-1}), $\nu = 3245$ (d, 4NH); $\nu = 2929, 2853$ (f, CH); $\nu = 1549$ (f, CN).

(f-fuerte, d-débil)

50

1H -RMN (DMSO- d_6 , ppm), $\delta = 12.30$ (s, 2NH); $\delta = 9.28-8.80, 8.50-7.90$ (m, 4NH); $\delta = 3.95$ (s, CH); $\delta = 2.37$ (s, CH_3 -triazol) $\delta = 1.90-1.75$ (m, CH_2 -axial); $\delta = 1.40-1.20$ (m, CH_2 -ecuatorial).

(s-singlete, d-doblete, m-multiplete)

55

2. Actividad antitumoral *in vitro*

60

Los estudios de citotoxicidad del compuesto $[Pt(\mu-H_3L^1)]_2$ se llevaron a cabo en las líneas celulares siguientes: A2780 (carcinoma de ovario humano), A2780cisR (carcinoma de ovario humano con resistencia adquirida al cisplatino) y NCI-H460 (carcinoma pulmonar, de células no pequeñas, humano). Como referente, se realizaron los ensayos de citotoxicidad del cisplatino y del compuesto libre 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazona) $[H_5L^1]$ en las tres líneas celulares y en las mismas condiciones experimentales.

65

Las células se cultivaron con medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) y L-Glutamina 2 mM en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 , a una temperatura de 37°C. La inhibición del crecimiento celular inducida por los compuestos se evaluó usando un sistema basado en una tinción celular por Sulforrodamina B. Se realizó la lectura de absorbancia a longitud de onda de 515 nm (Tecan Ultra Evolution).

ES 2 372 242 A1

Todos los experimentos se realizaron con puntos por triplicado. Se incluyeron en todos los experimentos unos controles con el DMSO al 1% en el que van disueltos los compuestos. El efecto de los compuestos se expresó como % de inhibición del crecimiento celular. Este % de inhibición se calculó en base a la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (T/C)] \times 100$$

donde T es la absorbancia observada en los pocillos con los compuestos objeto de estudio y C es la absorbancia observada en los pocillos con DMSO (controles).

Se evaluó la potencia inhibitoria de los compuestos mediante el cálculo de las curvas “concentración - % inhibición” que se ajustaron a la ecuación:

$$E = E_{\text{max}} / [1 + (IC_{50}/C)^n]$$

donde E es el efecto observado a una concentración C, E_{max} se corresponde con el efecto inhibitorio máximo, IC₅₀ es la concentración a la cual se obtiene una inhibición del 50% y n es la pendiente de la curva.

Este ajuste no lineal se realizó con el programa de regresión GraphPad Prism Versión 2.01, 1996 (GraphPad Software Inc.).

En la tabla se muestran los valores de IC₅₀ (concentración μM capaz de inhibir el crecimiento celular en un 50%) y del factor de resistencia, RF (IC₅₀ en la línea resistente dividido entre el IC₅₀ en la línea sensible) obtenidos para los compuestos:

	IC ₅₀ (A2780)	IC ₅₀ (A2780cisR)	FR	IC ₅₀ (NCI-H460)
H ₅ L ^I	32±1	47±1	1.5	49±3
[Pt($\mu\text{-H}_3\text{L}^{\text{I}}$) ₂]	6.7±0.04	8.99±0.02	1.3	19±2
cisplatin	0.54±0.02	3.7±0.1	6,9	4.5±0.2

Los datos demuestran que el compuesto de la invención inhibe el crecimiento celular *in vitro* en las líneas de carcinoma de epitelio humano A2780 (sensible al *cis*-DDP) y A2780cisR (resistente al *cis*-DDP) indicando que es capaz de vencer la resistencia al *cis*-DDP. También inhibe el crecimiento celular en la línea de cáncer de pulmón humano NCI-H460. Se necesitan concentraciones hasta cinco veces menores para inhibir el crecimiento de estas líneas celulares con respecto al compuesto libre H₅L^I, así como con respecto a otros homólogos complejos de platino derivados de 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(tiosemicarbazona) descritos en *J. Inorg. Biochem.*, 2007, 101, 245-253, que necesitan entre 40 y 63 μM para poder inhibir el crecimiento celular en un 50% en las mismas líneas celulares.

3. Nefrotoxicidad

Los estudios de nefrotoxicidad de los compuestos se llevaron a cabo en la línea celular LLC-PL1 (riñón humano). Como referente, se ensayó la toxicidad del cisplatin en las mismas condiciones experimentales. Estas células se cultivaron con medio de crecimiento MédiuM 199 suplementado con un 3% de FBS, Fetal Bovine Serum, y 1,5 g/L de bicarbonato sódico en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. La inhibición del crecimiento celular inducida por los compuestos se evaluó usando un sistema basado en una tinción celular por Sulforrodamina B. La potencia inhibitoria se realizó mediante el cálculo de las curvas de “concentración -% inhibición”. El compuesto H₅L^I a la concentración de 100 μM (máxima concentración ensayada para todos los compuestos) no alcanzó su efecto máximo por lo que no presenta nefrotoxicidad a esta concentración.

ES 2 372 242 A1

En la tabla se muestran los valores de obtenidos para los compuestos:

5

	IC₅₀
H₅L^I	> 100
[Pt(μ-H₃L^I)₂]	33±1
Cisplatin	7.03±0.08

10

15 A la vista de estos datos, se concluye que el compuesto de la invención presenta una menor nefrotoxicidad que el *cis*-DDP en células sanas de riñón humano.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto di[3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(4-ciclohexiltiosemicarbazonato) platino(II)]de fórmula (I):

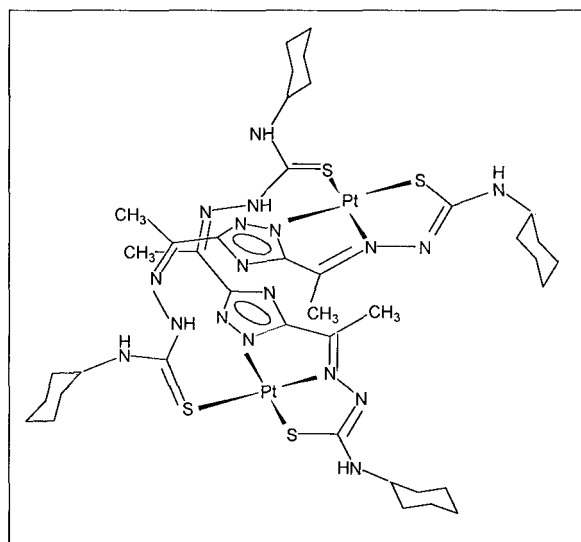
5

10

15

20

25



(I)

30

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (I) que comprende:

35

- c) la reacción de *N*-ciclohexiltiosemicarbazida con 3,5-diacetil-1,2,4-triazol en una proporción de al menos 2:1;
- d) la reacción del producto obtenido en la etapa a) con una sal de platino.

40

3. Procedimiento según reivindicación 2, donde la sal de platino es tetracloroplatinato (II) potásico.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

5. Composición farmacéutica según reivindicación 4, que comprende además, de forma conjunta o de forma separada con el compuesto de fórmula (I) o con una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, un agente antitumoral adicional.

50

6. Compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento.

7. Compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer.

55

8. Compuesto según reivindicación 7 donde el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón y cáncer de ovario.

9. Compuesto según la reivindicación 7, donde el medicamento se administra solo o en combinación con otro agente antitumoral adicional.

60

10. Uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

11. Uso según reivindicación 10, donde el medicamento se administra solo o en combinación con otro agente antitumoral adicional.

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030726

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MATESANZ, A.I. & SOUZA, P. "Palladium and platinum 3,5-diacetil-1,2,4-triazol bis(thiosemicarbazones): Chemistry, cytotoxic activity and structure-activity relationships". Journal of Inorganic Biochemistry 2007, Volumen 101, páginas 245-253. [Disponible en línea el 05.06.2006]. Ver página 245, resumen; página 246, columna 1, párrafo 3 – columna 2, párrafo 3; esquema 1; página 251, apartado 3.	1-11
A	KRISHNAN, S. et al. "Synthesis and spectral investigations of Mn(II) complexes of pentadentate bis(thiosemicarbazones)". Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2010, Volumen 75, Número 2, páginas 585-588. [Disponible en línea el 18.11.2009]. Ver página 585, resumen e introducción; página 586, esquema 2; página 586, apartados 2.2 y 2.3.	1-11
A	MOHAN, M. et al. "Synthesis, Characterization, and Antitumor Properties of Some Metal Complexes of 2,6-Diacetylpyridine Bis(N4-azacyclic Thiosemicarbazones). Journal of Inorganic Biochemistry 1998, Volumen 34, páginas 41-54. Ver página 41, resumen e introducción; página 48, tabla 1.	1-11
A	JAIN, V.K. & JAIN, L. "The chemistry of tri- and high-nuclearity palladium(II) and platinum(II) complexes". Coordination Chemistry Reviews 2010, Volumen 254, páginas 2848-2903. [Disponible en línea el 10.05.2010]. Ver página 2873, tabla 6; página 2879, columna 2, párrafo 2.	1-11

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
23.12.2011

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D249/08 (2006.01)

C01G55/00 (2006.01)

A61K31/282 (2006.01)

A61K31/4196 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

C07D, C01G, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, PUBCHEM, PUBMED, CHEMSPIDER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.12.2011

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	MATESANZ, A.I. & SOUZA, P. Journal of Inorganic Biochemistry 2007, Vol. 101, pp. 245-253.	05.06.2006
D02	KRISHNAN, S. et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2010, Vol. 75, Nº 2, pp.585-588.	18.11.2009
D03	MOHAN, M. et al. Journal of Inorganic Biochemistry 1998, Vol. 34, pp. 41-54.	1998

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

El objeto de la invención es un compuesto de [3,5-diacetil-1,2,4-triazol *bis*-(4-ciclohexiltiosemicarbazonato) platino (II)] de fórmula (I), un procedimiento para la preparación del mismo y el uso de este compuesto para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

El documento D01 divulga una serie de complejos de platino (II) derivados de [3,5-diacetil-1,2,4-triazol *bis*(tiosemicarbazona), que se preparan por reacción de las correspondientes tiosemicarbazonas, obtenidas a su vez a partir de las tiosemicarbazidas, con tetracloroplatinato (II) de potasio (ver página 245, resumen; página 246, columna 1, párrafo 3-columna 2, párrafo 3). Estos compuestos, que presentan actividad antitumoral (ver página 251, apartado 3.3), se diferencian de los compuestos de la invención en la sustitución de los átomos de N en posición 4 de la tiosemicarbazona, que en la invención es ciclohexilo, mientras que en el documento D01 es fenilo, metilo y etilo, además de hidrógeno (ver página 246, esquema 1).

El documento D02 divulga complejos de manganeso (II) de *bis*(tiosemicarbazonas) pentadentadas, con aplicación potencial como antitumorales, obtenidas a partir de las tiosemicarbazonas que poseen un anillo central de piridina y grupos ciclohexilo, fenilo o etilo como sustituyentes de los N en posición 4 (ver página 585, resumen e introducción; página 586, esquema 2). Estos compuestos se sintetizan por reacción de N-ciclohexiltiosemicarbazida con 2,6-diacetilpiridina, y tratamiento de la tiosemicarbazona así resultante con una sal de manganeso (ver página 586, apartados 2.2 y 2.3).

El documento D03 divulga una serie de complejos metálicos, entre los que se encuentran los complejos de platino (II), derivados de 2,6-diacetilpiridina *bis*-(N⁴-azacilo-tiosemicarbazonas, que poseen actividad antitumoral y que presentan una estructura análoga a los compuestos de la invención, aunque, al igual que en el caso anterior, se diferencian de éstos en la naturaleza del heterociclo central (piridina en lugar de 1,2,4-triazol) (ver página 41, resumen e introducción). En concreto, el documento recoge los derivados en los que el nitrógeno en posición 4 se encuentra formando parte de un heterociclo saturado (ver página 48, tabla 1).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia los compuestos de la invención, que comprenden un núcleo central de 1,2,4-triazol y sustituyentes ciclohexilo (reivindicaciones independientes **1** y **6**), y por tanto, tampoco hacia un procedimiento para la preparación del mismo (reivindicación independiente **2**), una composición farmacéutica que lo comprende (reivindicación independiente **4**) y el uso de dicho compuesto para la preparación de un medicamento (reivindicación independiente **10**).

Por lo tanto, se considera que la solicitud reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.