

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 367**

21 Número de solicitud: 201300033

51 Int. Cl.:

C07D 401/10 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.06.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real. C/ Hospicio s/n
18071 Granada ES

72 Inventor/es:

CONEJO GARCÍA , Ana ;
ENTRENA GUADIX , Antonio José ;
RUBIO RUIZ , Belén ;
GALLO MEZO , Miguel Ángel y
ESPINOSA ÚBEDA , Antonio

54 Título: **Inhibidores no simétricos de colina quinasa con actividad antitumoral y antimalárica**

57 Resumen:

Inhibidores no simétricos de colina quinasa con actividad antitumoral y antimalárica.

La presente invención se enmarca en el campo farmacéutico, concretamente la invención se refiere a compuestos no simétricos de bispiridinio inhibidores de la enzima colina quinasa, su síntesis y su uso como medicamento antitumoral y/o antiparasitario.

ES 2 472 367 A1

DESCRIPCIÓN

INHIBIDORES NO SIMÉTRICOS DE COLINA QUINASA CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIMALÁRICA

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo farmacéutico. Concretamente la invención se refiere a compuestos no simétricos de bispiridinio inhibidores de colina quinasa (ChoK), su síntesis y su uso como medicamento antitumoral y/o antiparasitario.

10

OBJETO DE LA INVENCÓN

El objeto de la presente invención es una familia de compuestos con estructura no simétrica de bispiridinio inhibidores de la enzima ChoK, su procedimiento de obtención y los usos dados a los mismos y a sus composiciones.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enzima ChoK es la primera enzima de la ruta CDP-colina o ruta de Kennedy, que permite la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), fosfolípido mayoritario de las membranas celulares eucariotas [Kennedy, E. P. *Annu. Rev. Biochem.* 1957, 26, 119-148]. Esta
20 enzima cataliza la fosforilación de colina a fosfocolina (PCho) utilizando ATP y Mg^{2+} como cofactor.

25

En condiciones tumorales, diferentes oncogenes, como *src*, *mos* [Hernández-Alcoceba, R.; Saniger, L.; Campos, J.; Núñez, M. C.; Khaless, F.; Gallo M. A.; Espinosa, A.; Lacal, J. C. *Oncogene* 1997, 15, 2289-2301], pero fundamentalmente oncogenes *ras*, provocan un exceso de actividad de ChoK [Macara, I. G. *Mol. Cell. Biol.* 1989, 9, 325-328; Ratnam, S.; Kent, C. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 323, 313-322] lo que se traduce en un incremento de los niveles intracelulares de PCho, sin que exista una cooperación con la biosíntesis de PC [Bhakoo, K. K.; Williams, S. R.; Florian, C. L.; Land, H.; Noble, M. D. *Cancer Res.* 1996, 56, 4630-4655]. El empleo de técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) aplicadas en diferentes tumores humanos (mama, pulmón, colon, colorrectal, próstata y linfoma hepático, entre otros) ha permitido corroborar que en todos ellos se produce un notable aumento de los niveles de PCho con respecto a los niveles existentes en los correspondientes tejidos

30

sanos [Aboagye, E. O.; Bhujwalla, Z. M. *Cancer Res.* 1999, 59, 80-84; de Certaines, J. D.; Larsen, V. A.; Podo, F.; Carpinelli, G.; Briot, O.; Henriksen, O. *NMR Biomed.* 1993, 6, 345-365; Ruiz-Cabello, J.; Cohen, J. S. *NMR Biomed.* 1992, 5, 226-233; Smith, T. A.; Bush, C.; Jameson, C.; Titley, J. C.; Leach, M. O.; Wilman, D. E.; McCready, V. R. 5 *NMR Biomed.* 1993, 6, 318-323].

Existen un gran número de estudios que avalan que el aumento de la concentración intracelular de *PCho* promueve la mitosis celular, permitiendo afirmar que el papel que ChoK juega en la carcinogénesis humana se debe al incremento de la concentración 10 del producto de catálisis, *PCho* [Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jimenez, B.; Lacal, J. C. *Oncogene* 1993, 8, 2959-2968; Kiss, Z. *Cell Signal* 1999, 11, 149-157], que actúa como segundo mensajero implicado en la transducción de la señal mitogénica.

15 Debido al importante papel que juegan ChoK y *PCho* en la carcinogénesis humana, ChoK se ha convertido en una diana terapéutica perfecta para el diseño de fármacos antitumorales, capaces de inhibir selectivamente la enzima evitando la producción de *PCho* y, por tanto, la actividad mitogénica asociada a este metabolito.

20 Hasta la fecha se han desarrollado un número muy elevado de inhibidores de ChoK que presentan actividad antiproliferativa. Todos ellas conservan la estructura biscatiónica del primer inhibidor de ChoK conocido, Hemicolinio-3, y responden a una estructura simétrica. [Lacal, J. C.; Campos Rosa, J.; Gallo Mezo, M. A.; Espinosa Úbeda, A. (ES) P20040072].

25

La inhibición de ChoK produce una disminución de la proliferación celular y previene el crecimiento tumoral en ratones [Hernández-Alcoceba, R.; Fernández, F.; Lacal, J. C. *Cancer Res.* 1999, 59, 3112-3118]. Además, la inhibición de ChoK mediante 30 inhibidores específicos conduce a las células tumorales a la apoptosis, mientras que no afecta a las células normales [Rodríguez-González, A.; Ramírez de Molina, A.; Fernández, F.; Lacal, J. C. *Oncogene* 2004, 23, 8247-8259;].

ChoK está presente en otros organismos eucariotas como es *Plasmodium falciparum*, causante del 80% de la infecciones de malaria. En este parásito, ChoK cataliza la

biosíntesis de PCho, del que se obtiene a su vez PC [Vial, H. J.; Ancelin, M. L. *Subcell Biochem.* 1992, 18, 259-306].

5 La inhibición de la biosíntesis de PC como estrategia antimalárica ha sido ampliamente estudiada frente a *P. falciparum*. Se han obtenido un gran número de compuestos con estructura de sales de amonio mono, bis y triscuaternarias capaces de inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro* [Ancelin, M. L.; Vial, H. J.; Philippot, J. R. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 4068-4071; Ancelin, M. L.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29, 814-820; Ancelin, M. L.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbuté, S.; Ringwald, P.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2590-2597; Salom-Roig, X. J.; Hamzé, A.; Calas, M.; Vial, H. J. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2005, 849-862] y, en algunos casos, *in vivo* [Ancelin, M. L.; Calas, M.; Bonhoure, A.; Herbuté, S.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2598-2605], interfiriendo la biosíntesis de PC incluso en cepas resistentes a múltiples fármacos [Ancelin, M. L.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbuté, S.; Ringwald, P.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2590-2597].

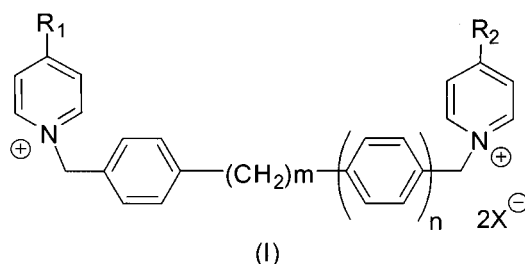
20 La identificación de la secuencia genética que codifica ChoK en *P. falciparum* [Choubey, V.; Guha, M.; Maity, P.; Kumar, S.; Raghunandan, R.; Maulik, P. R.; Mitra, K.; Halder, U. C.; Bandyopadhyay, U. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1760, 1027-1038], ha permitido obtener la enzima recombinante ChoK de *P. falciparum* (PfChoK). Estudios empleando bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) demuestran que la actividad antimalárica mostrada por este compuesto se debe a su capacidad de inhibir PfChoK, lo que provoca un descenso en la generación de PCho, que a su vez se traduce en una disminución de la biosíntesis de PC y, por tanto, en la muerte del parásito [Choubey, V.; Maity, P.; Guha, M.; Kumar, S.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Bandyopadhyay, U. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51, 696-706].

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

Compuestos objeto de la invención

Los compuestos objeto de esta invención responden a la fórmula general (I):



donde,

m puede ser 0, 1, 2, 3 ó 4;

n puede ser 0 ó 1;

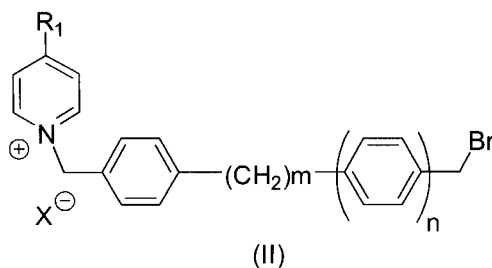
5 X⁻ representa la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente apropiado;

R₁ y R₂ representan un grupo -NR'R'', donde R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido o, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un grupo heterocíclico preferentemente de 5 miembros; con la condición de que R₁ y R₂ sean diferentes entre sí.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de compuestos de la fórmula general I que comprende los siguientes pasos:

15

a) Preparación de una disolución del producto intermedio (II) y la correspondiente piridina 4-sustituida en un disolvente polar aprótico,



20

b) Calentamiento de la mezcla de reacción a una temperatura comprendida entre 80°C y 120°C, en un tubo cerrado durante un tiempo de reacción comprendido entre 24 horas y 168 horas.

25

c) Obtención del producto precipitado mediante filtración en placa filtrante.

d) Purificación mediante lavado, en primer lugar, con el mismo disolvente utilizado en la etapa a), y, a continuación, con cualquier otro disolvente polar aprótico diferente al utilizado en la etapa a).

5

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención junto con los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

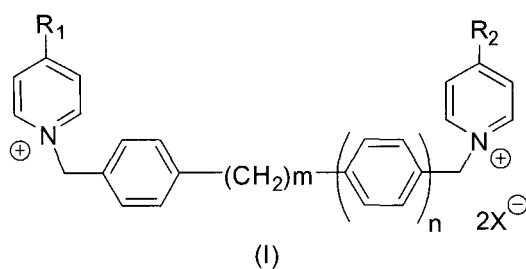
10 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a uso de los compuestos de la invención como inhibidores de ChoK.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para su uso como un medicamento.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El primer aspecto de la invención se refiere a los compuestos que responden a la fórmula general (I):



20

donde,

m puede ser 0, 1, 2, 3 ó 4;

n puede ser 0 ó 1;

X⁻ representa la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente apropiado;

25

R₁ y R₂ representan un grupo -NR'R'', donde R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido o, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un grupo heterocíclico de 5 a 6 miembros; con la condición de que R₁ y R₂ sean diferentes entre sí.

Preferentemente X⁻ representa Cl⁻, Br⁻, F⁻ o I⁻.

Particularmente estos compuestos se seleccionan del grupo consistente en:

- 5 • Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]bencil} piridinio;
- Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil} bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenetil} bencil)piridinio;
- 10 • Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil} butil)bencil]piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil] bencil}piridinio;
- 15 • Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil] fenil}bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil] fenetil}bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il) metil]fenil}butil)bencil]piridinio;
- 20 • Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil] bencil}piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il) metil]fenil}bencil)piridinio;
- 25 • Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il) metil]fenetil}bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il) metil]fenil}butil)bencil]piridinio.

- 30 Como se ha dicho un segundo aspecto de la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente. Preferentemente el disolvente utilizado en el paso a) es butanona. Preferentemente el disolvente empleado en el paso d) es acetato de etilo y éter etílico.

Los compuestos objeto de la invención muestran actividad biológica como inhibidores de la enzima ChoK humana, como agentes antiproliferativos en la línea tumoral de carcinoma de cérvix humano HeLa y agentes antimaláricos frente a *P. falciparum* en eritrocitos infectados. A su vez, presentan capacidad de inducir apoptosis y detener el ciclo celular en células tumorales HeLa.

Por lo tanto preferentemente la presente invención se refiere a los compuestos de la invención para su uso en el tratamiento de la malaria, más preferentemente frente a *P. falciparum*. Igualmente se refiere a los compuestos de la invención para su uso en el tratamiento del carcinoma cérvix humano, más preferentemente carcinoma de cérvix Humano HeLa. Igualmente la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en el tratamiento de infecciones parasitarias, preferentemente malaria y más preferentemente frente a *P. falciparum*, y para su uso en el tratamiento de tumores preferentemente cérvix humano, y mas preferentemente carcinoma de cérvix humano HeLa.

Igualmente la invención se refiere al uso de los compuestos de la invención, en la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de tumores. Más preferentemente destinado al tratamiento de cáncer de cérvix humano, y particularmente frente a la línea tumoral de cáncer de cérvix humano HeLa.

Por último la invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades parasitarias. Preferentemente para el tratamiento de malaria, particularmente, malaria causada por *P. falciparum*

EJEMPLOS DE LA INVENCION

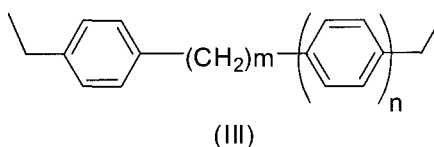
El procedimiento de preparación de los compuestos que responden a la fórmula general (I) comprende los siguientes pasos:

30

- Síntesis de los espaciadores dibromados.

Se entiende por grupo espaciador (III) cualquier estructura orgánica divalente que actúe como nexo de unión entre los dos grupos de piridinio presentes en la estructura definida por la fórmula general (I):

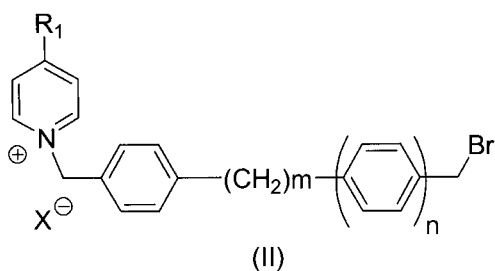
35



En un aspecto particular de la invención el compuesto 1,4-bis(bromometil)benceno (III, n=0, m=0) es asequible comercialmente (Sigma-Aldrich ®) mientras que 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (III, n=1, m=0), 4,4'-bis(bromometil)bibencilo (III, n=1, m=2) y 1,4-bis[4-(bromometil)fenil]butano (III, n=1, m=4) se obtienen por medio de los métodos descritos previamente [Staab, H. A.; Haenel, M. *Chem. Ber.* 1973, 106, 2190-2202; Cram, D. J.; Steinberg, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 5691-5704].

10 - Síntesis de los productos intermedios.

La síntesis de los productos intermedios (II) se ha llevado a cabo mediante sustitución nucleofílica de uno de los bromos del espaciador (III) dibromado por un anillo de piridinio sustituido en posición 4 por una amina terciaria cíclica o acíclica (ver preparación de reactivos) siguiendo la metodología descrita previamente [Rubio-Ruiz, B.; Conejo-García, A.; Ríos-Marco, P.; Carrasco-Jiménez, M. P.; Segovia, J.; Marco, C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Entrena, A. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 50, 154-162].



20 R₁ representa un grupo -NR'R'', donde R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido o, junto con el átomo de N al que están unidos.

- Síntesis de los productos finales.

25 Una disolución del producto intermedio (II) y la correspondiente piridina 4-sustituida (preferentemente en relación molar 1:2) en un disolvente polar aprótico, preferentemente butanona, se calienta, preferentemente a 100 °C, en un tubo cerrado durante un tiempo de reacción de entre 24 y 168 horas, preferentemente 120 horas.

Transcurrido dicho tiempo, el producto biscatiónico precipitado, se filtra y se lava, primero, con el mismo disolvente de la reacción, y, a continuación, con cualquier otro disolvente polar aprótico distinto al utilizado, preferentemente acetato de etilo y éter etílico.

5

Actividad biológica de los compuestos objeto de la invención.

La enzima ChoK se ha obtenido de la fracción citosólica de células de hepatoma humano HepG2 siguiendo el método experimental descrito previamente [Jiménez-López, J.M.; Carrasco, M.P.; Segovia, J.L.; Marco, C. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 4649-4655]. Para el estudio de la actividad inhibitoria frente a ChoK humana se ha seguido el método experimental previamente publicado [ES 2 148 092 B1]. Estos ensayos se han realizado con los compuestos **BR-142, BR-154, BR-186, BR-198, BR-220, BR-190, BR-228, BR-240, BR-230, BR-184, BR-252 y BR-234**. Los resultados se expresan como la concentración (μM) necesaria para obtener un 50% de inhibición enzimática (CI_{50}) y se resumen en la tabla II.

15

Los estudios de actividad antiproliferativa se han llevado a cabo en la línea celular de carcinoma de cérvix humano HeLa empleando el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) o método del MTT siguiendo el protocolo descrito previamente [De Luna-Bertos, E.; Ramos-Torrecillas, J.; García-Martínez, O.; Díaz-Rodríguez, L.; Ruiz, C. *ScientificWorldJournal* 2012, 2012:834246]. Estos ensayos se han realizado con los compuestos **BR-142, BR-154, BR-186, BR-198, BR-220, BR-190, BR-228, BR-240, BR-230, BR-184, BR-252 y BR-234**. Los resultados se expresan como como la concentración (μM) necesaria para obtener un 50% de inhibición del crecimiento celular (CI_{50}) y se resumen en la tabla II.

20

25

Los estudios del ciclo celular y de inducción de apoptosis/necrosis se han realizado en la línea celular de carcinoma de cérvix humano HeLa empleando como técnica de análisis la citometría de flujo de acuerdo al método experimental descrito previamente [Omerod M.G (Ed). Oxford University Press, Oxford, UK. 2000]. Estos ensayos se han realizado con los compuestos **BR-154, BR-186, BR-198, BR-190, BR-228, BR-240, BR-252 y BR-234**. Los resultados se expresan en porcentaje de células distribuidas en las distintas fases del ciclo celular (estudio del ciclo celular) o en porcentaje de células apoptóticas, necróticas, apoptóticas tardías y sanas (estudio de inducción de


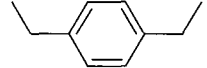
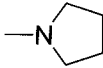

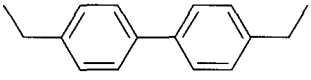
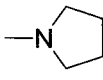

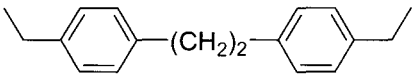
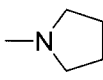

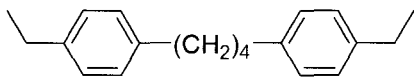
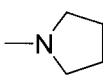
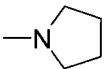
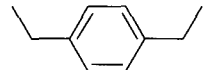
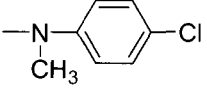
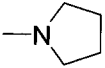
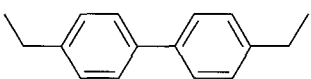
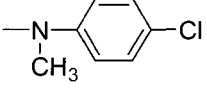
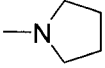
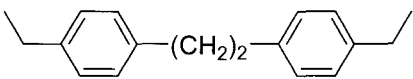
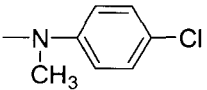
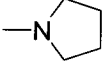
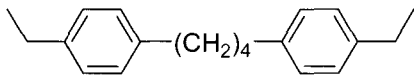
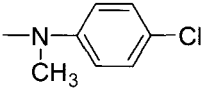

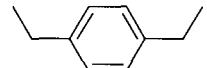
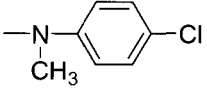

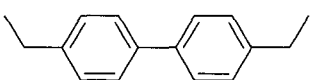
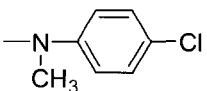

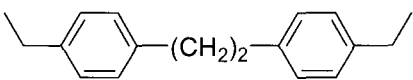
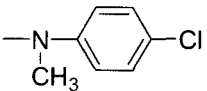

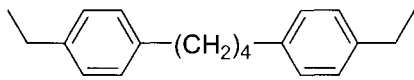
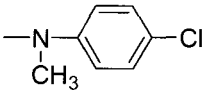
30

apoptosis/necrosis) tras el tratamiento con los compuestos y se resumen en las tablas III a V.

5 El ensayo de inhibición del crecimiento de *P. falciparum* en eritrocitos infectados se ha llevado a cabo según el método experimental previamente descrito [Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J. X.; Wilairat, P.; Riscoe, M. K. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48, 1803-1806]. Estos ensayos se han realizado con los compuestos **BR-142**, **BR-154**, **BR-186**, **BR-198**, **BR-220**, **BR-190**, **BR-228**, **BR-240**, **BR-230**, **BR-184**, **BR-252** y **BR-234**. Los resultados se expresan como la concentración (μM) necesaria para
10 obtener un 50% de inhibición del crecimiento parasitario (CI_{50}) y se resumen en la tabla II.

A título de ejemplo ilustrativo, pero no limitativo, se representan en la tabla I algunos de los compuestos objeto de esta invención.

Tabla I. Ejemplos de compuestos objeto de esta invención.

Código	R ₁	(III)	R ₂
BR-142			
BR-154			
BR-186			
BR-198			
BR-220			
BR-190			
BR-228			
BR-240			
BR-230			
BR-184			
BR-252			
BR-234			

Los ejemplos preparativos se proponen, a continuación, a modo ilustrativo u orientativo, sin que estos sean limitativos:

Ejemplo nº 1: Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]bencil}piridinio BR-142:

5

Sólido de color blanco (96.3 mg, 70%). P.f. 317 – 318 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.24 (d, J = 7.7, 2H, H-2,6_{py-R1}); 8.22 (d, J = 7.6, 2H, H-2,6_{py-R2}); 7.46 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}); 7.01 (d, J = 7.7, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.87 (d, J = 7.6, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.41 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 5.40 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 3.56 (t, J = 6.8, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.25 (s, 6H, CH₃); 2.12 (q, J = 6.8, 4H, H-3,4_{pirr}). ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 158.01 (C-4_{py-R1}); 155.18 (C-4_{py-R2}); 143.16 (C-2,6_{py-R1}); 143.07 (C-2,6_{py-R2}); 137.38 (C-1_{ph} o C-4_{ph}); 137.23 (C-4_{ph} o C-1_{ph}); 130.28 (C-2,6_{ph} o C-3,5_{ph}); 130.24 (C-3,5_{ph} o C-2,6_{ph}); 109.79 (C-3,5_{py-R2}); 109.21 (C-3,5_{py-R1}); 61.16 (CH₂N⁺_{R2}); 61.13 (CH₂N⁺_{R1}); 49.78 (C-2,5_{pirr}); 40.41 (CH₃); 26.12 (C-3,4_{pirr}). HRMS (m/e): Calculado para C₂₄H₃₀N₄Br (M – Br)⁺ 453.1654; encontrado 453.1652 (desviación -0.4 ppm).

10

15

Ejemplo nº 2: Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}bencil)piridinio BR-154:

20

Sólido de color blanco (44.9 mg, 68%). P.f. 277 – 278 °C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.47-8.44 (m, 4H, H-2,6_{py-R1}, H-2,6_{py-R2}); 7.71 (d, J = 8.2, 4H, H-3,5_{ph}, H-2',6'_{ph}); 7.51-7.49 (m, 4H, H-2,6_{ph}, H-3',5'_{ph}); 7.07 (d, J = 7.7, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.93 (d, J = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.46 (s, 4H, CH₂N⁺_{R1}, CH₂N⁺_{R2}); 3.49 (t, J = 6.5, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.18 (s, 6H, CH₃); 1.99 (q, J = 6.5, 4H, H-3,4_{pirr}). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.88 (C-4_{py-R1}); 153.03 (C-4_{py-R2}); 142.00 (C-2,6_{py-R1}, C-2,6_{py-R2}); 139.67 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 139.64 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 135.31 (C-1_{ph} o C-4'_{ph}); 135.22 (C-4'_{ph} o C-1_{ph}); 128.65 (C-2,6_{ph} o C-3',5'_{ph}); 128.59 (C-3',5'_{ph} o C-2,6_{ph}); 127.32 (C-3,5_{ph}, C-2',6'_{ph}); 108.61 (C-3,5_{py-R2}); 108.01 (C-3,5_{py-R1}); 59.00 (CH₂N⁺_{R2}); 58.93 (CH₂N⁺_{R1}); 48.34 (C-2,5_{pirr}); 39.78 (CH₃); 24.63 (C-3,4_{pirr}). HRMS (m/e): Calculado para C₃₀H₃₄N₄Br (M – Br)⁺ 529.1967; encontrado 529.1957 (desviación -1.9 ppm).

25

30

Ejemplo nº 3: Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenetil}bencil)piridinio BR-186:

35

Sólido de color blanco (48.9 mg, 68%). P.f. 279 – 282 °C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.39-8.36 (m, 4H, H-2,6_{py-R1}, H-2,6_{py-R2}); 7.33-7.27 (m, 8H, H-2,6_{ph}, H-3',5'_{ph}, H-3,5_{ph}, H-2',6'_{ph}); 7.04 (d, J = 7.6, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.89 (d, J = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.35

(s, 4H, CH₂N⁺_{R1}, CH₂N⁺_{R2}); 3.48 (t, *J* = 6.6, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.17 (s, 6H, CH₃); 2.84 (m, 4H, CH₂-CH₂); 1.99 (q, *J* = 6.6, 4H, H-3,4_{pirr}). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.86 (C-4_{py-R1}); 153.01 (C-4_{py-R2}); 142.08 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 142.06 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 141.91 (C-2,6_{py-R1}, C-2,6_{py-R2}); 133.36 (C-1_{ph} o C-4'_{ph}); 133.27 (C-4'_{ph} o C-1_{ph}); 128.94 (C-3,5_{ph}, C-2',6'_{ph}); 128.03 (C-2,6_{ph} o C-3',5'_{ph}); 127.98 (C-3',5'_{ph} o C-2,6_{ph}); 108.53 (C-3,5_{py-R2}); 107.94 (C-3,5_{py-R1}); 59.23 (CH₂N⁺_{R2}); 59.16 (CH₂N⁺_{R1}); 48.27 (C-2,5_{pirr}); 39.75 (CH₃); 36.39 (CH₂-CH₂); 24.64 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₂H₃₈N₄Br (M - Br)⁺ 557.2278; encontrado 557.2280 (desviación 0.4 ppm).

10 **Ejemplo nº 4: Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)bencil]piridinio BR-198:**

Sólido de color marrón claro (23.8 mg, 50%). **P.f.** > 350 °C (gel a 102 °C; espuma a 144 °C). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.40-8.37(m, 4H, H-2,6_{py-R1}, H-2,6_{py-R2}); 7.31-7.28 (m, 4H, H-2,6_{ph}, H-3',5'_{ph}); 7.21 (d, *J* = 8.0, 4H, H-3,5_{ph}, H-2',6'_{ph}); 7.04 (d, *J* = 7.7, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.89 (d, *J* = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.35 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 5.34 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 3.48 (t, *J* = 6.7, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.18 (s, 6H, CH₃); 2.58 (t, *J* = 6.7, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 1.99 (q, *J* = 6.7, 4H, H-3,4_{pirr}); 1.54 (q, *J* = 6.7, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.84 (C-4_{py-R1}); 152.99 (C-4_{py-R2}); 142.80 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 142.77 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 141.90 (C-2,6_{py-R1}, C-2,6_{py-R2}); 133.11 (C-1_{ph} o C-4'_{ph}); 133.02 (C-4'_{ph} o C-1_{ph}); 128.83 (C-3,5_{ph}, C-2',6'_{ph}); 127.94 (C-2,6_{ph} o C-3',5'_{ph}); 127.89 (C-3',5'_{ph} o C-2,6_{ph}); 108.50 (C-3,5_{py-R2}); 107.91 (C-3,5_{py-R1}); 59.21 (CH₂N⁺_{R2}); 59.14 (CH₂N⁺_{R1}); 48.27 (C-2,5_{pirr}); 39.72 (CH₃); 34.47 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 30.44 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 24.60 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₄H₄₂N₄Br (M - Br)⁺ 585.2593; encontrado 585.2600 (desviación 1.2 ppm).

25

Ejemplo nº 5: Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]bencil]piridinio BR-220:

Sólido de color blanco (95.6 mg, 89%). **P.f.** > 350 °C (gel a 286 °C; espuma a 292 °C). ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8.30 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.20 (d, *J* = 7.4, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.47 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}); 7.37 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 6.92 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 6.86 (d, *J* = 7.4, 2H, H-3,5_{py-R1}); 5.45 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.39 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.56 (t, *J* = 6.8, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.53 (s, 3H, CH₃); 2.12 (q, *J* = 6.8, 4H, H-3,4_{pirr}). ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 158.56 (C-4_{py-R2}); 155.20 (C-4_{py-R1}); 143.92 (C-2,6_{py-R2}); 143.38 (C-1_{anil-R2}); 143.07 (C-2,6_{py-R1}); 137.51 (C-4_{ph}); 136.95 (C-1_{ph}); 135.80 (C-4_{anil-R2}); 132.12 (C-3,5_{anil-R2}); 130.40 (C-2,6_{ph}); 130.28 (C-3,5_{ph});

35

129.37 (C-2,6_{anil-R2}); 110.54 (C-3,5_{py-R2}); 109.80 (C-3,5_{py-R1}); 61.59 (CH₂N⁺_{R2}); 61.16 (CH₂N⁺_{R1}); 49.79 (C-2,5_{pirr}); 41.40 (CH₃); 26.12 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₂₉H₃₁N₄ClBr (M – Br)⁺ 549.1421; encontrado 549.1411 (desviación -1.8 ppm).

5 **Ejemplo n° 6: Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}bencil)piridinio BR-190:**

Sólido de color marrón claro (59.9 mg, 71%). **P.f.** 110 – 114 °C. **¹H-RMN** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.53 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.47 (d, *J* = 7.2, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.71 (dd, *J* = 8.3, 2.3, 4H, H-2',6'_{ph}, H-3,5_{ph}); 7.64 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.53-7.50 (m, 4H, H-3',5'_{ph}, H-2,6_{ph}); 7.46 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 6.99 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 6.93 (d, *J* = 7.2, 2H, H-3,5_{py-R1}); 5.53 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.47 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.49 (t, *J* = 6.5, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.46 (s, 3H, CH₃); 1.99 (q, *J* = 6.5, 4H, H-3,4_{pirr}). **¹³C-RMN** (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.30 (C-4_{py-R2}); 153.02 (C-4_{py-R1}); 142.79 (C-2,6_{py-R2}); 142.10 (C-1_{anil-R2}); 142.00 (C-2,6_{py-R1}); 139.77 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 139.59 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 135.35 (C-4'_{ph}); 134.94 (C-1_{ph}); 132.86 (C-4_{anil-R2}); 130.59 (C-3,5_{anil-R2}); 128.79 (C-2,6_{ph}); 128.60 (C-3',5'_{ph}); 128.50 (C-2,6_{anil-R2}); 127.33 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 127.31 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 109.28 (C-3,5_{py-R2}); 108.60 (C-3,5_{py-R1}); 59.30 (CH₂N⁺_{R2}); 58.97 (CH₂N⁺_{R1}); 48.33 (C-2,5_{pirr}); 40.80 (CH₃); 24.62 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₅H₃₅N₄ClBr (M – Br)⁺ 625.1734; encontrado 625.1731 (desviación -0.5 ppm).

20

Ejemplo n° 7: Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenetil}bencil)piridinio BR-228:

Sólido de color blanco (77.3 mg, 70%). **P.f.** > 350 °C (gel a 129 °C; espuma a 151 °C). **¹H-RMN** (500 MHz, CD₃OD): δ 8.28 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.18 (d, *J* = 7.5, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.37 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.31-7.24 (m, 8H, H-2',3',5',6'_{ph}, H-2,3,5,6_{ph}); 6.93 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 6.86 (d, *J* = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R1}); 5.37 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.31 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.55 (t, *J* = 6.7, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.52 (s, 3H, CH₃); 2.91 (m, 4H, CH₂-CH₂); 2.12 (q, *J* = 6.7, 4H, H-3,4_{pirr}). **¹³C-RMN** (125 MHz, CD₃OD): δ 158.52 (C-4_{py-R2}); 155.20 (C-4_{py-R1}); 144.32 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 144.11 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 143.79 (C-2,6_{py-R2}); 143.44 (C-1_{anil-R2}); 142.97 (C-2,6_{py-R1}); 135.75 (C-4_{anil-R2}); 133.85 (C-4'_{ph}); 133.48 (C-1_{ph}); 132.11 (C-3,5_{anil-R2}); 130.59 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 130.53 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 129.55 (C-2,6_{ph}); 129.39 (C-3',5'_{ph}, C-2,6_{anil-R2}); 110.47 (C-3,5_{py-R2}); 109.68 (C-3,5_{py-R1}); 62.03 (CH₂N⁺_{R2}); 61.61 (CH₂N⁺_{R1}); 49.74 (C-2,5_{pirr}); 41.37 (CH₃); 38.29 (CH₂-CH₂); 26.12 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₇H₃₉N₄ClBr (M – Br)⁺ 653.2047; encontrado 653.2046 (desviación -0.2 ppm).

35

Ejemplo n° 8: Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)encil]piridinio BR-240:

Sólido de color marrón claro (33.5 mg, 60%). P.f. > 350 °C (espuma a 109 °C). ¹H-

- 5 **RMN** (600 MHz, CD₃OD): δ 8.28 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.18 (d, *J* = 7.5, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.36 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.31-7.27 (m, 4H, H-3',5'_{ph}, H-2,6_{ph}); 7.23 (d, *J* = 6.3, 4H, H-2',6'_{ph}, H-3,5_{ph}); 6.93 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 6.85 (d, *J* = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R1}); 5.37 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.31 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.55 (t, *J* = 6.6, 4H, H-2,5_{pirr}); 3.52 (s, 3H, CH₃); 2.64 (t, *J* = 7.0, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 2.13-2.11 (m, 4H, H-3,4_{pirr}); 1.62 (q, *J* = 7, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C-RMN (150 MHz, CD₃OD): δ 158.49 (C-4_{py-R2}); 155.19 (C-4_{py-R1}); 145.33 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 145.13 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 143.83 (C-2,6_{py-R2}); 143.44 (C-1_{anil-R2}); 142.95 (C-2,6_{py-R1}); 135.73 (C-4_{anil-R2}); 133.58 (C-4'_{ph}); 133.22 (C-1_{ph}); 132.10 (C-3,5_{anil-R2}); 130.47 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 130.41 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 129.51 (C-2,6_{ph}); 129.39 (C-3',5'_{ph}); 129.35 (C-2,6_{anil-R2}); 110.38 (C-3,5_{py-R2}); 109.66 (C-3,5_{py-R1}); 62.06 (CH₂N⁺_{R2}); 61.64 (CH₂N⁺_{R1}); 49.71 (C-2,5_{pirr}); 41.34 (CH₃); 36.30 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 32.10 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 26.13 (C-3,4_{pirr}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₉H₄₃N₄ClBr (M - Br)⁺ 681.2360; encontrado 681.2363 (desviación 0.4 ppm).

20 **Ejemplo n° 9: Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]encil}piridinio BR-230:**

Sólido de color blanco (95.4 mg, 81%). P.f. > 350 °C (gel a 314 °C; espuma a 333 °C).

- ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8.29 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.23 (d, *J* = 7.0, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.3, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.47 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}); 7.37 (d, *J* = 8.3, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.01 (d, *J* = 7.0, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.92 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.45 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.40 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.53 (s, 3H, CH_{3-R2}); 3.25 (s, 6H, CH_{3-R1}). ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 158.56 (C-4_{py-R2}); 158.05 (C-4_{py-R1}); 143.91 (C-2,6_{py-R2}); 143.38 (C-1_{anil-R2}); 143.16 (C-2,6_{py-R1}); 137.40 (C-4_{ph}); 136.98 (C-1_{ph}); 135.79 (C-4_{anil-R2}); 132.12 (C-3,5_{anil-R2}); 130.42 (C-2,6_{ph}); 130.32 (C-3,5_{ph}); 129.37 (C-2,6_{anil-R2}); 110.55 (C-3,5_{py-R2}); 109.21 (C-3,5_{py-R1}); 61.58 (CH₂N⁺_{R2}); 61.13 (CH₂N⁺_{R1}); 41.41 (CH_{3-R2}); 40.40 (CH_{3-R1}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₂₇H₂₉N₄ClBr (M - Br)⁺ 523.1264; encontrado 523.1262 (desviación -0.4 ppm).

35 **Ejemplo n° 10: Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenil}encil)piridinio BR-184:**

Sólido de color blanco (68.2 mg, 58%). **P.f.** 257 °C. **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.49 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.45 (d, *J* = 7.6, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.71 (dd, *J* = 8.2, 1.6, 4H, H-2',6'_{ph}, H-3,5_{ph}); 7.64 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.52-7.49 (m, 4H, H-3',5'_{ph}, H-2,6_{ph}); 7.45 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.07 (d, *J* = 7.6, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.98 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.51 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.45 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.46 (s, 3H, CH_{3-R2}); 3.18 (s, 6H, CH_{3-R1}). **¹³C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.34 (C-4_{py-R2}); 155.91 (C-4_{py-R1}); 142.83 (C-2,6_{py-R2}); 142.13 (C-1_{anil-R2}); 142.02 (C-2,6_{py-R1}); 139.80 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 139.66 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 135.26 (C-4'_{ph}); 134.94 (C-1_{ph}); 132.92 (C-4_{anil-R2}); 130.64 (C-3,5_{anil-R2}); 128.80 (C-2,6_{ph}); 128.66 (C-3',5'_{ph}); 128.53 (C-2,6_{anil-R2}); 127.37 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 127.36 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 109.32 (C-3,5_{py-R2}); 108.03 (C-3,5_{py-R1}); 59.42 (CH₂N⁺_{R2}); 59.00 (CH₂N⁺_{R1}); 40.81 (CH_{3-R2}); 39.79 (CH_{3-R1}). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₃H₃₃N₄ClBr (M – Br)⁺ 599.1577; encontrado 599.1578 (desviación 0.2 ppm).

Ejemplo nº 11: Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenetil}bencil)piridinio BR-252:

Sólido de color marrón claro (19.2 mg, 39%). **P.f.** 111 – 113 °C (espuma). **¹H-RMN** (500 MHz, CD₃OD): δ 8.28 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.20 (d, *J* = 7.5, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.7, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.37 (d, *J* = 8.7, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.33-7.21 (m, 8H, H-2',3',5',6'_{ph}, H-2,3,5,6_{ph}); 7.00 (d, *J* = 7.5, 2H, H-3,5_{py-R1}); 6.89 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.37 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.33 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.52 (s, 3H, CH_{3-R2}); 3.25 (s, 6H, CH_{3-R1}); 2.91 (m, 4H, CH₂-CH₂). **¹³C-RMN** (125 MHz, CD₃OD): δ 158.52 (C-4_{py-R2}); 158.03 (C-4_{py-R1}); 144.33 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 144.16 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 143.78 (C-2,6_{py-R2}); 143.44 (C-1_{anil-R2}); 143.05 (C-2,6_{py-R1}); 135.76 (C-4_{anil-R2}); 133.75 (C-4'_{ph}); 133.49 (C-1_{ph}); 132.11 (C-3,5_{anil-R2}); 130.59 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 130.54 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 129.55 (C-2,6_{ph}); 129.43 (C-3',5'_{ph}); 129.38 (C-2,6_{anil-R2}); 110.44 (C-3,5_{py-R2}); 109.10 (C-3,5_{py-R1}); 62.03 (CH₂N⁺_{R2}); 61.58 (CH₂N⁺_{R1}); 41.36 (CH_{3-R2}); 40.35 (CH_{3-R1}); 38.30 (CH₂-CH₂). **HRMS** (m/e): Calculado para C₃₅H₃₇N₄ClBr (M – Br)⁺ 627.1890; encontrado 627.1884 (desviación -1.0 ppm).

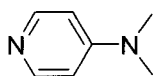
Ejemplo nº 12: Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)bencil]piridinio BR-234:

Sólido de color marrón claro (37.0 mg, 62%). **P.f.** > 350 °C (gel a 197 °C; espuma a 216 °C). **¹H-RMN** (600 MHz, CD₃OD): δ 8.28 (sa, 2H, H-2,6_{py-R2}); 8.21 (d, *J* = 7.7, 2H, H-2,6_{py-R1}); 7.59 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3,5_{anil-R2}); 7.37 (d, *J* = 8.6, 2H, H-2,6_{anil-R2}); 7.31-7.28 (m, 4H, H-3',5'_{ph}, H-2,6_{ph}); 7.23 (d, *J* = 7.9, 4H, H-2',6'_{ph}, H-3,5_{ph}); 7.00 (d, *J* = 7.7, 2H,

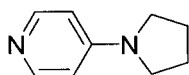
H-3,5_{py-R1}); 6.90 (sa, 2H, H-3,5_{py-R2}); 5.37 (s, 2H, CH₂N⁺_{R2}); 5.32 (s, 2H, CH₂N⁺_{R1}); 3.52 (s, 3H, CH_{3-R2}); 3.24 (s, 6H, CH_{3-R1}); 2.64 (t, $J = 6.6$, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 1.62 (q, $J = 6.6$, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C-RMN (150 MHz, CD₃OD): δ 158.49 (C-4_{py-R2}); 158.01 (C-4_{py-R1}); 145.32 (C-1'_{ph} o C-4_{ph}); 145.17 (C-4_{ph} o C-1'_{ph}); 143.77 (C-2,6_{py-R2}); 143.45 (C-1_{anil-R2}); 143.03 (C-2,6_{py-R1}); 135.72 (C-4_{anil-R2}); 133.48 (C-4'_{ph}); 133.22 (C-1_{ph}); 132.10 (C-3,5_{anil-R2}); 130.47 (C-2',6'_{ph} o C-3,5_{ph}); 130.43 (C-3,5_{ph} o C-2',6'_{ph}); 129.52 (C-2,6_{ph}); 129.40 (C-3',5'_{ph}, C-2,6_{anil-R2}); 109.09 (C-3,5_{py-R2}); 108.58 (C-3,5_{py-R1}); 62.06 (CH₂N⁺_{R2}); 61.60 (CH₂N⁺_{R1}); 41.35 (CH_{3-R2}); 40.35 (CH_{3-R1}); 36.30 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂); 32.09 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂). HRMS (m/e): Calculado para C₃₇H₄₁N₄ClBr (M - Br)⁺ 655.2203; encontrado 655.2202 (desviación -0.2 ppm).

Preparación de reactivos

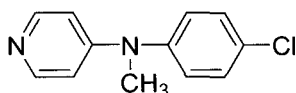
El compuesto 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina es comercial y suministrado por Sigma-Aldrich ®.



El compuesto 4-pirrolidinopiridina es comercial y suministrado por Sigma-Aldrich ®.



El compuesto 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)piridina se preparó siguiendo la metodología descrita en Conejo-García, A.; Campos, J.; Sanchez, R. M.; Rodríguez-Gonzalez, A.; Lacal, J. C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Eur. J. Med. Chem.* 2003, 38, 109-116.



La Tabla II indica, a título de ejemplo y no con carácter excluyente, los resultados obtenidos en los estudios de inhibición enzimática frente a ChoK humana, en los estudios antiproliferativos frente a la línea tumoral HeLa y en los estudios de inhibición

de crecimiento parasitario frente a *P. falciparum* de algunos de los compuestos objeto de esta invención.

5 **Tabla II.** Resultados obtenidos en los estudios de inhibición enzimática frente a ChoK humana, en los estudios antiproliferativos frente a la línea tumoral HeLa y en los estudios de inhibición de crecimiento parasitario frente a *P. falciparum*.

Código	Inhibición enzimática CI ₅₀ ChoK (μM)	Actividad antiproliferativa CI ₅₀ HeLa (μM)	Actividad antiparasitaria CI ₅₀ <i>P. falciparum</i> (μM)
BR-142	8.0	15.9	0.09
BR-154	0.8	3.7	0.003
BR-186	1.2	8.6	0.003
BR-198	0.9	2.1	0.002
BR-220	0.6	48.1	0.09
BR-190	2.2	4.1	0.04
BR-228	2.5	9.4	0.03
BR-240	1.5	2.1	0.03
BR-230	0.9	24.6	0.07
BR-184	1.5	11.7	0.007
BR-252	0.7	1.3	0.005
BR-234	1.2	1.9	0.04

10 Las Tablas III a V indican, a título de ejemplo y no con carácter excluyente, los resultados obtenidos en los estudios del ciclo celular e inducción de apoptosis/necrosis en la línea tumoral HeLa de algunos de los compuestos objeto de esta invención:

Tabla III. Resultados del estudio del ciclo celular en la línea tumoral HeLa.

Código	G0/G1	G2/M	S
Control	69.9 ± 2.41	3.9 ± 0.10	25.0 ± 2.53
BR-154	72.8 ± 3.28	2.7 ± 0.23*	24.5 ± 1.34
BR-186	72.5 ± 2.16	2.6 ± 1.00	24.9 ± 1.64
BR-198	77.8 ± 0.10*	2.8 ± 0.47*	19.2 ± 0.08*
BR-190	73.1 ± 2.80	3.1 ± 0.74	23.8 ± 3.04
BR-228	77.0 ± 3.38	2.2 ± 0.91	20.8 ± 2.50
BR-240	83.3 ± 0.94*	1.3 ± 0.13*	15.4 ± 0.98*
BR-252	83.3 ± 1.26*	1.8 ± 0.88*	14.9 ± 0.53*
BR-234	85.9 ± 0.19	0.9 ± 0.03	12.8 ± 0.38*

15

* p < 0.05

Tabla IV. Resultados de los estudios de inducción de apoptosis/necrosis en la línea tumoral HeLa de los compuestos **BR-154, BR-186, BR198 y BR-190.**

	Control	BR-154	BR-186	BR-198	BR-190
Necrosis	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.05	0.7 ± 0.05*	0.6 ± 0.26*
Ap. Tardía	1.9 ± 1.23	3.5 ± 0.30	3.9 ± 0.25	3.3 ± 0.28	2.5 ± 0.30
Negativo	84.8 ± 2.58	75.7 ± 0.60*	71.3 ± 1.15*	67.0 ± 0.17*	77.6 ± 1.40*
Apoptosis	12.9 ± 1.30	20.4 ± 0.75*	24.4 ± 0.95*	29.0 ± 0.37*	19.3 ± 1.83*

5

* p< 0.05

Tabla V. Resultados de los estudios de inducción de apoptosis/necrosis en la línea tumoral HeLa de los compuestos **BR-228, BR-240, BR-252 y BR-234.**

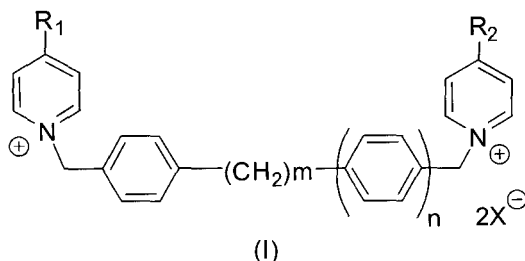
	Control	BR-228	BR-240	BR-252	BR-234
Necrosis	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.10*	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.07*	0.3 ± 0.10
Ap. Tardía	1.9 ± 1.23	2.5 ± 0.25	2.0 ± 0.52	4.0 ± 0.17	1.8 ± 0.30
Negativo	84.8 ± 2.58	80.0 ± 0.77*	62.8 ± 0.91*	50.8 ± 3.21*	44.2 ± 0.61*
Apoptosis	12.9 ± 1.30	17.1 ± 0.60*	34.9 ± 1.45*	45.0 ± 3.37*	53.8 ± 0.70*

10

* p< 0.05

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que representa la fórmula general (I):



5

donde,

m puede ser 0, 1, 2, 3 ó 4;

n puede ser 0 ó 1;

R_1 y R_2 representan un grupo $-NR'R''$, donde R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, cicloalquilo y arilo opcionalmente sustituido o, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un grupo heterocíclico de 5 a 6 miembros;

10

con la condición de que R_1 y R_2 sean diferentes entre sí, y

X^- representa la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente apropiado.

15

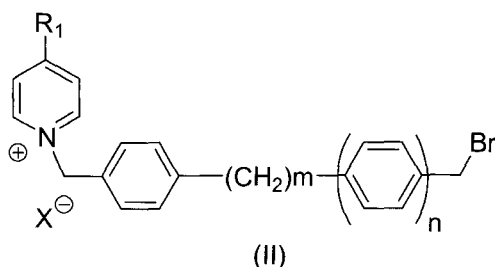
2. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo consistente en:

- Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]bencil} piridinio;
- 20 • Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil} bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenetil} bencil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(dimetilamino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil} butil)bencil]piridinio;
- 25 • Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil] bencil}piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-N-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil] fenil}bencil)piridinio;

- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}encil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-pirrolidinopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)encil]piridinio;
- 5 • Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]encil}piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenil}encil)piridinio;
- Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)encil)piridinio;
- 10 • Dibromuro de 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)-1-[4-(4-{4-[(4-dimetilaminopiridinio-1-il)metil]fenil}butil)encil]piridinio.

3. Procedimiento de preparación de compuestos de la fórmula general I que
15 comprende los siguientes pasos:

a) Preparación de una disolución del producto intermedio (II) y la correspondiente piridina 4-sustituida en un disolvente polar aprótico,



20 b) Calentamiento de la mezcla de reacción, a una temperatura comprendida entre 80°C y 120°C, en un tubo cerrado durante un tiempo de reacción comprendido entre 24 horas y 178 horas.

25 c) Obtención del producto precipitado mediante filtración en placa filtrante.

d) Purificación mediante lavado, en primer lugar, con el mismo disolvente utilizado en la etapa a), y, a continuación, con cualquier otro disolvente polar aprótico diferente al utilizado en la etapa a).

4. Procedimiento de preparación de compuestos de la fórmula general I según reivindicación anterior donde el disolvente utilizado en el paso a) es butanona.
- 5 5. Procedimiento de preparación de compuestos de la fórmula general I según reivindicación 3 en el que el disolvente empleado en el paso d) es acetato de etilo y éter etílico.
- 10 6. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 junto a los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 15 7. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso como medicamento.
- 15 8. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso en el tratamiento de tumores.
- 20 9. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades parasitarias.
- 20 10. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso en el tratamiento de la malaria.
- 25 11. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su uso en el tratamiento del carcinoma de cérvix humano.
- 30 12. Utilización de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 como inhibidores de la enzima ChoK.
- 30 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de enfermedades parasitarias.
- 35 14. Una composición farmacéutica según reivindicación 6 para su uso el tratamiento de tumores.

15. Uso de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la elaboración de un medicamento.
- 5 16. Uso de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de tumores.
- 10 17. Uso de los compuestos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer de cérvix humano, preferentemente frente a la línea tumoral de cáncer de cérvix humano HeLa.
- 15 18. Uso de los compuestos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades parasitarias.
19. Uso de los compuestos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de medicamentos destinado al tratamiento de malaria, más preferentemente, malaria causada por *P. falciparum*.



②① N.º solicitud: 201300033

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07D401/10** (2006.01)
A61K31/444 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005068429 A1 (CSIC y UNIV DE GRANADA) 28.07.2005, todo el documento.	1-19
A	B RUBIO-RUIZ et al., European Journal Medicinal Chemistry abril 2012, vol 50, págs 154-162. "Design, synthesis, theoretical calculations and biological evaluation of new non-symmetrical choline kinase inhibitors", todo el documento.	1-19
A	V GÓMEZ-PÉREZ et al., ChemMedChem abril 2012, vol 7, págs 663-669. "Novel 4-amino bis-pyridinium and bis-quinolinium derivatives as choline kinase inhibitors with antiproliferative activity against the human breast cancer SKBR-3 cell line", todo el documento.	1-19

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
28.05.2014

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/4

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

C07D, 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, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.05.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	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	WO 2005068429 A1 (CSIC y UNIV DE GRANADA)	28.07.2005
D02	B RUBIO-RUIZ et al, European Journal Medicinal Chemistry abril 2012, vol 50, págs 154-162. "Design, synthesis, theoretical calculations and biological evaluation of new non-symmetrical choline kinase inhibitors", todo el documento.	04.2012

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 solicitud son los compuestos de fórmula general (I) de la reivindicación 1 en los que los sustituyentes en los anillos de piridina son distintos entre sí, la reivindicación 2 concreta varios de estos compuestos y las reivindicaciones 3-5 procedimientos para su preparación. Las reivindicaciones 6-11, 13 y 14 se refieren a la composición farmacéutica que comprende uno de estos productos y las reivindicaciones 12 y 15-19 a su utilización como inhibidores no simétricos de la enzima colina quinasa.

El documento D1 divulga, ver reivindicaciones 1 y 6 de D1, derivados de 4-amino bis piridinio en los que los sustituyentes en los dos anillos de piridina son iguales, el documento D2 divulga, ver figura 2 y esquema 1 de D2, derivados monocatiónicos cuya fórmula presenta un anillo de 4-amino piridina y en el otro extremo derivados heterocíclicos tales como purina. Los compuestos que se divulgan en D1 y D2 no se corresponden con los descritos en la solicitud, además éstos no se han encontrado divulgados con anterioridad, por lo que se deduce que son nuevos y, por tanto, el procedimiento para su obtención y su utilización. Por otra parte, la invención se considera inventiva pues un técnico en la materia no podría deducir la capacidad de inhibición de colina quinasa sin disponer de los datos experimentales correspondientes a los nuevos compuestos.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-19 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.