

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 544 542**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/4192** (2006.01)  
**A61K 31/7056** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**C07H 19/056** (2006.01)  
**C07D 249/06** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2012 E 12722749 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2699240**

(54) Título: **Derivados de la acadesina, productos y composiciones que los comprenden, sus utilizaciones terapéuticas y sus procedimientos de síntesis**

(30) Prioridad:

**18.04.2011 FR 1101204**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.09.2015**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS (33.3%)**  
Grand Château Parc Valrose, 28, Avenue Valrose  
06103 Nice Cedex 2, FR;  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (33.3%) y**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**BENHIDA, RACHID;**  
**AUBERGER, PATRICK;**  
**MALNUIT, VINCENT;**  
**DRIOWYA, MOHSINE;**  
**PUISSANT, ALEXANDRE y**  
**ROBERT, GUILLAUME**

(74) Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 544 542 T3**

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

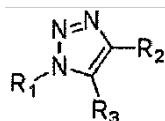
## DESCRIPCIÓN

Derivados de la acadesina, productos y composiciones que los comprenden, sus utilizaciones terapéuticas y sus procedimientos de síntesis.

- 5 La invención se refiere a derivados de la acadesina, denominada también AICAR por 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranósido, en el campo de la química del medicamento. Más particularmente, la invención se refiere a unos derivados de la acadesina para el tratamiento de los cánceres. Más particularmente aún, la invención se refiere a unos derivados de la acadesina para el tratamiento de las hemopatías mieloides tales como, en particular, la leucemia mieloide crónica (LMC).
- 10 Las hemopatías malignas mieloides se caracterizan por unas alteraciones de las propiedades de supervivencia, de proliferación o de diferenciación de las células de las líneas mieloides. Están provocadas por unas anomalías genéticas generalmente adquiridas que afectan las células madre hematopoyéticas o las progenitoras (células madre diferenciadas o "comprometidas") que participan en una vía particular de diferenciación. Estas hemopatías agrupan las leucemias agudas mieloblásticas (LAM), los síndromes mielodisplásicos (SMD) y los síndromes mieloproliferativos (SMP). La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo (SMP) maligno relacionado con una anomalía de las células madre leucémicas que conducen a una producción incrementada de granulocitos en todas las etapas de diferenciación. Está causada por un defecto citogenético adquirido que resulta de la translocación recíproca de material genético entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, la translocación (t9; 22) (q34-q11) o cromosoma Philadelphia. La consecuencia molecular de esta reorganización es la producción de una proteína quimérica p210BCR-ABL en más del 95% de los pacientes que padecen leucemia mieloide crónica (LMC).
- 15 20 25
- La BCR-ABL es una tirosina cinasa activada de manera constitutiva que explica la insensibilidad de las células madre de pacientes a la apoptosis espontánea o inducida. Estas características han hecho de BCR-ABL una diana farmacológica preferida para una intervención terapéutica en la leucemia mieloide crónica (LMC).
- 30 Se han registrado progresos innegables estos últimos años en el tratamiento de los cánceres. Los tratamientos son más precoces y los métodos de atención se han beneficiado de la aportación de nuevos productos farmacéuticos que son muy eficaces contra los tumores. Durante algunos años, el trasplante de médula y sobretodo la aparición de terapias dirigidas han permitido un mejor tratamiento de los pacientes. En efecto, uno de los avances significativos estos últimos años es la llegada al mercado de mesilato de imatinib (Glivec™).
- 35 40 45
- El Glivec™, formalmente mesilato de imatinib (IM), un inhibidor farmacológico de BCR-ABL, de c-KIT y del receptor del PDGF es por lo tanto, desde hace una decena de años, el tratamiento de referencia de la leucemia mieloide crónica (LMC). Es, actualmente, el prototipo de los inhibidores de tirosina cinasa (TK) utilizados en terapia anticancerosa. Sin embargo, un porcentaje significativo de los pacientes han desarrollado resistencias a este compuesto y esta proporción aumenta significativamente en fases aceleradas y agudas de la enfermedad. Los mecanismos subyacentes a estas resistencias son variados e incluyen unas mutaciones puntuales en el sitio de unión de ATP de BCR-ABL, incluyendo la mutación T315I, que genera unas resistencias múltiples y plantea un verdadero problema terapéutico, unas amplificaciones raras de BCR-ABL, unas alteraciones de las vías de señalización situadas por debajo de esta cinasa, como la activación de las SRC cinasas.
- 50 55
- El Glivec™ permite actualmente mejorar el pronóstico de la enfermedad y obtener unas remisiones completas en aproximadamente el 95% de los casos. La quimioterapia por Imatinib ha sustituido así progresivamente el trasplante como tratamiento de primera instancia, las indicaciones de trasplante se reservaron entonces para los pacientes en los que el imatinib ha fracasado.
- 60
- Sin embargo, ya que algunos pacientes no responden a este tratamiento o desarrollan una resistencia, particularmente cuando la enfermedad está en fase de transformación aguda, se evaluaron unas estrategias alternativas a la inhibición de BCR-ABL y que están destinadas a bloquear diferentes vías de señalización corriente abajo, incluyendo la inhibición de las SRC cinasas. Estas estrategias se mostraron eficaces y se evaluaron unos productos de sustitución, como el nilotinib, desarrollado por la compañía Novartis™, o el dasatinib (Sprycel™), desarrollado por la compañía Bristol-Meyers Squibb™. El Sprycel™ es actualmente prescrito a los pacientes resistentes al Glivec™.
- 65
- Sin embargo, algunos pacientes, en particular aquellos portadores de la mutación T315I en el sitio de unión de ATP de p210BCR-ABL, son refractarios a la casi totalidad de los inhibidores de tirosina cinasa (TK), utilizados en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). Existe por lo tanto una verdadera necesidad de estrategias terapéuticas alternativas, en particular, para todos los pacientes que presentan la mutación T315I o unas resistencias bajo BCR-ABL.
- 65
- La acadesina o 5-aminomidazol-carboxamida ribósido (AICAR) es un nucleósido dotado de un gran número de efectos metabólicos, se describe en particular como un activador de la proteína cinasa AMP-activada (AMPK). Este principio activo está actualmente en ensayo clínico de fase III para la reducción de los riesgos de complicaciones

cardio o cerebrovasculares durante una cirugía de puenteo coronario. Por otro lado, un estudio reciente muestra que este compuesto induce la apoptosis de células B de leucemia linfocitaria crónica (Campàs *et al.*, 2003), hemopatía para la cual está en estudio de fase I/II.

- 5 Existe por lo tanto actualmente la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que propongan una alternativa a los productos existentes o en desarrollo, con el fin de permitir en particular el tratamiento de pacientes resistentes a las terapias existentes, en particular a los pacientes resistentes a los tratamientos de tipo Inhibidores de Tirosina cinasa (ITK). Existe asimismo la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que permitan responder al problema del agotamiento terapéutico. El agotamiento terapéutico o taquifilaxia designa la disminución del efecto terapéutico después de un periodo de utilización de los medicamentos. Además, existe también la necesidad de desarrollar unos compuestos que tengan unos mecanismos de acción diferentes que permitan el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y, de manera más general, el tratamiento de ciertos cánceres. Finalmente, existe actualmente la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que presenten una citotoxicidad inferior a los compuestos actualmente disponibles.
- 10
- 15 La solución al problema planteado tiene por objeto unos compuestos de la fórmula general:



- 20 en la que:
- $R_1$  se selecciona de entre
    - un grupo pentosa cíclica en forma furánica con los grupos OH libres o eventualmente sustituidos con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato (o unos profármacos de estos), acetilo, isopropilideno, benzoilo o paratoluilo,
    - un grupo hexosa en forma piránica con los grupos OH libres o eventualmente sustituidos con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato (o unos profármacos de estos) o acetilo,
    - un grupo naftilo, eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o aminas sustituidas que tienen de 1 a 4 átomos de carbono,
    - un grupo bencilo eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o amina sustituidos que tienen de 1 a 4 átomos de carbono,
    - unos grupos fenilo, bifenilo, heteroarilo;

25

  - $R_2$  se selecciona de entre
    - un grupo amida  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHMe}$ ,  $-\text{CONHEt}$ ,  $-\text{CON}(\text{Me})_2$ ,  $-\text{CON}(\text{Et})_2$ ,
    - un grupo ácido o éster  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{CO}_2\text{Et}$ , un grupo ciano o amidina  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{NHMe})\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{NHEt})\text{NH}$ ,
    - un grupo fenilo eventualmente sustituido por un halógeno seleccionado de entre Cl, Br, I et F,
    - un grupo tiofeno,

30

  - $R_3$  se selecciona de entre
    - una cadena carbonada lineal o ramificado que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o
    - un grupo metoxinaftaleno; y

35

  - $R_3$  se selecciona de entre:
    - un grupo halógeno,
    - un grupo furano o  $-\text{CO-furano}$ ,
    - un grupo tiofeno o  $-\text{CO-tiofeno}$  o  $-\text{C}\equiv\text{C-tiofeno}$ ,

40

45

50

55

60

- un grupo toluoilo,
  - un grupo acetileno,
  - 5 • un grupo -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>, con n comprendido entre 2 y 9,
  - un grupo fenilo o -C≡C-fenilo, eventualmente sustituido con un halógeno,
  - 10 • un grupo -C≡C-CO<sub>2</sub>Me, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, -C≡C-CONH<sub>2</sub>,
  - un grupo -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, o
  - un grupo -C=C-2-metoxinaftaleno;
- 15 sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

De manera sorprendente, el solicitante ha podido poner en evidencia que los compuestos según la invención permiten disminuir la viabilidad de las líneas celulares leucémicas K562 sensibles a Imatinib y/o unas líneas celulares ImaR resistentes a Imatinib. Esto se demuestra en particular en los ejemplos 1 y 2.

Además, el solicitante ha podido poner en evidencia que los compuestos según la invención tienen una acción sobre diferentes tipos de muerte celular programada (PCD).

25 La PCD desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del buen funcionamiento de cualquier organismo vivo, ya que ello le permite eliminar las células que ya no necesita.

30 Se conocen dos tipos principales de PCD: la PCD de tipo I denominada también apoptosis, y la PCD de tipo II, denominada también autofagia.

35 Las caspasas (proteasas de cisteína) son los actores principales de la apoptosis. Escinden diversos sustratos proteicos esenciales para la supervivencia celular. Dos vías principales conducen a su activación. La vía intrínseca está orquestada por las proteínas de la familia Bcl-2 y desencadenada por la liberación de citocromo C por la mitocondria seguida de la formación de un complejo multiproteico (apoptosoma) en el origen de la activación de las caspasas 9 y después 3. La vía extrínseca se activa, por su parte, a nivel de la membrana plásrica por la activación de receptores membranarios, seguida de la formación de un complejo multiproteico (DISC) que permite la activación de las caspasas 8 y después 3 (Grutter, 2000).

40 La autofagia puede conducir bien a la supervivencia, o bien a la muerte celular. Su etapa inicial es la formación de vacuolas de doble membrana (los autofagosomas procedentes de la nucleación, la elongación y la maduración de un fagóforo) que atrapan una porción de citosol y las macromoléculas y organitos a eliminar. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para formar unos autofagolisosomas, en los que las hidrolasas lisosomales (las catepsinas) degradan su contenido. La formación de la autofagosoma depende del reclutamiento de proteínas Atg y de las proteínas LC3-II y p62/SQSTM1 (Klionsky *et al.*, 2008; Marino y Lopez-Otin, 2004). La vía mTOR interviene en su regulación. En efecto, mTOR activada inhibe la autofagia, mientras que su inhibición por AMPK inicia este proceso.

50 Como se demuestra en el ejemplo 1, los compuestos según la invención permiten actuar sobre los dos tipos de muertes celulares programadas (PCD por Programmed cell Death) expuestas anteriormente. Más precisamente, los mecanismos de acciones implicados por los compuestos según la invención son o bien la autofagia, o bien la apoptosis, o bien una combinación de los dos tipos de estos mecanismos. Esto se demuestra en el ejemplo 1.

55 El documento titulado "Acadesine Kills Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Cells through PKC-Dependent Induction of Autophagic Cell Death" (Robert G *et al.*, PLoS ONE, noviembre de 2009, volumen 4, Issue 11) describe en particular que la acadesina es eficaz en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC), y que actúa sobre la muerte celular programada de tipo II, es decir mediante un mecanismo de autofagia. Sin embargo, este documento no divulga ningún derivado de acadesina, ni su actividad eventual en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC).

60 El documento titulado "Tandem Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition/Electrophilic Addition: A concise Three-Component Route to 4,5-Disubstituted Triazolyl-Nucleosides" (Malnuit V *et al.*, Synlett 2009, Nº 13, p. 2123-2128) no describe los compuestos según la invención a título de medicamento. Este documento describe la síntesis de derivados de acadesina, que tiene una fórmula general diferente de la de los compuestos según la invención. Además, incluso si este documento sugiere que estos compuestos podrían tener unas propiedades biológicas interesantes, no hay nada en este documento que sugiera que este tipo de compuestos pueda tener una indicación

a título de medicamento y, más particularmente, en el tratamiento del cáncer, como por ejemplo de la leucemia mieloide crónica (LMC).

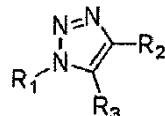
La presente invención tiene también por segundo objeto un producto farmacéutico que contiene un compuesto según la invención y por lo menos un segundo principio activo como producto de combinación para una administración simultánea, separada o escalonada en el tiempo, para su utilización en el tratamiento del cáncer.

Tiene asimismo como tercer objeto una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

La invención se entenderá mejor a partir de la descripción no limitativa siguiente, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- las figuras 1 a 20 representan los resultados de estudios que tienen como objetivo cribar unos compuestos según la invención para determinar su eficacia y los mecanismos generales de acciones de algunos de estos compuestos.
- las figuras 21 a 23 presentan los resultados de estudios de cribado y de dosis-respuesta de compuestos según la invención en líneas LMC (leucemia mieloide crónica) sensibles (K562) a Imatinib.

Los compuestos según la invención son unos compuestos de la fórmula general:



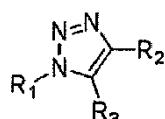
en la que:

- $R_1$  se selecciona de entre
  - un grupo pentosa cíclica en forma furánica con los grupos OH libres o eventualmente sustituido con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato (o unos profármacos de estos), acetilo, isopropilideno, benzoilo o paratoluilo,
  - un grupo hexosa en forma piránica con los grupos OH libres o eventualmente sustituidos con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato (o unos profármacos de estos) o acetilo,
  - un grupo naftilo, eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o aminas sustituidas que tienen de 1 a 4 átomos de carbono,
  - un grupo bencilo eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o amina sustituidos que tienen de 1 a 4 átomos de carbono,
  - unos grupos fenilo, bifenilo, heteroarilo;
- $R_2$  se selecciona de entre
  - un grupo amida  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHMe}$ ,  $-\text{CONHEt}$ ,  $-\text{CON}(\text{Me})_2$ ,  $-\text{CON}(\text{Et})_2$ ,
  - un grupo ácido o éster  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{CO}_2\text{Et}$ , un grupo ciano o amidina  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{NHMe})\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{NHEt})\text{NH}$ ,
  - un grupo fenilo eventualmente sustituido por un halógeno seleccionado de entre Cl, Br, I et F,
  - un grupo tiofeno,
  - una cadena carbonada lineal o ramificada que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o
  - un grupo metoxinaftaleno; y
- $R_3$  se selecciona de entre:
  - un grupo halógeno,

- un grupo furano o -CO-furano,
  - un grupo tiofeno o -CO-tiofeno o -C≡C-tiofeno,
  - 5       • un grupo toluoilo,
  - un grupo acetileno,
  - 10      • un grupo -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>, con n comprendido entre 2 y 9,
  - un grupo fenilo o -C≡C-fenilo, eventualmente sustituido con un halógeno,
  - 15      • un grupo -C≡C-CO<sub>2</sub>Me, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, -C≡C-CONH<sub>2</sub>,
  - un grupo -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, o
  - un grupo -C=C-2-metoxinaftaleno;
- 20      sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

25      Las sales farmacéuticamente aceptables son unas sales de adición con unos ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, sulfato, fosfato, difosfato y nitrato o con unos ácidos orgánicos tales como acetato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato y esteárate. Entran también en el campo de la presente invención, cuando son utilizables, las sales formadas a partir de bases tales como el hidróxido de sodio o de potasio.

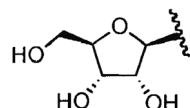
Preferentemente, los compuestos según la invención son unos compuestos de la fórmula general:



30

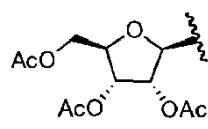
en la que:

35      R<sub>1</sub> se selecciona de entre



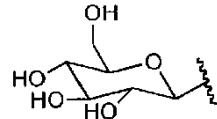
$\beta$ -D-ribosa

40      o



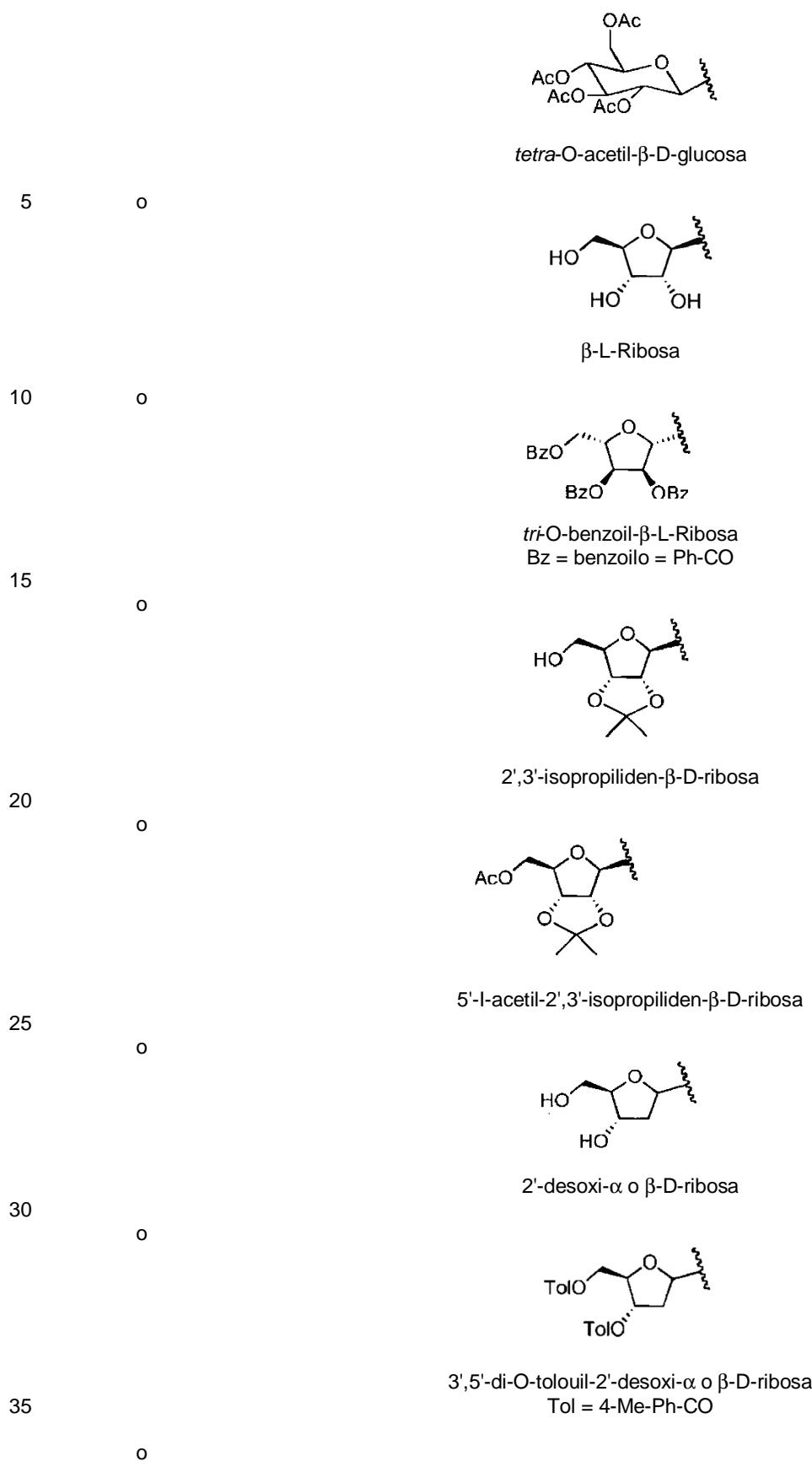
tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribosa

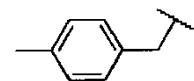
45      o



$\beta$ -D-glucosa

50      o

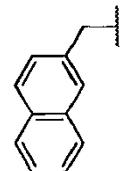




4-metilbencilo

5

o



2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)

10

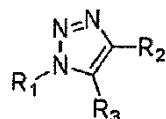
- $R_2$  se selecciona de entre  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $-\text{CO}_2\text{Et}$ , fenilo, tiofeno,  $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ , p-fluoro-fenilo o el 2-metoxinaftaleno; y
- $R_3$  se selecciona de entre I, Cl, furano, CO-furano, CO-tiofeno, acetileno, CO- $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ , toluoilo,  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CO}_2\text{Et}$ , tiofeno, fenilo,  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{fenilo}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{tiofeno}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{p-fluoro-fenil})$ , o  $-\text{C}\equiv\text{C}-2$ -metoxinaftaleno;

15

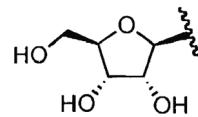
sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

20

Más preferentemente, los compuestos según la invención son unos compuestos de fórmula general:



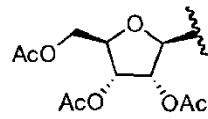
en los que  $R_1$  es



25

 $\beta$ -D-ribosa

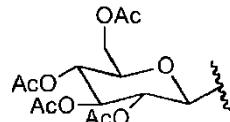
o



30

tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribosa

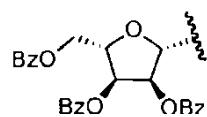
o



35

tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucosa

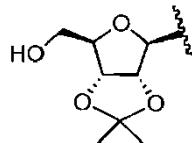
o



40

*tri-O-benzoil- $\beta$ -L-Ribosa  
Bz = benzoilo = Ph-CO*

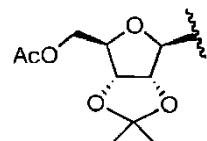
o



5

*2',3'-isopropiliden- $\beta$ -D-ribosa*

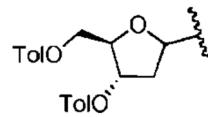
o



10

*5'-O-acetil-2',3'-isopropiliden- $\beta$ -D-ribosa*

o

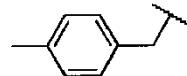


15

*3',5'-di-O-toluuil-2'-desoxi- $\alpha$  o  $\beta$ -D-ribosa  
Tol = 4-Me-Ph-CO*

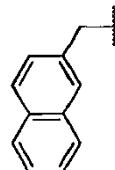
20

o

*4-metilbencilo*

25

o

*2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)*

30

y

- cuando R1 es un grupo  $\beta$ -D-ribosa, entonces:

35

- R2= CONH<sub>2</sub> y R3 = I, Cl, CO-Furano, CO-tiofeno, toluoilo o acetileno; o
- R2 = CO<sub>2</sub>Me y R3 = I, furano o acetileno; o
- R2 = fenilo y R3 = I;

40

- cuando R1 es un grupo tri-O-acetyl-  $\beta$ -D-ribosa, entonces:

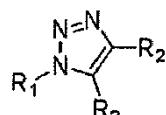
45

- R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = Cl, CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>, CO-furano, toluoilo, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, tiofeno o fenilo; o
- R2= fenilo y R3 = -C≡C-fenilo; o
- R2 = tiofeno y R3 = -C=C-tiofeno; o
- R2 = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> y R3 = -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; o
- R2 = p-fluoro-fenilo y R3 = -C≡C-p-fluoro-fenilo; o
- R2 = 2-metoxinaftaleno y

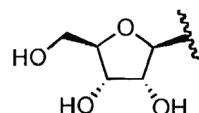
- R<sub>3</sub> = -C=C-2-metoxinaftaleno;
- cuando R<sub>1</sub> es un grupo tetra-O-acetil-β-D-glucosa, entonces R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub> = I o -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- cuando R<sub>1</sub> es un grupo tri-O-benzoyl-β-L-Ribosa, entonces R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub>= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- 5 - cuando R<sub>1</sub> es un grupo 2',3'-isopropiliden-β-D-ribosa, entonces R<sub>2</sub> = CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub>= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et o tiofeno;
- cuando R<sub>1</sub> = 5'-O-acetyl-2',3'-isopropiliden-β-D-ribosa, entonces R<sub>2</sub> = CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub>= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et o tiofeno;
- cuando R<sub>1</sub> es un grupo 3',5'-di-O-toluil-2'-desoxi-β-D-ribosa, entonces R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub>= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- cuando R<sub>1</sub> es un grupo 4-metilbencilo, entonces:
- 10 - R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub> = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o  
- R<sub>2</sub>= fenilo y R<sub>3</sub> = -C≡C-fenilo;
- cuando R<sub>1</sub> es un grupo 2-naftil (naftalen-2-ilmetil), entonces:
- 15 - R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub> = I; o  
- R<sub>2</sub>= CO<sub>2</sub>Et y R<sub>3</sub> = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o  
- R<sub>2</sub>= Fenilo y R<sub>3</sub> = -C≡C-fenilo;

20 sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

Más preferentemente, los compuestos según la invención son unos compuestos de la fórmula general:



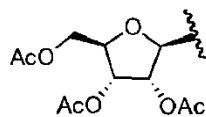
25 en las que R<sub>1</sub> es



β-D-ribosa

30

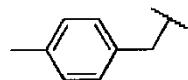
O



tri-O-acetyl-β-D-ribosa

35

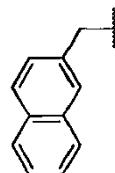
O



4-metilbencilo

40

O



2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)

45

y

- cuando R1 es un grupo  $\beta$ -D-ribosa, entonces:
    - R2 = CONH<sub>2</sub> y R3 = Cl, CO-furano, CO-tiofeno o toluoilo; o
    - R2 = CO<sub>2</sub>Me y R3 = I o acetileno; o
    - R2 = fenilo y R3 = I;
- 5
- cuando R1 es un grupo tri-O-acetyl-  $\beta$ -D-ribosa, entonces:
    - R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>, CO-furano, toluoilo, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, tiofeno o fenilo; o
    - R2 = fenilo y R3 = -C=C-fenilo; o
    - R2 = tiofeno y R3 = -C≡C-tiofeno; o
    - R2 = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> y R3 = -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; o
    - R2 = p-fluoro-fenilo y R3 = -C=C-p-fluoro-fenilo; o
    - R2 = 2-metoxinaftaleno, y
    - R3 = -C≡C-2-metoxinaftaleno;
- 10
- cuando R1 es un grupo 4-metilbencilo, entonces:
    - R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
    - R2 = fenilo y R3 = -C≡C-fenilo;
- 15
- cuando R1 es un grupo 2-naftilo (naftalen-2-il-metilo), entonces:
    - R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = I; o
    - R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
    - R2 = Fenilo y R3 = -C≡C-fenilo;
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.
- A título de ejemplos no limitativos de compuestos preferidos según la invención, se pueden mencionar los compuestos:
- 1'-(4-eticocarbonil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-carbamoil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-metoxicarbonil-5-etinil-[1,2,3]-triazol-1-il)- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1-(naftil-2-metil)-4-eticocarbonil-5-yodo-1,2,3-triazol;
  - 1-(naftil-2-metil)-4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolat-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -ribofuranosa;
  - 1-(4-metilbencil)-4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol;
  - 1'-(4-heptil-5-(non-1-in-1-il)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-benzoyl- $\beta$ -L-ribofuranosa;
  - 2'-desoxi-1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-3',5'-di-O-(p-toluoi)- $\alpha$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopiranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa; y
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O\*-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa.
- De manera particularmente ventajosa, los compuestos según la invención se seleccionan de entre:
- 55
- 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-  $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa; y
  - 1-(4-metilbencil)-4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol.
- 60
- Más preferentemente aún, los compuestos según la invención se seleccionan de entre:
- 65
- 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
  - 1-(4-metilbencil)-4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopiranosa;
  - 1'-(4-eticocarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa.

Los compuestos divulgados pueden también presentarse en forma de profármacos. Se entiende por profármaco una sustancia farmacológica (un medicamento) que se administra en forma inactiva (o mucho menos activa que su metabolito). Una vez administrado, el profármaco se metaboliza *in vivo* en un metabolito activo. Más particularmente, los profármacos pueden estar clasificados en dos categorías basadas en sus sitios de conversión en su forma activa definitiva.

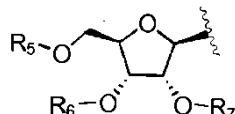
Los profármacos de tipo I son aquellos en los que la conversión es intracelular. Los profármacos de tipo II son aquellos que se convierten extracelularmente, en particular en los jugos digestivos o la circulación sistémica.

Los dos tipos pueden también estar subdivididos en subtipos A o B, basados en unos criterios suplementarios. Los de tipo IA y IB se distinguen por el sitio de activación, que es el sitio de acción terapéutica o no. Para el tipo IIA y IIB, se clasifican según si la conversión tiene lugar en el tracto gastro-intestinal o en la circulación sistémica.

Ventajosamente, los compuestos según la invención pueden comprender unos grupos que permiten aumentar su solubilidad, su penetración celular y su biodisponibilidad.

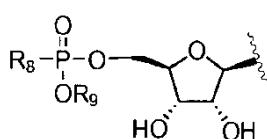
A título de ejemplos no limitativos de profármacos, se pueden citar:

- unos profármacos que contienen unos grupos R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> o R<sub>7</sub>, o una combinación de estos de tipo aminoácidos o análogos, sulfatos o fosfonios de la fórmula general siguiente:



en la que:

- R<sub>5</sub> es preferentemente un aminoácido, sulfonio o fosfonio;
- R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son preferentemente unos aminoácidos idénticos o diferentes tales como glicina, valina o leucina;
- unos profármacos de fosfato o monofosfatos como los fosforamidatos que contienen unos grupos R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, o una combinación de este tipo de aminoácido o análogos, aminas, alcoholes, o del tipo azufre de la fórmula general:

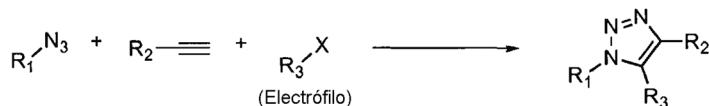


en la que:

- R<sub>8</sub> es preferentemente un aminoácido tal como alanina, leucina o valina o análogos de amina;
- R<sub>9</sub> es un fenilo o un análogo de fenilo tal como CH<sub>3</sub>Ph o CH<sub>3</sub>OPh.

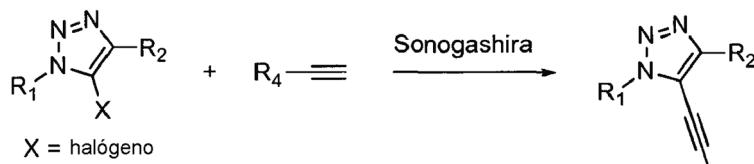
Los diferentes compuestos anteriormente descritos pueden ser sintetizados según los diferentes procedimientos descritos anteriormente. En estos procedimientos, los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son tales como se han definido anteriormente.

Según una primera alternativa, los compuestos de la invención se obtienen mediante una reacción en one-pot, en la que una azida (R<sub>1</sub>N<sub>3</sub>) reacciona con una alcina (R<sub>2</sub>-C≡C-H) y un electrófilo (R<sub>3</sub>-X, para el cual X= Br o I) en presencia de cobre (catalizador) para conducir a los productos tiazol trisustituidos, según el esquema de reacción siguiente:

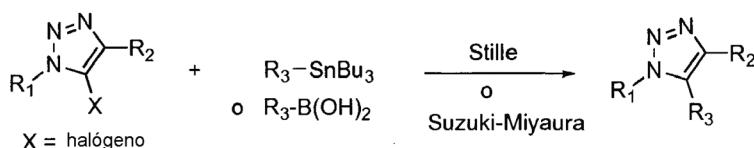


Según una segunda alternativa, los compuestos según la invención se obtienen por reacción de Sonogashira, en la que unos sustratos triazol (X = Br o I) se ponen a reaccionar en presencia de alquinos (R<sub>4</sub>-C≡C-H) y de un catalizador de paladio tal como por ejemplo Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> o Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Esta reacción permite obtener unos

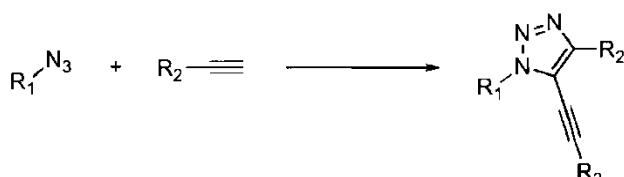
derivados 1,2,3-triazol 1,4,5-trisustituidos (que contienen R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y un grupo R<sub>4</sub>-C≡C-en posición 5 que entra en la definición de R<sub>3</sub> precisada anteriormente, para el cual R<sub>4</sub> = H, SiMe<sub>3</sub>, Ph, CO<sub>2</sub>Me, CO<sub>2</sub>Et), según el esquema de reacción siguiente:



- 5 Según una tercera alternativa, los compuestos según la invención se obtienen mediante una reacción de acoplamiento de paladio de tipo Stille (o Suzuki-Miyaura). Esta reacción permite acoplar un derivado estánico (R<sub>3</sub>-SnBu<sub>3</sub>) o un derivado de ácido borónico (R<sub>3</sub>-B(OH)<sub>2</sub>) con un 5-halo-triazol-1,4,5-trisustituido (X= Br o I) con el fin de obtener unos 1,2,3-triazol 1,4,5-trisustituidos que contienen en posición 5 un grupo R<sub>3</sub> (arilo o heteroarilo), según el esquema de reacción siguiente:
- 10



- 15 Según una cuarta alternativa, los compuestos según la invención se obtienen por reacción entre una azida (R<sub>1</sub>N<sub>3</sub>) y un alquino (R<sub>2</sub>-C≡C-H) en presencia de un catalizador a base de cobre y de un oxidante (tal como por ejemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta reacción permite la síntesis de los 1,2,3-triazol 1,4,5-trisustituidos (que contiene R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y el grupo R<sub>2</sub>-C≡C- en la posición 5 que entra en la definición de R<sub>3</sub> precisada anteriormente), según el esquema de reacción siguiente:
- 20



- Como se demuestra en el ejemplo 1, los compuestos según la invención permiten actuar sobre los dos tipos de muertes celulares programadas (PCD por Programmed cell Death) expuestas anteriormente. Entre las vías de señalizaciones utilizadas por los compuestos según la invención, parece que algunos compuestos permiten una inhibición de la vía mTOR.
- 25

- La proteína mTOP está en el centro de numerosos procesos metabólicos, tales como en particular la síntesis proteica, la progresión en G1, la supervivencia celular o también el citoesqueleto. Así, la vía de señalización que pasa por esta proteína está considerada actualmente como una nueva diana terapéutica de gran interés para el tratamiento de numerosos cánceres y enfermos metabólicos.
- 30

- A título de ejemplo no limitativo de enfermedades metabólicas para las cuales los compuestos según la invención aparecen adecuados, se puede citar la diabetes, los tumores sólidos en particular los carcinomas de cualquier origen que incluyen por ejemplo los tumores del colon, del pecho, de la próstata y los melanomas.
- 35

De manera preferida, los compuestos según la invención son adecuados para los tratamientos de los cánceres, es decir para unas aplicaciones en cancerología y/o en onco-hematología.

- 40 A título de ejemplos no limitativos de tratamientos para los cuales los compuestos son adecuados, se pueden citar el tratamiento de las hemopatías malignas tales como las leucemias crónicas (LMC, LLC), las leucemias agudas mieloblásticas (LAM), los síndromes mielodisplásicos (SMD) de alto riesgo, el mileoma múltiple, el tratamiento de las resistencias a imatinib y a los inhibidores de tirosina cinasa de segunda generación en el caso de la LMC y de Vidaza (5-Aza) en el caso de los síndromes mielodisplásicos (SMD). Los compuestos según la invención encuentran también unas aplicaciones para el tratamiento de los cánceres epiteliales y unas enfermedades metabólicas. Pueden también ser utilizados para evitar las resistencias a los otros medicamentos, en particular a Glivec™.
- 45

De manera particular, los compuestos según la invención son adecuados para el tratamiento:

- 50 - de los pacientes adultos y niños que padecen leucemia mieloide crónica (LMC) cromosoma Philadelphie (bcr-

- abl) positiva (Ph+) nuevamente diagnosticada cuando el trasplante de la médula ósea no se puede considerar como un tratamiento de primera instancia;
- de los pacientes adultos y niños que padecen LMC Ph+ en fase crónica después del fracaso del tratamiento por el interferón alfa, o en fase acelerada o en crisis blástica;
  - de los pacientes adultos que padecen leucemia aguda linfoide cromosoma Philadelphia positiva (LAL Ph+) nuevamente diagnosticada en asociación con la quimioterapia;
- de los pacientes adultos que padecen LAL Ph+ refractaria o en recaída en monoterapia;
- de los pacientes adultos que padecen síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMP) asociados a reorganizaciones del gen de PDGFR (platelet-derived growth factor receptor);
- de los pacientes adultos que padecen síndrome hipereosinofílico (SHE) en una fase avanzada y/o leucemia crónica eosinofílica (LCE) asociada a una reorganización de FIP1L1-PDGFR $\alpha$ ;
- de los pacientes adultos que padecen tumores estromales gastro-intestinales (GIST-gastrointestinal stromal tumours) malignos kit (CD 117) positivos no extirpables y/o metastásicos;
- de los pacientes adultos que presentan un riesgo significativo de recaída después de la eliminación de un tumor estromal gastrointestinal GIST Kit (CD117) positivo. Los pacientes que presentan un riesgo reducido o muy bajo no deben ser tratados; y
- de los pacientes adultos que padecen dermatofibrosarcomas protuberantes (DFSP o enfermedad de Darier-Ferand) no extirpables y pacientes adultos que padecen DFSP en recaída y/o metastásica que se tratan con un tratamiento quirúrgico.
- De manera ventajosa, los compuestos según la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de los cánceres, en particular los cánceres resistentes a los inhibidores de tirosina cinasas (ITK).
- De manera particularmente ventajosa, los compuestos según la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC), en particular las LMC que resisten a los inhibidores de tirosina cinasa (ITK) tales como por ejemplo Imatinib, Dasatinib y Nilotinib, habitualmente utilizados en el tratamiento de esta patología.
- Otro objeto de la invención se refiere a un producto farmacéutico que contiene un compuesto según la invención y por lo menos un segundo principio activo como producto de combinación para una administración simultánea, separada o escalonada en el tiempo, para su utilización en el tratamiento del cáncer.
- Ventajosamente, el segundo principio activo es un agente antitumoral, un agente antiinflamatorio, o un agente que disminuye los efectos secundarios relacionados con los compuestos según la invención.
- Preferentemente, el segundo principio activo es un compuesto antitumoral seleccionado de entre los agentes alquilantes, los antimetabolitos, los alcaloides vegetales, los inhibidores de la topoisomerasa y los antibióticos antitumorales.
- A título de ejemplo no limitativo de agente antitumoral utilizable según la invención, se pueden citar en particular el bortezomib, la cisplatina, la carboplatina, la ifosfamida, el clorambucil, el busulfán, la tiotepa, el 5-fluoro-uracilo (5FU), la fludarabina, el metotrexato, la vincristina, la vinblastina, la vinorelbina, el paclitaxel, el docetaxel, los derivados de la camptotecina, la amsacrina, las antraciclinas, los derivados de la epipodofilotoxina, la doxorubicina, la daunorubicina, la actinomicina D, la mitomicina C, la plicamicina y la bleomicina. Se pueden citar también los ITK utilizados en diferentes patologías tumorales como por ejemplo imatinib, Dasatinib, Nilotinib y Sunitinib. De manera alternativa, el producto de combinación según la invención comprende una asociación de un compuesto según la invención y de por lo menos dos otros agentes antitumorales, o por lo menos otros tres agentes antitumorales o más.
- Por utilización terapéutica simultánea, en el sentido de la presente invención, se entiende una administración de por lo menos dos principios activos por la misma vía y en el mismo momento o sustancialmente en el mismo momento.
- Por utilización terapéutica separada, en el sentido de la presente invención, se entiende en particular una administración de por lo menos dos principios activos en el mismo momento o sustancialmente en el mismo momento por unas vías diferentes.
- Por utilización terapéutica escalonada en el tiempo, se entiende una administración de por lo menos dos principios activos en momentos diferentes, siendo la vía de administración idéntica o diferente.

Más particularmente, se entiende un modo de administración según el cual el conjunto de la administración de uno de los principios activos se efectúa antes de que la administración del otro o de los otros empiece.

5 Se puede así administrar uno de los principios activos durante varios meses antes de administrar el otro o los otros principios activos. No existe un tratamiento simultáneo en este caso. Se puede también considerar una administración alterna de cada principio activo durante varias semanas.

10 Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable.

La vía de administración de la composición según la invención puede ser por vía oral, parenteral, tópica, ocular. Preferentemente, la composición farmacéutica está envasada en una forma conveniente para una aplicación por vía oral.

15 Así, por vía oral, la composición puede presentarse en forma de comprimidos, de cápsulas duras, de grageas, de jarabes, de suspensiones, de soluciones, de polvos, de gránulos, de emulsiones, de suspensiones de microesferas o nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas que permiten una liberación controlada.

20 De manera alternativa, cuando la composición según la invención se administra por vía parenteral, esta puede presentarse en forma de soluciones o suspensiones para perfusión o para inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea.

25 De manera alternativa también, cuando la composición según la invención se administra por vía tópica, la composición farmacéutica según la invención está más particularmente destinada al tratamiento de la piel y de las mucosas y puede presentarse en forma líquida, pastosa o sólida, y más particularmente en forma de ungüentos, de soluciones acuosas, hidroalcohólicas u oleosas, de dispersiones de tipo loción, geles acuosos, anhidros o lipófilos, de polvos, de tampones empapados, de Syndet, de toallitas húmedas, de esprays, de espumas, de barras, de champúes, de compresas, de bases de limpieza, de emulsiones de consistencia líquida o semi-líquida de tipo leche, 30 obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda, semilíquida o sólida de tipo crema, gel o pomada. Puede también presentarse en forma de suspensiones de microesferas o nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas o de parches poliméricos o gelificados que permiten una liberación controlada.

35 Tras la realización de estudios de estabilidad y de solubilidad, parece que los compuestos según la invención son particularmente estables y solubles en soluciones que comprenden:

- DMA (Dimetilacetamida);
- Tween 60 polisorbato 60 (polioxietileno (20) monoestearato de sorbitán), o
- Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán); y
- PBS (tampón fosfato salino) o agua ( $H_2O$ ).

Preferentemente, los compuestos según la invención están solubilizados en una composición que comprende:

- 45 - el 2% de DMA (dimetilacetamina) en peso del peso total de la composición;
- el 5% de Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán) en peso del peso total de la composición; y
  - el 93% de PBS (tampón fosfato salino) en peso del peso total de la composición.

50 Según la invención, el sujeto que se debe tratar es preferentemente un mamífero. Más preferentemente, se trata de un humano, de un caballo, de un perro o de un gato. Más particularmente aún, el paciente que se debe tratar es un humano.

### Ejemplos

#### 55 Ejemplo 1:

Se han evaluado seis nuevos compuestos, análogos de AICAR (acadesina), sobre dos tipos de líneas de leucemia mieloide crónica (LMC): sensibles (K562) o resistentes (ImaR) a Imanitib. Se trata de los 16 compuestos siguientes recogidos en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1:

Código de la molécula	Fórmula química de la molécula	Nombre químico de la molécula
15		1'-(4-ethoxycarbonyl-5-chloro-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
17		1'-(4-carbamoyl-5-iodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
23		1-(naftil-2-metil)-4-ethoxycarbonyl-5-iodo-1,2,3-triazol
82		1'-(4-ethoxycarbonyl-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
86		1'-(4-ethoxycarbonyl-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
191		1'-(4-ethoxycarbonyl-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosa
49		1'-(4-ethoxycarbonyl-5-ethylpropionato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
115		1'-(4-fenil-5-fenilacetilen-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
172		1'-(4-(3-tienil)-5-(3-ethiniltiofen)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
176		1'-(4-heptil-5-(non-1-in-1-il)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
177		1'-(4-(4-fluorofenil)-5-(4-fluorofenilacetilen)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
25		1-(naftil-2-metil)-4-ethoxycarbonyl-5-ethylpropionato-1,2,3-triazol
97		1-(naftil-2-metil)-4-fenil-5-fenilacetilene-1,2,3-triazol
112		1-(4-metilbencil)-4-ethoxycarbonyl-5-ethylpropionato-1,2,3-triazol

Código de la molécula	Fórmula química de la molécula	Nombre químico de la molécula
114		1-(4-metilbencil)-4-fenil-5-fenilacetilen-1,2,3-triazol
184		1'-(4-(6-methoxinaft-2-il)-5-((6-methoxinaft-2-il)acetilen)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa

La línea de células leucémicas K562 se obtiene a partir del derrame pleural de un paciente que padece LMC. Esta línea constituye un buen modelo para el estudio de esta enfermedad. Las células ImaR resistentes a Imatinib se generan a partir de células K562 por exposición a dosis crecientes de Imatinib. Las células K562 e ImaR son cultivadas a 37°C bajo el 5% de CO<sub>2</sub> en un medio RPMI 1640 que contiene el 5% de suero fetal de ternera y suplementado en piruvato de sodio y en antibiótico (penicilina estreptomicina).

a. Cribado de los 16 compuestos por medición de la viabilidad celular:

- 10 Con el fin de cribar los 16 compuestos según la invención, la actividad metabólica de las células K562 e ImaR se estudia después de 24 o 48 horas de tratamiento por 0,5 mM (dosis eficaz de AICAR) de estos diferentes compuestos. Las figuras 1 a 4 reflejan el estudio de la viabilidad celular.
- 15 La figura 1 representa el porcentaje de células K562 sensibles a Imatinib (K562) viables después de la estimulación o no durante 24h con Imatinib (1 µM), AICAR o uno de los 16 compuestos diferentes según la invención (0,5 mM) descritos en la tabla 1 anterior en placas de 96 pocillos. Después de la adición de reactivo XTT, la absorbancia se mide a 490 nm.
- 20 La figura 2 representa el porcentaje de células K562 sensibles a Imatinib (K562) viables después de la estimulación o no durante 48h con Imatinib (1 µM), AICAR o uno de los 16 compuestos diferentes según la invención (0,5 mM) descritos en la tabla 1 anterior en placas de 96 pocillos. Después de la adición de reactivo XTT, la absorbancia se mide a 490 nm.
- 25 La figura 3 representa el porcentaje de células resistentes a Imatinib (ImaR) viables después de la estimulación o no durante 24h con Imatinib (1 µM), AICAR o uno de los 16 compuestos diferentes según la invención (0,5 mM) descritos en la tabla 1 anterior en placas de 96 pocillos. Después de la adición de reactivo XTT, la absorbancia se mide a 490 nm.
- 30 La figura 4 representa el porcentaje de células resistentes a Imatinib (ImaR) viables después de la estimulación o no durante 48h con Imatinib (1 µM), AICAR o uno de los 16 compuestos diferentes según la invención (0,5 mM) descritos en la tabla 1 anterior en placas de 96 pocillos. Después de la adición de reactivo XTT, la absorbancia se mide a 490 nm.
- 35 Los resultados obtenidos muestran que el conjunto de los 16 compuestos inducen, después de 24 o 48 horas de estimulación, una disminución de la viabilidad celular en los dos tipos de clones. Esta disminución de la viabilidad celular es más elevada que el control positivo. Es asimismo más elevada o comparable a los compuestos Imatinib o AICAR. Así, estos 16 compuestos parecen ser unos candidatos interesantes como principios activos destinados al tratamiento de LMC.
- 40 Además, entre estos 16 compuestos, 9 compuestos (15, 23, 82, 86, 191, 49, 176, 25, 112) inducen, después de 24 o 48 horas de estimulación y de manera casi idéntica en los dos tipos de clones, una importante disminución de la viabilidad celular. En efecto, el porcentaje de células viables pasa a partir de 24 horas de tratamiento a valores inferiores al 10%. Por otro lado, y como era de esperar, el Imatinib induce en la línea K562 una pérdida de viabilidad celular de más del 50% después de 48 horas de estimulación, mientras que para la línea ImaR, la viabilidad celular se ve afectada sólo ligeramente.

AICAR, sin embargo, conlleva una pérdida de viabilidad celular, sea cual sea el clon considerado (figura 1A, B). Se utilizaron 7 compuestos preferidos después en unos experimentos de dosis-respuesta (concentraciones crecientes de 5 a 50 µM para 24 o 48 horas de tratamiento) en los dos tipos de clones (figuras 1 a 4).

**b. Experimento de dosis-respuesta de 7 compuestos:**

La figura 5 representa un experimento dosis-respuesta sobre unas células K562 expuestas durante 24h a Imatinib (1  $\mu$ M) (para una dosis-respuesta completa de los efectos de Imatinib sobre las células K562S y K562R véase Jacquele et al., Oncogene 2007, 26, 2445-2458) o a dosis crecientes (5, 10, 25 y 50  $\mu$ M) de AICAR o de uno de los 7 compuestos seleccionados de entre los compuestos 15, 23, 82, 86, 191, 49 y 112.

La figura 6 representa un experimento dosis-respuesta sobre unas células K562 expuestas durante 48h a Imatinib (1  $\mu$ M) (para una dosis-respuesta completa de los efectos de Imatinib sobre las células K562S y K562R véase Jacquele et al., Oncogene 2007, 26, 2445-2458) o a dosis crecientes (5, 10, 25 y 50  $\mu$ M) de AICAR o de uno de los 7 compuestos seleccionados de entre los compuestos 15, 23, 82, 86, 191, 49 y 112.

La figura 7 representa un experimento dosis-respuesta sobre unas células ImaR expuestas durante 24h a Imatinib (1  $\mu$ M) (para una dosis-respuesta completa de los efectos de Imatinib sobre las células K562S y K562R véase Jacquele et al., Oncogene 2007, 26, 2445-2458) o a dosis crecientes (5, 10, 25 y 50  $\mu$ M) de AICAR o de uno de los 7 compuestos seleccionados de entre los compuestos 15, 23, 82, 86, 191, 49 y 112.

La figura 8 representa un experimento dosis-respuesta sobre unas células ImaR expuestas durante 48h a Imatinib (1  $\mu$ M) (para una dosis-respuesta completa de los efectos de Imatinib sobre las células K562S y K562R véase Jacquele et al., Oncogene 2007, 26, 2445-2458) o a dosis crecientes (5, 10, 25 y 50  $\mu$ M) de AICAR o de uno de los 7 compuestos seleccionados de entre los compuestos 15, 23, 82, 86, 191, 49 y 112.

Las curvas de las figuras 5 a 8 ilustran el efecto dosis-respuesta de cada uno de estos 7 compuestos. AICAR, ineficaz a estas concentraciones, sirve de referencia. Después de la adición de reactivo XTT, la absorbancia se mide a 490 nm.

Los resultados ilustrados en las figuras 5 a 8 muestran una disminución dosis-dependiente del número de células viables para los 7 compuestos a partir de 24 horas de estimulación. Estos 7 compuestos se revelan particularmente eficaces sobre las dos líneas a concentraciones tan bajas como 5  $\mu$ M (15, 23, 82, 86, 191, 49, 112). IC<sub>50</sub> es de aproximadamente 2,5  $\mu$ M para los compuestos 82, 86, 112 y aproximadamente 10  $\mu$ M para los compuestos 15, 23, 191, 49. En comparación, AICAR, a estas mismas concentraciones, es ineficaz. Finalmente, el clon K562 parece ligeramente más sensible a estos compuestos que el clon ImaR.

**c. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular:**

El porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (subG1, células en apoptosis, G0/G1, S y G2/M, Fig. 3A) se determina por citometría de flujo, tras la incubación de las dos líneas de células con Imatinib, de AICAR o los compuestos 82, 86, 112, 15, 23, 191, 49.

La figura 9 ilustra un modelo de distribución de las células en cada una de las fases del ciclo celular (subG1, G0/G1, S, G2/M). Las abscisas del gráfico de la figura 9 corresponden a la cantidad de ADN marcado con yoduro de propidio, mientras que las ordenadas corresponden al número de células.

La figura 10 representa el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (ordenadas) cuando unas células K562 son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), AICAR (0,01 mM y 1 mM), con los compuestos 82 (2,5  $\mu$ M), 86 (2,5  $\mu$ M), 112 (2,5  $\mu$ M) o con los compuestos 15 (10  $\mu$ M), 23 (10  $\mu$ M), 191 (10  $\mu$ M) y 49 (10  $\mu$ M). Los núcleos son marcados por yoduro de propidio, después se determina la proporción de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular (subG1, G0/G1, S, G2/M).

La figura 11 representa el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (ordenadas) cuando unas células ImaR son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), AICAR (0,01 mM y 1 mM), con los compuestos 82 (2,5  $\mu$ M), 86 (2,5  $\mu$ M), 112 (2,5  $\mu$ M) o con los compuestos 15 (10  $\mu$ M), 23 (10  $\mu$ M), 191 (10  $\mu$ M) y 49 (10  $\mu$ M). Los núcleos son marcados por yoduro de propidio, después se determina la proporción de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular (subG1, G0/G1, S, G2/M).

Los resultados ilustrados en las figuras 10 y 11 muestran un aumento del porcentaje de células en la fase G0/G1 del ciclo celular después de 24 horas de tratamiento por Imatinib. Una pequeña fracción de células se acumula también en la fase subG1 lo que sugiere un fenómeno de apoptosis. Como se esperaba, estos efectos no se observan en el clon ImaR. En lo referente a AICAR, parece provocar la parada del ciclo celular en G2/M para el clon K562 y en G0/G1 para las células ImaR. Finalmente, 5 de los 7 compuestos (82, 86, 15, 23, 49) inducen un aumento de la proporción de células K562 e ImaR en la fase G2(M, acompañada para los compuestos 112, 15, 23 y 49 de una acumulación muy pronunciada de células en la fase subG1 y de una disminución del número de células en G0/G1).

Los compuestos inducen una parada de las células K562-S y K562-R en fase G2/M del ciclo celular que se acompañan o no de una apoptosis celular.

d. Análisis de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en las células K562 e ImaR:i) Medición de la actividad de la caspasa 3:

5 La figura 12 ilustra la actividad de la caspasa 3 en U.A/mg de proteína (ordenadas) cuando unas células K562 sensibles a Imatinib son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), AICAR (0,01 mM y 1 mM), los compuestos 82 (2,5  $\mu$ M), 86 (2,5  $\mu$ M), 112 (2,5  $\mu$ M) o con los compuestos 15 (10  $\mu$ M), 23 (10  $\mu$ M), 191 (10  $\mu$ M) y 49 (10  $\mu$ M). Las células son lisadas y 10  $\mu$ g de proteínas son puestas en presencia de Ac-DEVD-AMC en placa de 96 pocillos. La emisión de fluorescencia a 460 nm resultante de la liberación de AMC se registra después.

10 La figura 13 ilustra la actividad de la caspasa 3 en U.A/mg de proteína (ordenadas) cuando unas células ImaR resistentes a Imatinib son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), AICAR (0,01 mM y 1 mM), los compuestos 82 (2,5  $\mu$ M), 86 (2,5  $\mu$ M), 112 (2,5  $\mu$ M) o con los compuestos 15 (10  $\mu$ M), 23 (10  $\mu$ M), 191 (10  $\mu$ M) y 49 (10  $\mu$ M). Las células son lisadas y 10  $\mu$ g de proteínas se ponen en presencia de Ac-DEVD-AMC en placa de 96 pocillos. La emisión de fluorescencia a 460 nm resultante de la liberación de AMC se registra después.

15 Los resultados de estas figuras 12 y 13 muestran que el tratamiento de las células K562 por 3  $\mu$ M de Imatinib durante 24 horas no induce casi ningún aumento de la actividad de la caspasa 3 en las células ImaR mientras que se aumenta en un factor 4 aproximadamente en las células K562. AICAR (1 mM), por el contrario, es incapaz de inducir esta activación, sea cual sea el clon considerado. Estos resultados confirman los efectos observados durante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo: los compuestos 112, 15, 23 inducen un aumento de la actividad de la caspasa 3 en un factor que va de 2 a 3 con respecto al control en las células K562 e ImaR. De manera interesante, el compuesto 49 induce un aumento de la actividad de la caspasa 3 en el clon ImaR pero no en las células K562.

20 25 Estos resultados llevan a medir la activación de las caspasas 8 y 9 para estos tres compuestos 112, 15, 23.

ii) Medición de las actividades de las caspasas 8 y 9:

30 La figura 14 ilustra la actividad de la caspasa 8 en U.A/mg de proteína (ordenadas) cuando unas células K562 sensibles a Imatinib (barras blancas) o unas células ImaR resistentes a Imatinib (barras negras) son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), con los compuestos 112 (2,5  $\mu$ M), 15 (10  $\mu$ M) o 23 (10  $\mu$ M). Las células son lisadas y las actividades de caspasa 8 se miden utilizando 10  $\mu$ g de proteínas y Ac-IETD-AMC. La emisión de fluorescencia a 460 nm resultante de la liberación de AMC se registra después.

35 La figura 15 ilustra la actividad de la caspasa 9 en U.A/mg de proteína (ordenadas) cuando unas células K562 sensibles a Imatinib (barras blancas) o unas células ImaR resistentes a Imatinib (barras negras) son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), con los compuestos 112 (2,5  $\mu$ M), 15 (10  $\mu$ M) o 23 (10  $\mu$ M). Las células son lisadas y las actividades de caspasa 9 se miden utilizando 10  $\mu$ g de proteínas y Ac-LEHD-AMC. La emisión de fluorescencia a 460 nm resultante de la liberación de AMC se registra después.

40 Los resultados ilustrados en las figuras 14 y 15 ilustran que ninguna inducción significativa de la actividad de la caspasa 8 no se mide en presencia de los diferentes compuestos (figura 14). Sin embargo, el tratamiento de las células K562 por Imatinib induce un fuerte aumento de la actividad de la caspasa 9, lo que no es el caso en las células ImaR. Los compuestos 112, 15, 23 inducen ellos también, y de manera casi similar en los dos tipos de clones, la activación de esta caspasa (figura 15).

e. Análisis de la expresión y de la fosforilación de marcadores específicos de la apoptosis y de la autofagia y del estado de activación de la vía mTOR:i) Análisis de la expresión y de la fosforilación de marcadores específicos de la apoptosis y de la autofagia:

50 La figura 16 representa un análisis por transferencia western de la expresión y de la fosforilación de marcadores específicos de la apoptosis y de la autofagia. Las células K562 e ImaR son estimuladas durante 24h con Imatinib (3  $\mu$ M), AICAR (0,01 mM y 1 mM), los compuestos 82 (2,5  $\mu$ M), 86 (2,5  $\mu$ M), 112 (2,5  $\mu$ M) o los compuestos 15 (10  $\mu$ M), 23 (10  $\mu$ M), 191 (10  $\mu$ M) y 49 (10  $\mu$ M). Las células son lisadas y 35  $\mu$ g de proteínas son separadas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 12 o al 14%) y analizadas por transferencia western con unos anticuerpos específicos de cada uno de los marcadores.

55 60 Los resultados de la transferencia western recogidos en la figura 16 permiten discriminar el tipo de muerte celular programada (PCD por Programmed Cell Death) implicado en la citotoxicidad de los compuestos 82, 86, 112, 15, 23, 191, 49, la expresión y la fosforilación de marcadores específicos de la apoptosis y de la autofagia. Los resultados obtenidos revelan un aumento de la expresión de p62/SQSTM1, que intervienen en las etapas precoces de la autofagia, en las células K562 e ImaR tratadas por AICAR (1 mM) y los compuestos 82, 86, 112, 15, 23, 191. Durante la autofagia, LC3-I se escinde en LC3-II, después esta forma se une a la fosfatidiletanolamina para insertarse en la membrana del fagóforo y permitir la elongación del autofagosoma. Esta agregación de LC3-I en

LC3-II, visualizada en transferencia western, representa por lo tanto un excelente medio de demostrar una inducción de la autofagia. LC3 se escinde en los dos tipos de clones en presencia de AICAR (1 mM) o unos compuestos 82, 86, 15, 23, 191, 49. Por otro lado, durante la apoptosis, un cierto número de proteínas son escindidas por las caspasas. Entre estas, PARP constituye el principal sustrato de la caspasa 3. En los dos tipos de clones expuestos a 5 Imatinib o a los compuestos 112, 15, 23, 49, se observa la aparición del fragmento de escisión característica a 85 kDa (PARP cl). Estas observaciones confirman por lo tanto los resultados anteriores.

Finalmente, para determinar la implicación de la vía AMPK/mTOR en la iniciación del proceso autofágico, se han visualizado el nivel de fosforilación de la P-AMPK, la proteína AMPK (visualizada mediante un retraso de migración sobre el gel) y de P-S6 ribo, la proteína S6 ribosómica, sustrato indirecto de mTOR. De manera interesante, se constata que AMPK se activa en presencia de 1 mM de AICAR y de los diferentes compuestos de interés. Esta activación está correlacionada con una inhibición de la vía mTOR visualizada por una desfosforilación masiva de la proteína S6 ribosómica.

15 Para confirmar que la vía mTOR se inhibe en presencia de los diferentes compuestos, se ha realizado la fosforilación de un sustrato directo de mTOR: la proteína 4E-BP1.

ii) Análisis del estado de activación de la vía mTOR

20 La figura 17 representa un análisis por transferencia western del estado de activación de la vía mTOR mediante el estudio de la fosforilación de 4E-BP1, que es un sustrato directo de mTOR. Las células K562 e ImaR son estimuladas durante 24h con Imanitib (3 µM), AICAR (0,01 mM y 1 mM), los compuestos 82 (2,5 µM), 112 (2,5 µM) o los compuestos 15 (10 µM), 23 (10 µM) y 191 (10 µM). Las células son lisadas y se separan 30 µg de proteínas mediante SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 13%) y analizadas mediante transferencia western con un anticuerpo específico de la proteína 4E-BP1. El retraso de la migración sobre gel observada refleja el nivel de fosforilación de 4E-BP1.

25 La transferencia western revela un retraso de migración sobre gel más o menos pronunciado según su nivel de fosforilación. Así, se observa una disminución total de la fosforilación de 4E-BP1 en los dos clones sensibles y resistentes tratados por AICAR (1 mM) y por los compuestos 82 y 23, así como una disminución parcial con el resto de los compuestos. Tal como se esperaba, el Imanitib inhibe totalmente la fosforilación de 4E-BP1 en la línea K562 parental pero no en la contrapartida resistente.

f. Demostración de la actividad de la catepsina-B y de la activación de la catepsina-L:

i) Medición de la catepsina-B:

35 La figura 18 ilustra la actividad de la catepsina B en U-A/mg de proteína (ordenadas) cuando unas células K562 sensibles a Imanitib (barras blancas) o unas células ImaR resistentes a Imanitib (barras negras) son estimuladas durante 24h con Imanitib (3 µM), AICAR (0,01 mM o 1 mM) o con los compuestos 82 (2,5 µM), 112 (2,5 µM) o con los compuestos 15 (10 µM), 23 (10 µM) o 191 (10 µM). Las células son lisadas y 5 µg de proteínas son puestas en presencia de z-RR-AMC en placas de 96 pocillos. La emisión de fluorescencia a 460 nm que resulta de la liberación de AMC se registra después.

40 Los resultados referentes a la acumulación de las proteínas p62 y LC3-II han llevado a estudiar la actividad de la catepsina-B y después la activación de la catepsina-L, enzimas lisosomales efectoras de la autofagia que interviene en la digestión del contenido de los autofagolisosomas. Asimismo, como se ilustra en la figura 18, se observa un aumento de la actividad de la catepsina-B de un factor 2 aproximadamente (compuestos 82, 191) o superior a 3 (compuestos 112, 15, 23) durante unos tratamientos por AICAR (1 mM) o los compuestos 82, 112, 15, 23, 191, de manera parecida en los dos tipos de clones cada vez.

ii) Demostración de la activación de la catepsina-L:

45 La figura 19 representa un análisis por transferencia western de la activación de la catepsina L. Las células K562 e ImaR son estimuladas durante 24h con Imanitib (3 µM), AICAR (0,01 mM y 1 mM), los compuestos 82 (2,5 µM), 112 (2,5 µM) o los compuestos 15 (10 µM), 23 (10 µM) y 191 (10 µM). Las células son lisadas y se separan 30 µg de proteínas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 13%) y analizadas por transferencia western con un anticuerpo específico de la catepsina L.

50 La inmunotransferencia referente a la activación de la catepsina-L ilustrada en la figura 19 confirma las observaciones realizadas durante mediciones de catepsina B, ya que se observa la acumulación de la forma activada de la catepsina-L en los clones K562. De manera interesante, la catepsina-L no se activa en el clon ImaR y no parece por lo tanto participar en la lisis del contenido de los autofagosomas en este clon.

Conclusión:

Según los resultados ilustrados en los ejemplos 1a a 1g anteriores, los compuestos según la invención parecen presentar una actividad anticancerosa al mismo tiempo en unas líneas de células leucémicas K562 sensibles o resistentes a Imanitib. Entre estos 16 compuestos, los 7 compuestos más eficaces al final de los experimentos de viabilidad celular presentan unas características particularmente interesantes y se revelan de 50 a 500 veces más potentes que AICAR. Asimismo, algunos compuestos parecen inducir o bien la autofagia únicamente (82, 86, 191), o bien la apoptosis únicamente (112), o bien una combinación de los dos tipos de mecanismos (15, 23, 49). Sin embargo, todos estos 7 compuestos tienen como mecanismo de acción común una inhibición de la vía mTOR visualizada por una desfosforilación de todos sus sustratos proteicos (figuras 16 y 17) y un bloqueo de ciclo celular en fase G2/M (figuras 9, 10 y 11). Es asimismo interesante constatar que la apoptosis inducida por los compuestos 112, 15, 23 y 49 está esencialmente relevada por la vía intrínseca, que necesita una permeabilización mitocondrial y la activación de la caspasa 9.

15 **Ejemplo 2:**

Se evaluaron 13 nuevos compuestos, análogos de AICAR (acedesina), sobre unas líneas de LMC (leucemia mieloide crónica) sensibles (K562) a Imanitib. Se trata de los 13 compuestos siguientes recogidos en la tabla 2 siguiente.

20

Tabla 2:

Código de la molécula	Fórmula química de la molécula	Nombre químico de la molécula
20		1'-(4-metoxicarbonil-5-(2-furil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
21		1'-(4-metoxicarbonil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
22		1'-(4-carbamoil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
23		1'-(4-carbamoil-5-chloro-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
24		1'-(4-fenil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
25		1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-furoil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
26		1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-thienoil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
27		1'-(4-etoxicarbonil-5-(p-toluoil-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
28		1'-(4-carbamoil-5-ethinil-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
29		1'-(4-metoxicarbonil-5-ethinil-[1,2,3]-triazol-1-il)-β-D-ribofuranosa
30		1'-(4-etoxicarbonil-5-heptanoil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa

Código de la molécula	Fórmula química de la molécula	Nombre químico de la molécula
31		1'-(4-ethoxycarbonyl)-5-(2-furoyl)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
32		1'-(4-ethoxycarbonil)-5-p-toluoyl-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa

**a. Medición de la viabilidad celular de 13 compuestos según la invención:**

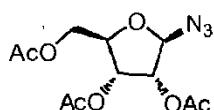
- 5 Con el fin de cribar los 13 compuestos según la invención, se estudia la actividad metabólica de las células K562 después de 48 horas de tratamiento mediante 0,5 mM (dosis eficaz de AICAR) de estos diferentes compuestos. La figura 21 representa el porcentaje de células K562 sensibles a Imatinib (K562) viables después de la estimulación o no durante 48 horas con AICAR o uno de los 13 compuestos según la invención (0,5 mM) descritos en la tabla 1 anterior en placas de 96 pocillos. Después de la adición del reactivo XTT, se mide la absorbancia a 490 nm.
- 10 Los resultados obtenidos muestran que, entre estos 13 compuestos, 13 compuestos inducen, después de 48 horas de estimulación, una disminución de la viabilidad celular. Esta disminución de la viabilidad celular es más elevada que el control positivo. Es también más elevada que o comparable al compuesto AICAR. Así, estos 13 compuestos parecen ser unos candidatos interesantes como principios activos destinados al tratamiento de la LMC.
- 15 Además, entre estos 13 compuestos, 6 compuestos (20, 21, 22, 28, 29 y 32) inducen, después de 48 horas de estimulación, una importante disminución de la viabilidad celular. En efecto, el porcentaje de células viables pasa, a partir de 48 horas de tratamiento, a valores inferiores al 20%.

**b. Experimentos de dosis respuesta para 15 compuestos según la invención:**

- 20 Las figuras 22 y 23 representan unos experimentos dosis-respuesta en células K562 expuestas durante 48 horas a dosis crecientes (5, 10, 25 y 50 µM) de uno de los 9 compuestos seleccionados de entre los compuestos 23, 24, 27, 30, 20, 21, 22, 24 y 25.
- 25 Los histogramas de las figuras 22 y 23 ilustran el efecto dosis-respuesta de cada uno de estos 9 compuestos. Después de la adición de reactivo XTT, se mide la absorbancia a 490 nm.
- 30 Los resultados ilustrados en las figuras 22 y 23 muestran una disminución dosis-dependiente del número de células viables para los 9 compuestos a partir de 48 horas de estimulación. Estos 9 compuestos se revelan todos particularmente eficaces sobre las células K562 a concentraciones de 50 µM. El IC50 es del orden de 5 µM para los compuestos 20, 21, 23, 24 y 30, y de aproximadamente 10 µM para los compuestos 22, 27, 28 y 61.

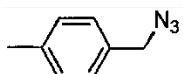
**Ejemplo 3: Modo de puesta en práctica referente a la síntesis de compuestos según la invención**

- 35 A una solución de 1',2',3',5'-tetraacetato-β-D-ribosa en 50 ml de diclorometano se añaden el azoturo de trimetilsililo y después del  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  gota a gota. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 1h y después se lava con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio y después se evapora el disolvente bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 1 en forma de un aceite incoloro:



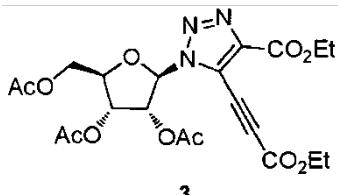
1

- 40 A una solución de bromuro de 4-metilbencilo en 50 ml de dimetil-formamida se añade el nitruro de sodio. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 2h, se evapora el disolvente bajo presión reducida y se añaden 100 ml de diclorometano. La fase orgánica se lava 2 veces con agua y después con una solución saturada de NaCl, se seca sobre sulfato de magnesio y después se evapora el disolvente bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 2 en forma de un aceite incoloro:

**2**

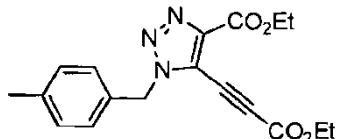
A una solución de azida 1 en 5 ml de tetrahidrofurano (o el 2-metil-tetrahidrofuran) colocada a 0°C se añaden sucesivamente el etilpropiolato, el cianuro de cobre (I), el agua oxigenada al 35% y la N,N-diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja bajo agitación a 0°C durante aproximadamente 10 minutos y después se lleva a temperatura ambiente. Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se filtra sobre lecho de celite y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 3 en forma de un aceite marrón. En el procedimiento optimizado, se utilizan el 2-metil-tetrahidrofuran y el bormo-tris-(trifeniilfosfina) CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

10

**3**

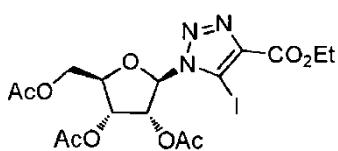
A una solución de azida 2 en 5 ml de tetrahidrofurano dispuesta a 0°C se añaden sucesivamente el propiolato de etilo, el cianuro de cobre (I), el agua oxigenada al 35% y la N,N-diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja bajo agitación a 0°C durante aproximadamente 10 minutos, después se deja volver hasta temperatura ambiente. Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se filtra sobre lecho de celite y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 4 en forma de un sólido amarillo. En el procedimiento optimizado, se utilizan el 2-metil-tetrahidrofuran y el bromo-tris-(trifeniilfosfina) CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

15

**4**

A una solución de azida 1 en 20 ml de tetrahidrofurano (o 2-metil-tetrahidrofuran) se le añade el propiolato de etilo, I<sub>2</sub>, el nitrato amónico de cerio, el yoduro de cobre (I) y la N,N-Diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y después se filtra sobre lecho de celite. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite oscuro se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 5 en forma de un sólido marrón. En el procedimiento optimizado, se utiliza el 2-metil-tetrahidrofuran en lugar del THF.

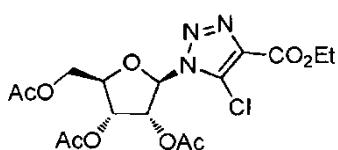
20

**5**

25

A una solución de azida 1 en 10 ml de diclorometano, se añaden el propiolato de etilo, la N-clorosuccinimida, el cloruro de cobre (I) y la N,N'-diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtra sobre lecho de celite. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 6 en forma de aceite.

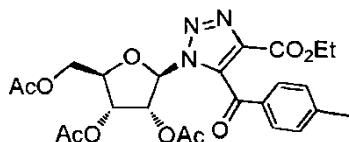
30

**6**

A una solución de azida 1 en 5 ml de tetrahidrofurano (o el 2-metil-tetrahidrofuran) se añaden el propiolato de etilo,

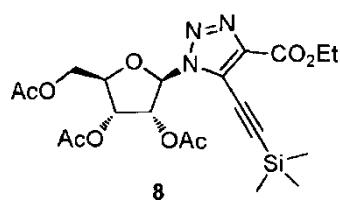
el cloruro de p-toluoilo, el yoduro de cobre (I) y la N,N'-diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se filtra sobre lecho de celite. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 7 en forma de aceite.

5

7

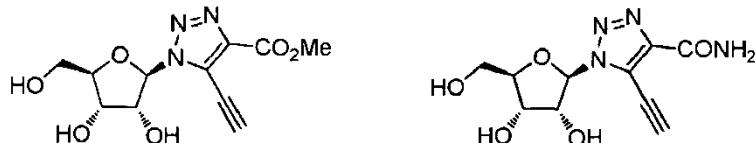
A una solución de 5 en 20 ml de tolueno se añaden el etiniltriethylsilano, el Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, el yoduro de cobre (I) y la trietilamina. Se calienta el medio de reacción a 60°C durante 90 minutos y después se filtra sobre lecho de celite y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 8 en forma de aceite.

10



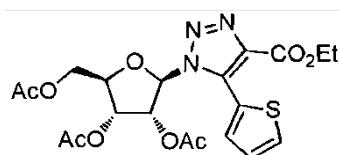
15 Una solución de 8 en 40 ml de metanol se coloca en un baño de agua helada. Se hacen burbujear el amoniaco durante algunos segundos y después se deja volver el medio de reacción a temperatura ambiente. Después de una noche, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtienen los compuestos 9 y 10 en forma de espumas.

20

910

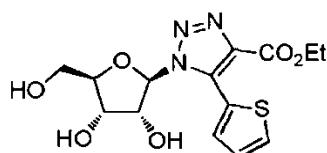
A una solución de 5 en 10 ml de tolueno se añaden el 2-(tributilestani)tolueno, el Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, el yoduro de cobre (I) y la trietilamina. Se calienta el medio de reacción a 80°C durante aproximadamente 3h, se filtra sobre lecho de celite y después se evapora el disolvente bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 11 en forma de aceite marrón:

25

11

30 A una solución de 11 en 20 ml de etanol se añade el carbonato de sodio. El medio de reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante una hora, después el disolvente se evapora bajo presión reducida y el bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 12 en forma de un aceite amarillo:

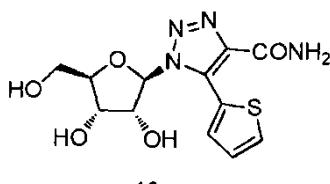
30

12

35 Una solución de 11 en 30 ml de metanol se coloca en un baño de agua helada. Se hace chapotear el amoniaco

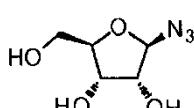
gaseoso durante algunos segundos y después se deja volver el medio de reacción a temperatura ambiente. Despues de una noche, el disolvete se evapora bajo presión reducida y el aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice.

- 5 Se obtiene el compuesto 13 en forma de un aceite amarillo:



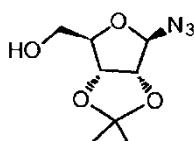
**Ejemplo 4: Modo de puesta en práctica referente a la síntesis de compuestos según la invención.**

A una solución de azida 1 (1-azido-2,3',4'-tri-O-acetyl ribosa) en 20 ml de metanol se añade carbonato de sodio. El medio de reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante una hora, después el disolvete se evapora bajo presión reducida y el bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice. Se obtiene el compuesto 14 en forma de un aceite incoloro:



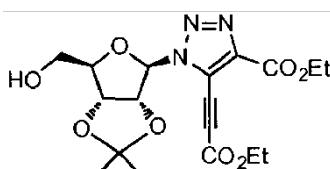
**14**

A una solución de azida 14 en 20 ml de acetona colocada a 0°C se añaden sucesivamente el 2,2-dimetoxipropano y después el eterato de trifluoruro de boro gota a gota. La mezcla se deja bajo agitación a 0°C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se vierte en una solución de trietilamina (10%) en 20 ml de acetona, dispuesta a 0°C. Después de 10 minutos bajo agitación, la solución neutralizada se evapora y el aceite amarillo obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH: 98-2). Se obtiene el compuesto 15 en forma de aceite incoloro:



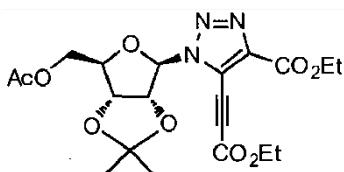
**15**

A una solución de azida 15 en 5 ml de tetrahidrofurano (o el 2-metil-tetrahidrofurano) colocada a 0°C se añaden sucesivamente el propiolato de etilo, el cianuro de cobre (I), el agua oxigenada al 35% y la N,N-Diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja bajo agitación a 0°C durante aproximadamente 10 minutos y después se vuelve a llevar a temperatura ambiente. Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se filtra sobre lecho de celite y el disolvete se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 7-3). Se obtiene el compuesto 16 en forma de un aceite. En el procedimiento optimizado, se utilizan el 2-metil-tetrahidrofurano y la bromo-tris-(trifenilfosfina) CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

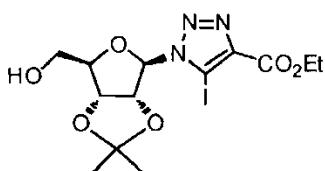


**16**

A una solución de 16 en 2 ml del anhídrido acético se añade la 4-dimetilaminopiridina (DMAP). El medio de reacción se deja bajo agitación a temperatura también durante dos horas. Después del final de la reacción, el disolvete se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 9-1). Se obtiene el compuesto 17 en forma de un aceite:

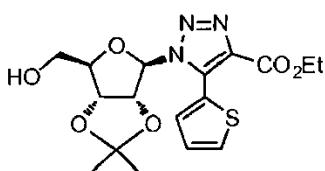
**17**

A una solución de azida 15 en 20 ml de tetrahidrofurano (o 2-metil-tetrahidrofurano) se añade el propiolato de etilo, I<sub>2</sub>, el nitrato amónico de cerio, el yoduro de cobre (I) y la N,N-Diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos y después se filtra sobre lecho de celite. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite oscuro obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 18 en forma de sólido marrón:

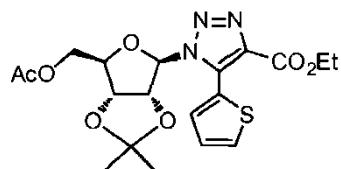
**18**

a- (acoplamiento de Stille): A una solución de 18 en 10 ml de tolueno se añaden el 2-(tributilestani)tiофено, el Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y el yoduro de cobre (I). Se calienta el medio de reacción a 80°C durante aproximadamente 2h, se filtra sobre lecho de celite y después el disolvente se evapora bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 19 en forma de aceite.

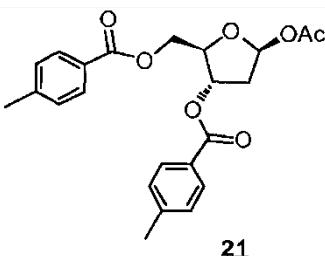
b- (acoplamiento de Suzuki): A una solución del compuesto 18 en el dioxano (2 ml), se añade 0,5 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M) después el ácido tiофено-2-borónico. La mezcla se desgasifica después y se pone bajo argón, después se añade el catalizador Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Se calienta a 85°C bajo agitación durante 4h. Se neutraliza la mezcla de reacción con 10 ml de HCl (1M) y se añaden 20 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se extrae después con una solución de NaCl y se evapora bajo presión reducida. El residuo bruto se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 19 en forma de aceite:

**19**

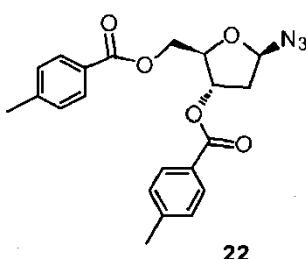
A una solución de 19 en 2 ml del anhídrido acético, se añade la 4-dimetilaminopiridina (DMAP). El medio de reacción se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Después del final de la reacción, el disolvente se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 9-1). Se obtiene el compuesto 20 en forma de un aceite:

**20**

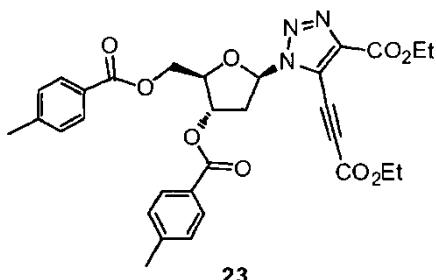
A una solución de 1'-acetil desoxirribosa en 60 ml de piridina se añade el cloruro de toluoilo. La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la extracción con diclorometano, secado sobre sulfato de magnesio y de filtración, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 21 en forma de un aceite amarillo que se solidifica para dar un sólido beige:



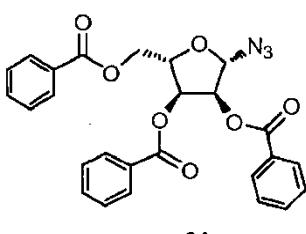
- 5 A una solución de 21 en 50 ml de diclorometano se añaden el nitruro de trimetilsililo y después el  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  gota a gota. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 3h, después se lava con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio y después se evapora el disolvente bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 9-1). Se obtiene el compuesto 22 en forma de un aceite incoloro:



- 10 15 A una solución de la azida 22 en 5 ml de tetrahidrofurano colocada a 0°C se añaden sucesivamente el propiolato de etilo, el cianuro de cobre (I), el agua oxigenada al 35% y la N,N-diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja bajo agitación a 0°C durante aproximadamente 10 min y después se vuelve a llevar a temperatura ambiente. Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se filtra sobre lecho de celite y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 23 en forma de un sólido. En el procedimiento optimizado, se utilizan el 2-metiltetrahidrofurano y la bromo-tris-(trifenilfosfina)  $\text{CuBr}(\text{PPh}_3)_3$ .



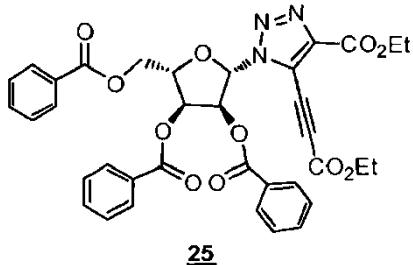
- 20 25 A una solución de 1,2,3,5-tetra-O-benzoyl-beta-L-ribofuranosa en 100 ml de diclorometano se añaden el nitruro de trimetilsililo y después el eterato de trifluoruro de boro gota a gota. El medio de reacción se deja a temperatura ambiente durante 2 horas y después se lava con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y después el disolvente se evapora bajo presión reducida. El aceite obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 9-1). Se obtiene el compuesto 24 en forma de un sólido blanco.



- 30 A una solución de la azida 24 en 5 ml de tetrahidrofurano colocada a 0°C se añaden sucesivamente el propiolato de etilo, el cianuro de cobre (I), el agua oxigenada al 35% y la N,N-Diisopropiletilamina. El medio de reacción se deja bajo agitación a 0°C durante aproximadamente 10 min y después se vuelve a llevar a temperatura ambiente.

Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se filtra sobre lecho de celite y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica sobre columna de sílice (eluyente: ciclohexano-AcOEt: 8-2). Se obtiene el compuesto 25 en forma de un sólido marrón. En el procedimiento optimizado, se utilizan el 2-metil-tetrahidrofurano y la bromo-tris-(trifenilfosfina) CuBr(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

5



**Ejemplo 5: Análisis de la eficacia de cinco compuestos según la invención sobre diferentes líneas hematopoyéticas y de cánceres sólidos:**

10

Se ha determinado la eficacia y las DL50 (dosis letales medias) de cinco compuestos según la invención, recogidos en la tabla 3 siguiente, sobre 6 líneas celulares de hemopatías malignas.

15

**Tabla 3:**

Código de la molécula	Fórmula química de la molécula	Nombre químico de la molécula
82		1'-(4-eticarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
86		1'-(4-eticarbonil-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosa
112		1-(4-metilbencil)-4-eticarbonil-5-ethylpropiolato-1,2,3-triazol
196		1'-(4-eticarbonil-5-ethylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tétra-O-acetyl-β-D-glucopiranosa
236		1'-(4-eticarbonyl)-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosa

Los resultados de este estudio se recogen en la tabla 4 siguiente.

20

**Tabla 4:**

Líneas	Compuesto 49	Compuesto 82	Compuesto 86	Compuesto 112	Compuesto 196	Compuesto 236
MEC-1 (Leucemia Linfoblástica crónica B)	0,2	0,75	2,5	1	0,1	1
J16 (Linfoma T)	2,5	1,5	5	2,5	0,75	2
8866 (Leucemia linfoblástica B)	3	1,5	4	1,5	3	2,5
U 937 (Linfoma monocitario)	0,5	1	2,5	2	0,1	2
RAJI (Burkitt)	>10	2,5	10	10	>10	4
8226 (Mieloma)	1,5	2,5	2,5	1,5	0,5	1,5

Asimismo, se han determinado la eficacia y las DL50 (dosis letales medias) de estos cinco compuestos recogidos en

la tabla 3 siguiente, sobre nueve líneas celulares de cánceres sólidos de orígenes diferentes. Los resultados de este estudio se recogen en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5:

5

Líneas	Compuesto 49	Compuesto 82	Compuesto 86	Compuesto 112	Compuesto 196	Compuesto 236
HCT8R (cáncer de colon)	>10	3,5	>10	10	>10	4
MDAM 453 (Cáncer de mama)	>10	1	5	>10	>10	1
A 375 (Melanoma)	7,5	2	5	7,5	10	2
SHSY-5Y (Neuroblastoma)	>10	1,5	3	>10	>10	0,5
Pc3 (Cáncer de próstata)	>10	3	10	>10	>10	5
NCIH 226 (Cáncer de pulmón)	>10	2,5	7,5	10	>10	4
MEWO (Melanoma, p53 mutado)	>10	1,5	7,5	>10	>10	3
SF 278 (Glioblastoma)	10	1,5	2,5	10	>10	2,5
HEK (Cáncer de riñón)	>10	1,5	6	>10	>10	2,5

Así, los resultados recogidos en la tabla 4 anterior muestran que todas las moléculas ensayadas presentan una eficacia sobre las hemopatías malignas. Los derivados más eficaces son las moléculas 82, 196 y 236.

- 10 En la tabla 5 se ha constatado que las moléculas son globalmente más eficaces sobre las hemopatías malignas que sobre los cánceres sólidos. Sin embargo, los derivados 82 y 236 de estructura muy similar muestran todos una eficacia significativa sobre la totalidad de los cánceres ensayados.

**Ejemplo 6: Análisis "in vivo" de la eficacia de los derivados 86, 196 y 236:**

- 15 Los tres compuestos (86, 196 y 236) se ensayaron con 1mg/kg sobre la toma tumoral de células de LMC K562 resistentes a la imatinib en ratones atípicos desnudos. Los tumores de los ratones de cada grupo se pesaron el día del sacrificio, la suma de estas masas constituye un índice de crecimiento tumoral. Este índice se expresa en porcentaje con respecto al crecimiento del grupo control (segunda línea).
- 20 Los resultados de este análisis "in vivo" se recogen en la tabla 6 siguiente.

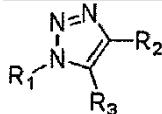
Tabla 6:

	Control	Compuesto 86	Compuesto 196	Compuesto 236
Masa de los tumores al final de la campaña (% frente a control)	100	69,6	42	60,3
Peso medio de los ratones a fecha del sacrificio (g)	18,63	18,43	20,5	20,14

- 25 Como se muestra en la tabla 6 anterior, las moléculas han mostrado todas una eficacia sobre el desarrollo de la masa tumoral. También se puede observar que el compuesto 196 parece ser el más eficaz con una inhibición de aproximadamente el 60% de la masa tumoral, seguido por el compuesto 236 y finalmente el 86.
- 30 Se señala también que los ratones tratados no presentan signos de alteración de su estado general tras los tratamientos recibidos. Un índice del estadio satisfactorio de los ratones es la media del peso de cada grupo presentada en la tercera línea de la tabla.

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula general:



5

en la que:

- R<sub>1</sub> se selecciona de entre

- un grupo pentosa cíclica en forma furánica con los grupos OH libres o eventualmente sustituidos con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato, acetilo, isopropilideno, benzoílo o paratoluolio,
- un grupo hexosa en forma piránica con los grupos OH libres o eventualmente sustituidos con uno o varios grupos mono-, bi- o trifosfato o acetilo,
- un grupo naftilo, eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o amino sustituidos que presentan de 1 a 4 átomos de carbono,

20

- un grupo bencilo eventualmente sustituido con uno o varios grupos alquilo o amino sustituidos que presentan de 1 a 4 átomos de carbono,
- unos grupos fenilos, bifenilos, heteroarilos;

25

- R<sub>2</sub> se selecciona de entre

- un grupo amida -CONH<sub>2</sub>, -CONHMe, -CONHEt, -CON(Me)<sub>2</sub>, -CON(Et)<sub>2</sub>,
- un grupo ácido o éster -CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>Me, CO<sub>2</sub>Et, un grupo ciano o amidina -CN, -C(NH<sub>2</sub>)NH, -C(NHMe)NH, -C(NHEt)NH,
- un grupo fenilo eventualmente sustituido por un halógeno seleccionado de entre Cl, Br, I et F,
- un grupo tiofeno,
- una cadena carbonada lineal o ramificada que presenta de 3 a 10 átomos de carbono, o
- un grupo metoxinaftaleno; y

40

- R<sub>3</sub> se selecciona de entre:

- un grupo halógeno,
- un grupo furano o -CO-furano,
- un grupo tiofeno o -CO-tiofeno o -C≡C-tiofeno,
- un grupo toluolio,
- un grupo acetileno,
- un grupo -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>, con n comprendido entre 2 y 9,
- un grupo fenilo o -C≡C-fenilo, eventualmente sustituido con un halógeno,
- un grupo -C≡C-CO<sub>2</sub>Me, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, -C≡C-CONH<sub>2</sub>,
- un grupo -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, o
- un grupo -C=C-2-metoxinaftaleno;

45

50

55

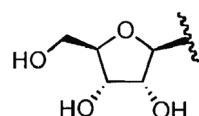
60

sus racémicos, enantiómeros, diaestereoisómeros y sus mezclas, sus tautómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

2. Compuestos según la reivindicación 1, en los que:

5

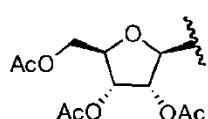
- R<sub>1</sub> se selecciona de entre



10

$\beta$ -D-ribosa

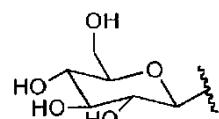
o



15

tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribosa

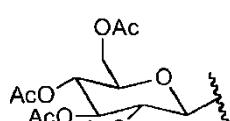
o



20

$\beta$ -D-glucosa

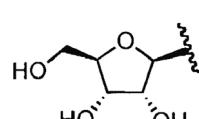
o



25

tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucosa

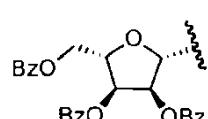
o



30

$\beta$ -L-Ribosa

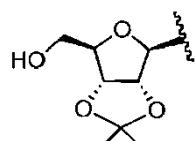
o



35

tri-O-benzoyl- $\beta$ -L-Ribosa  
Bz = benzoilo = Ph-CO

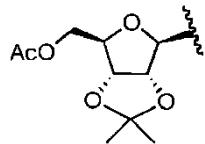
o



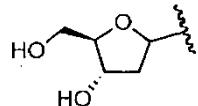
40

2',3'-isopropiliden- $\beta$ -D-ribosa

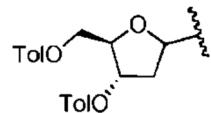
o

5 5'-O-acetyl-2',3'-isopropilidene- $\beta$ -D-ribosa

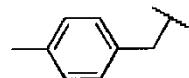
o

10 2'-deoxi- $\alpha$  o  $\beta$ -D-ribosa

o

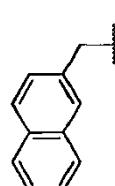
15 3',5'-di-O-tolyl-2'-deoxi- $\alpha$  o  $\beta$ -D-ribosa  
Tol = 4-Me-Ph-CO

o



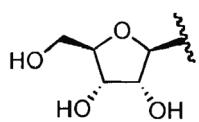
20 4-metilbencilo

o

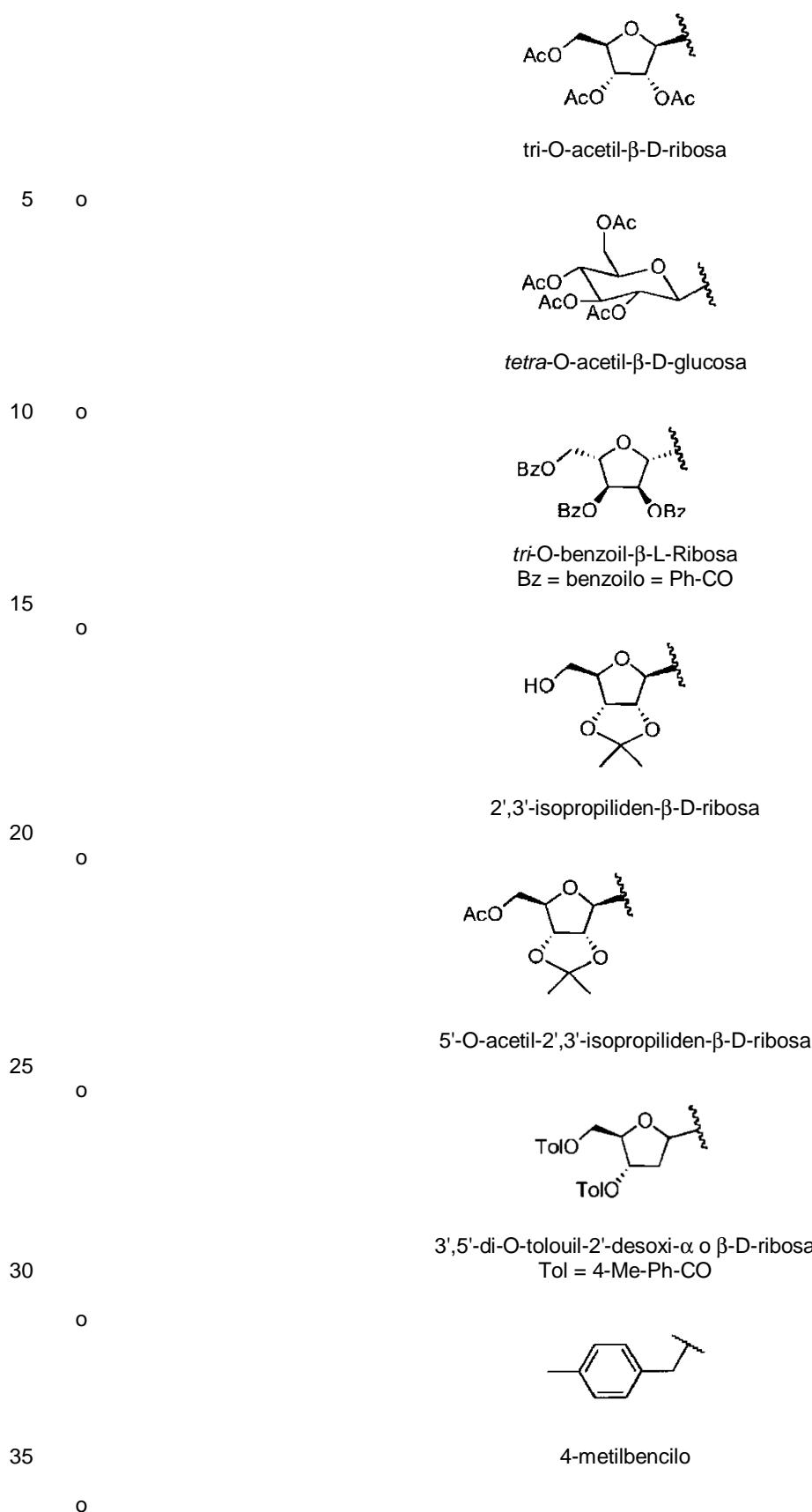


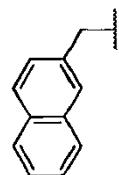
25 2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)

- R<sub>2</sub> se selecciona de entre -CONH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>Me, -CO<sub>2</sub>Et, fenilo, tiofeno, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, p-fluoro-fenilo o el 2-metoxinaftaleno; y
- R<sub>3</sub> se selecciona de entre I, Cl, furano, CO-furano, CO-tiofeno, acetileno, CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>, toluoilo, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, tiofeno, fenilo, -C≡C-fenilo, -C≡C-tiofeno, -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>, -C≡C-(p-fluoro-fenil), o -C≡C-2-metoxinaftaleno.

35 3. Compuestos según la reivindicación 2, en los que R<sub>1</sub> es40  $\beta$ -D-ribosa

o





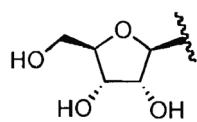
2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)

y

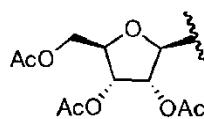
5

- cuando R1 es un grupo  $\beta$ -D-ribosa, entonces:
  - R2= CONH<sub>2</sub> y R3 = I, Cl, CO-Furano, CO-tiofeno, toluoilo o acetileno; o
  - R2 = CO<sub>2</sub>Me y R3 = I, furano o acetileno; o
  - R2 = fenilo y R3 = I;
- cuando R1 es un grupo tri-O-acetil-  $\beta$ -D-ribosa, entonces:
  - R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = Cl, CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>, CO-furano, toluoilo, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, tiofeno o fenilo; o
  - R2= fenilo y R3 = -C≡C-fenilo; o
  - R2 = tiofeno y R3 = -C=C-tiofeno; o
  - R2 = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> y R3 = -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; o
  - R2 = p-fluoro-fenilo y R3 = -C≡C-p-fluoro-fenilo; o
  - R2 = 2-metoxinaftaleno y
  - R3 = -C=C-2-metoxinaftaleno;
- cuando R1 es un grupo tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucosa, entonces R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = I o -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- cuando R1 es un grupo tri-O-benzoil- $\beta$ -L-Ribosa, entonces R2= CO<sub>2</sub>Et y R3= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- cuando R1 es un grupo 2',3'-isopropiliden- $\beta$ -D-ribosa, entonces R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et o tiofeno;
- cuando R1 es un grupo 5'-O-acetyl-2',3'-isopropiliden- $\beta$ -D-ribosa, entonces R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et o tiofeno;
- cuando R1 es un grupo 3',5'-di-O-toluil-2'-desoxi- $\beta$ -D-ribosa, entonces R2= CO<sub>2</sub>Et y R3= -C≡C-CO<sub>2</sub>Et;
- cuando R1 es un grupo 4-metilbencilo, entonces:
  - R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
  - R2= fenilo y R3 = -C≡C-fenilo;
- cuando R1 es un grupo 2-naftil (naftalen-2-ilmetil), entonces:
  - R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = I; o
  - R2= CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
  - R2= Fenilo y R3 = -C≡C-fenilo.

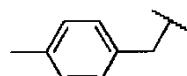
## 4. Compuestos según la reivindicación 3, en los que R1 es

 $\beta$ -D-ribosa

o

tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribosa

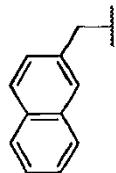
o



50

## 4-metilbencilo

0



5

## 2-naftil(naftalen-2-ilmetilo)

y

- 10 - cuando R1 es un grupo  $\beta$ -D-ribosa, entonces:

- R2 = CONH<sub>2</sub> y R3 = Cl, CO-furano, CO-tiofeno o toluoilo; o
- R2 = CO<sub>2</sub>Me y R3 = I o acetileno; o
- R2 = fenilo y R3 = I;

15

- cuando R1 es un grupo tri-O-acetyl-  $\beta$ -D-ribosa, entonces:

- R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, CO-furano, toluoilo, -C≡C-CO<sub>2</sub>Et, tiofeno o fenilo; o
- R2 = fenilo y R3 = -C≡C-fenilo; o
- R2 = tiofeno y R3 = -C≡C-tiofeno; o
- R2 = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub> y R3 = -C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>; o
- R2 = p-fluoro-fenilo y R3 = -C≡C-p-fluoro-fenilo; o
- R2 = 2-metoxinaftaleno, y
- R3 = -C≡C-2-metoxinaftaleno;

25

- cuando R1 es un grupo 4-metilbencilo, entonces:

- R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
- R2 = fenilo y R3 = -C≡C-fenilo;

30

- cuando R1 es un grupo 2-naftilo (naftalen-2-il-metilo), entonces:

- R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = I; o
- R2 = CO<sub>2</sub>Et y R3 = -C≡C-CO<sub>2</sub>Et; o
- R2 = fenilo y R3 = -C≡C-fenilo.

## 5. Compuestos según la reivindicación 4, siendo dichos compuestos seleccionados de entre:

- 1'-(4-etoxicarbonil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-carbamoil-5-yodo-[1,2,3]-triazol-1-il)- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-metoxicarbonil-5-etinil-[1,2,3]-triazol-1-il)- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1-(naftil-2-metil)-4-etoxicarbonil-5-yodo-1,2,3-triazol;
- 1-(naftil-2-metil)-4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1-(4-metilbencil)-4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-1,2,3-triazol;
- 1'-(4-heptil-5-(non-1-in-1-il)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-benzoyl- $\beta$ -L-ribofuranosa;
- 2'-desoxi-1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-3',5'-di-O-(p-toluoil)- $\alpha$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopiranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa; y
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O\*-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa.

## 6. Compuestos según la reivindicación 5, siendo dichos compuestos seleccionados de entre:

- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etylpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;

60

- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etilpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etilpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden-5'-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa; y
- 1-(4-metilbencil)-4-etoxicarbonil-5-etilpropiolato-1,2,3-triazol.

5 7. Compuestos según la reivindicación 5, siendo dichos compuestos seleccionados de entre;

- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-fenil-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',5'-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosa;
- 1-(4-metilbencil)-4-etoxicarbonil-5-etilpropiolato-1,2,3-triazol;
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-etilpropiolato-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopiranosa; y
- 1'-(4-etoxicarbonil-5-(2-tienil)-[1,2,3]-triazol-1-il)-2',3'-O-isopropiliden- $\beta$ -D-ribofuranosa.

10 8. Compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento de las enfermedades metabólicas.

15 9. Compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento del cáncer.

10. Compuestos según la reivindicación 9, para su utilización en el tratamiento de los tumores sólidos.

20 11. Compuestos según la reivindicación 9, para su utilización en el tratamiento de las hemopatías malignas.

12. Compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC).

25 13. Compuestos según la reivindicación 9, para su utilización en el tratamiento de los cánceres resistentes a los inhibidores de tirosina cinasas.

14. Compuestos según la reivindicación 12, para su utilización en el tratamiento de las leucemias mieloides crónicas (LMC) resistentes a los inhibidores de tirosina cinasas.

30 15. Producto farmacéutico que contiene un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 y por lo menos un segundo principio activo como producto de combinación para una administración simultánea, separada o escalonada en el tiempo, para su utilización en el tratamiento del cáncer.

35 16. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

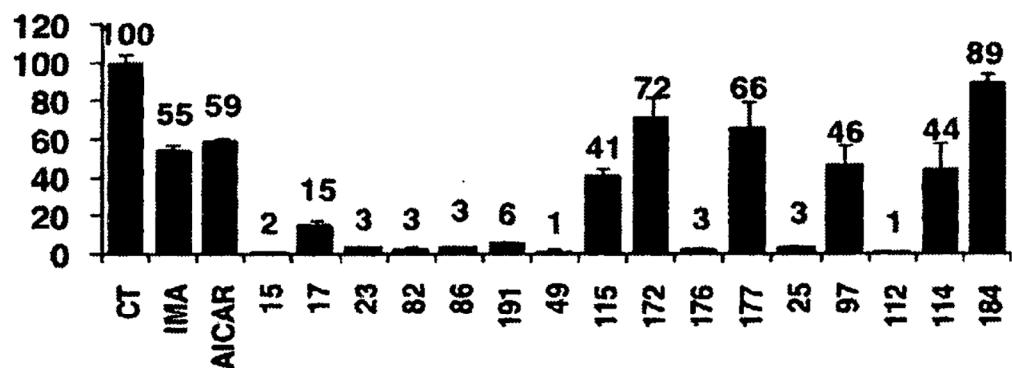


Fig. 1

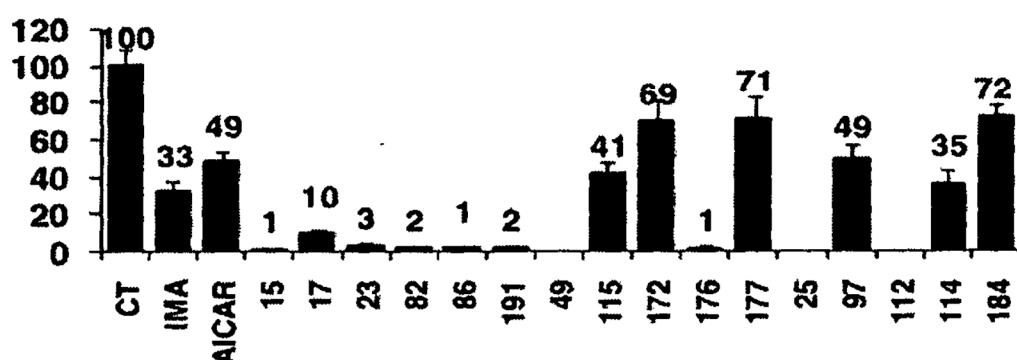


Fig. 2

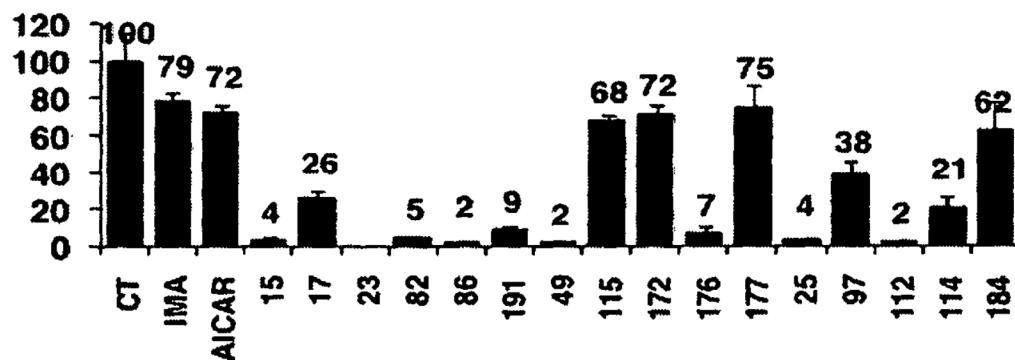


Fig. 3

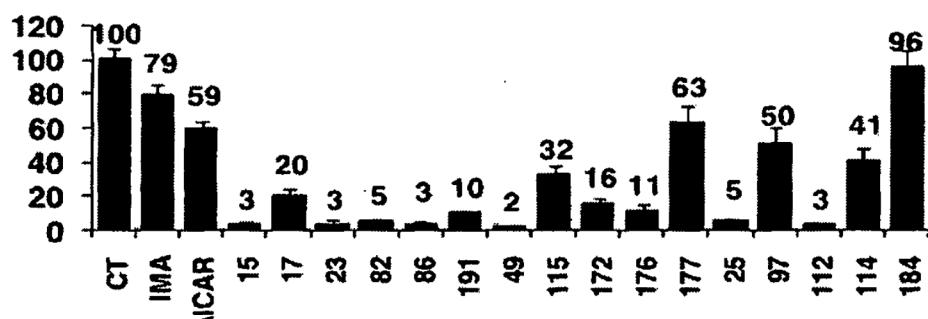


Fig. 4

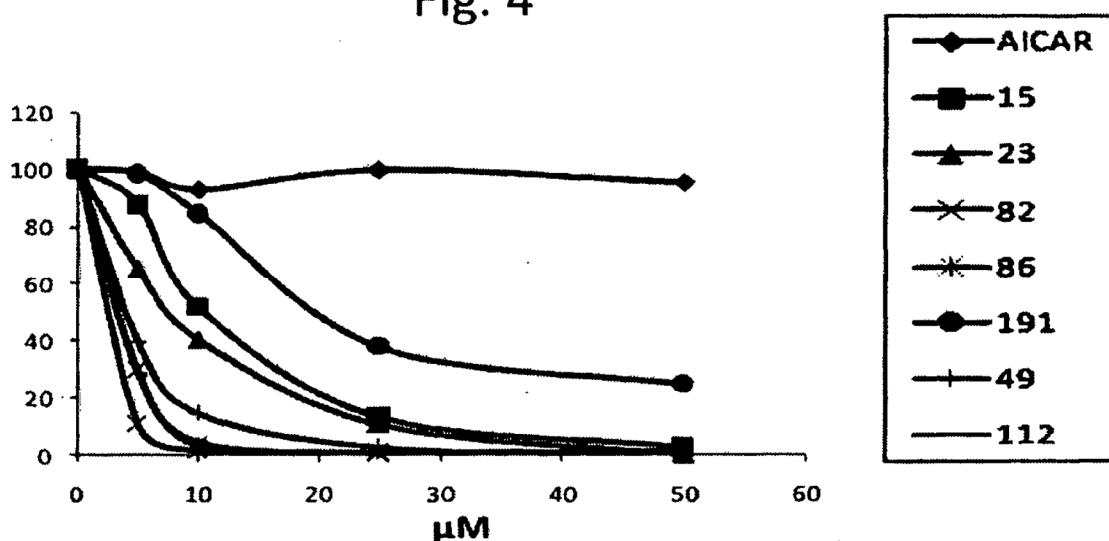


Fig. 5

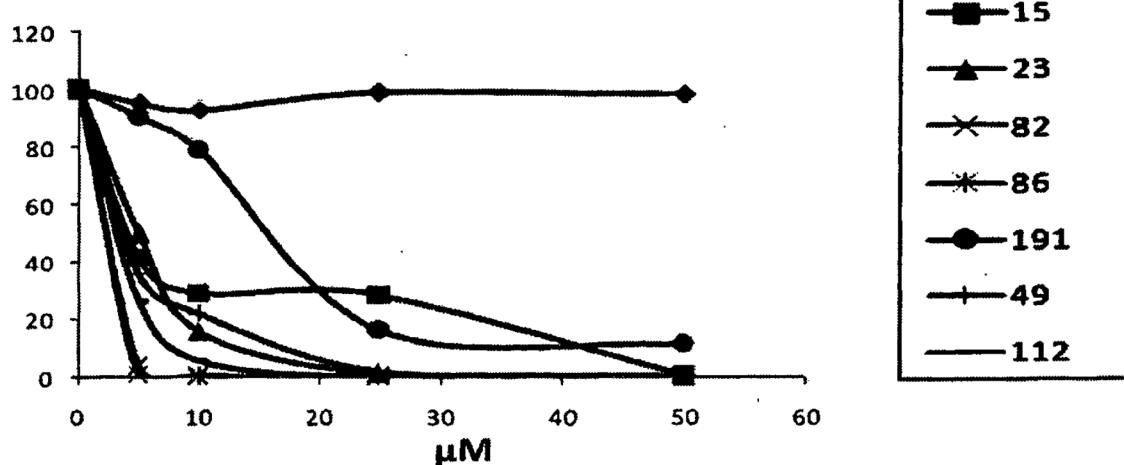


Fig. 6

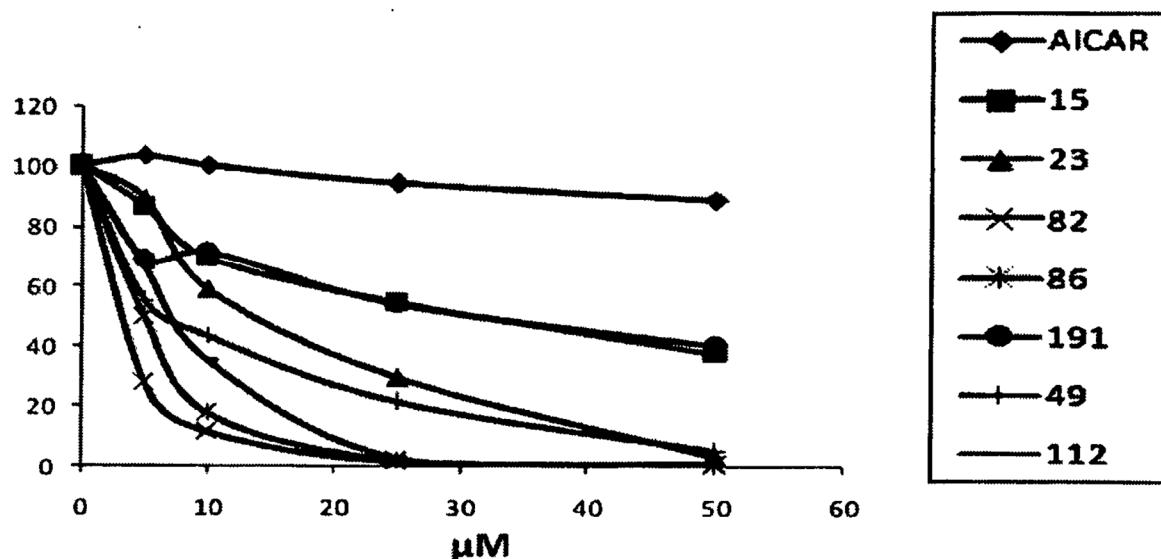


Fig. 7

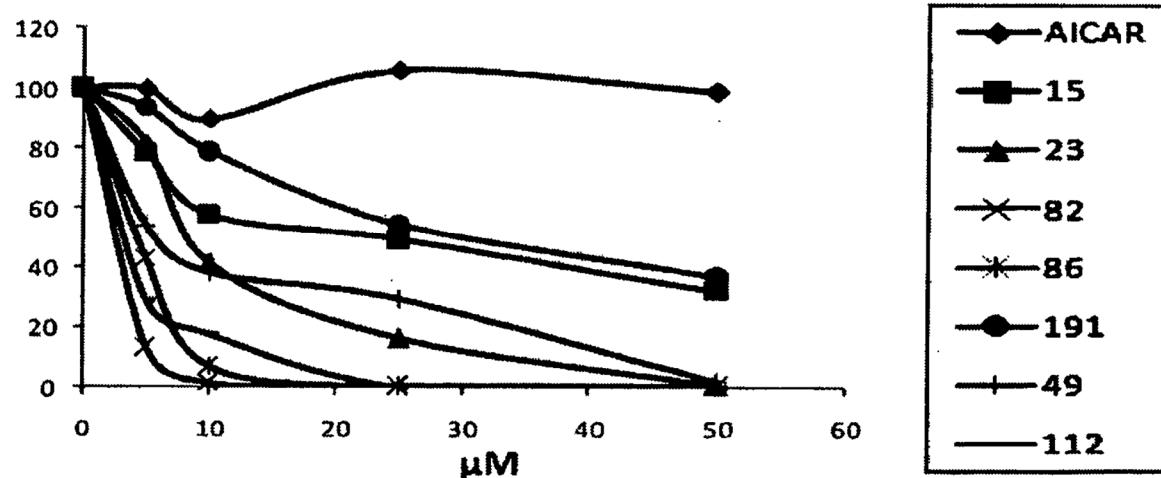


Fig. 8

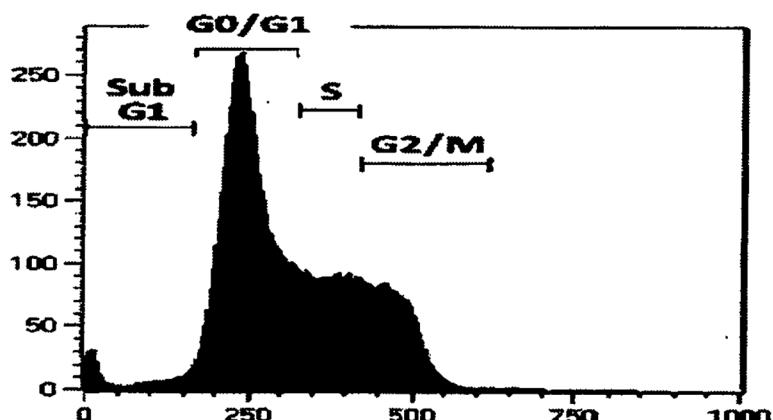


Fig. 9

ES 2 544 542 T3

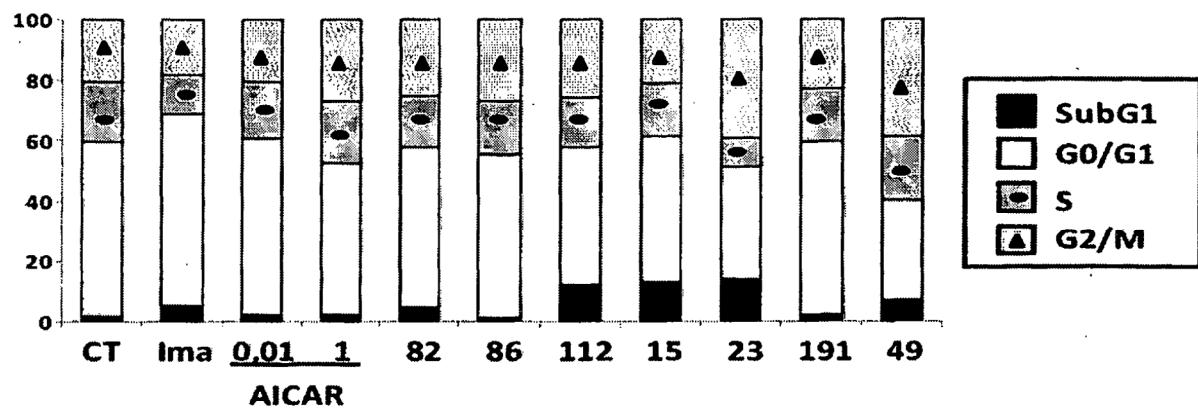


Fig. 10

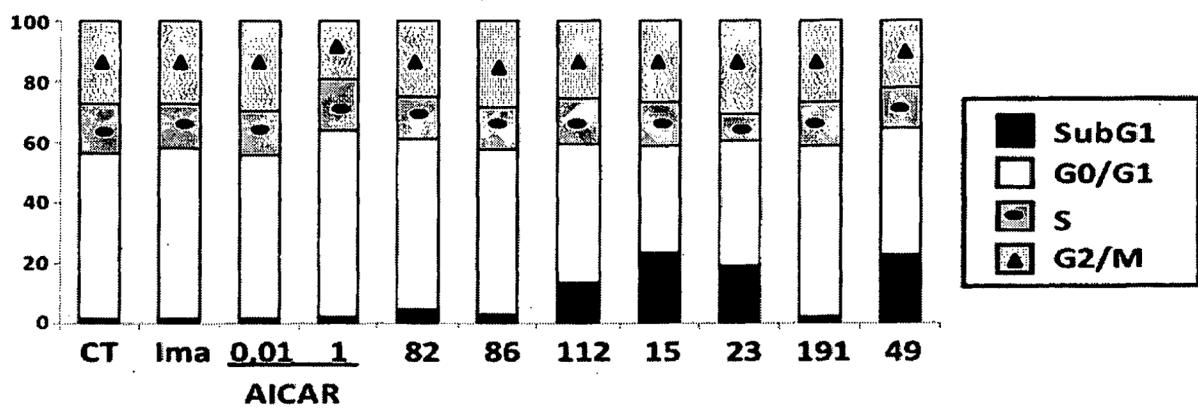


Fig. 11

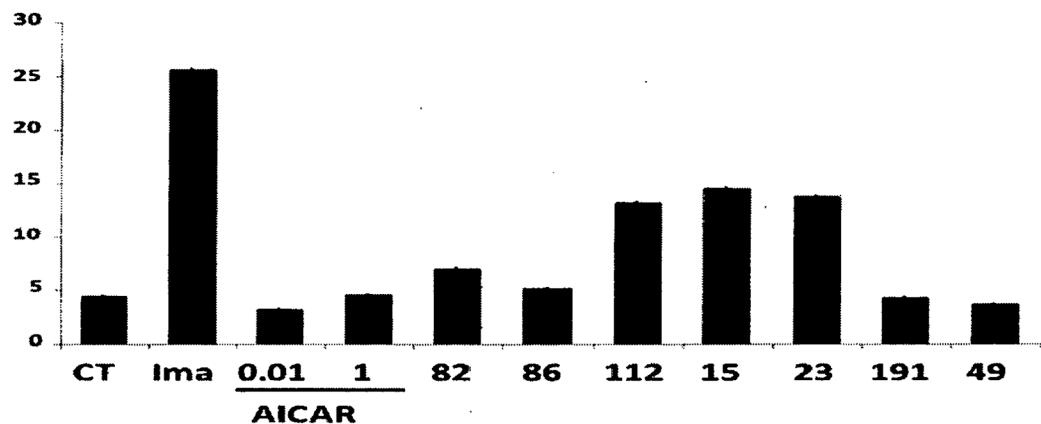


Fig. 12

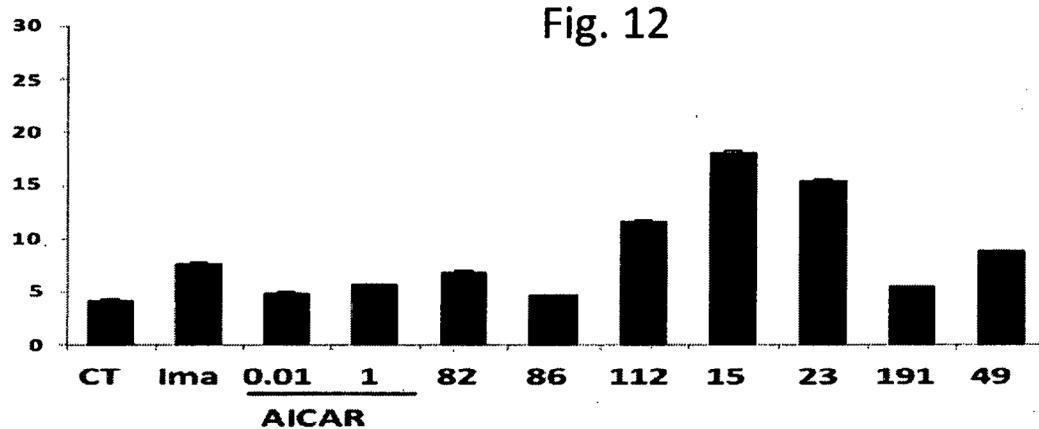


Fig. 13

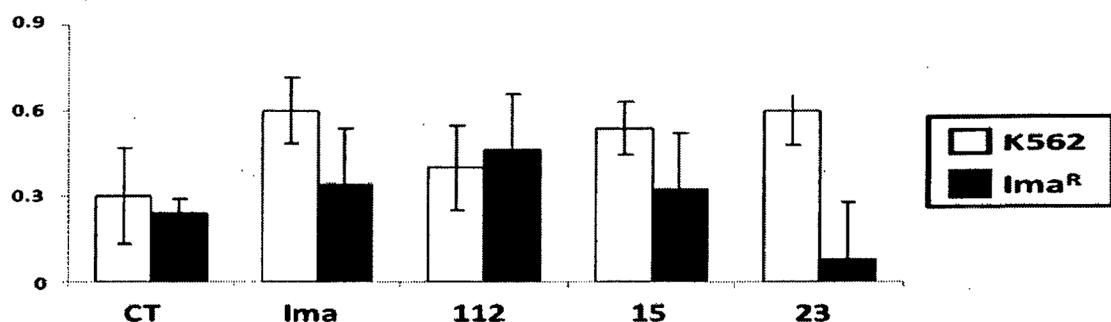


Fig. 14

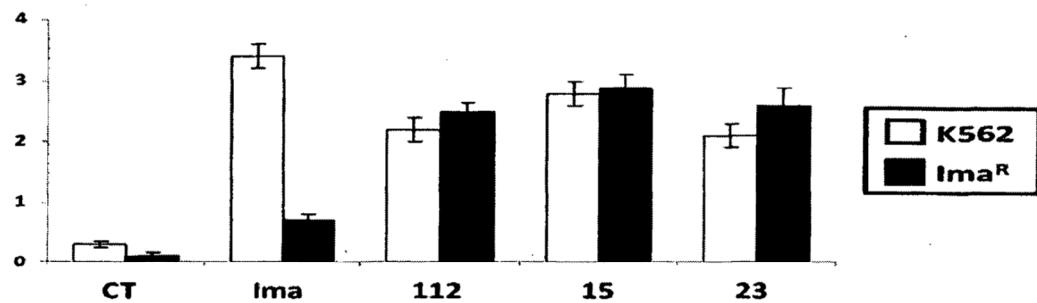


Fig. 15

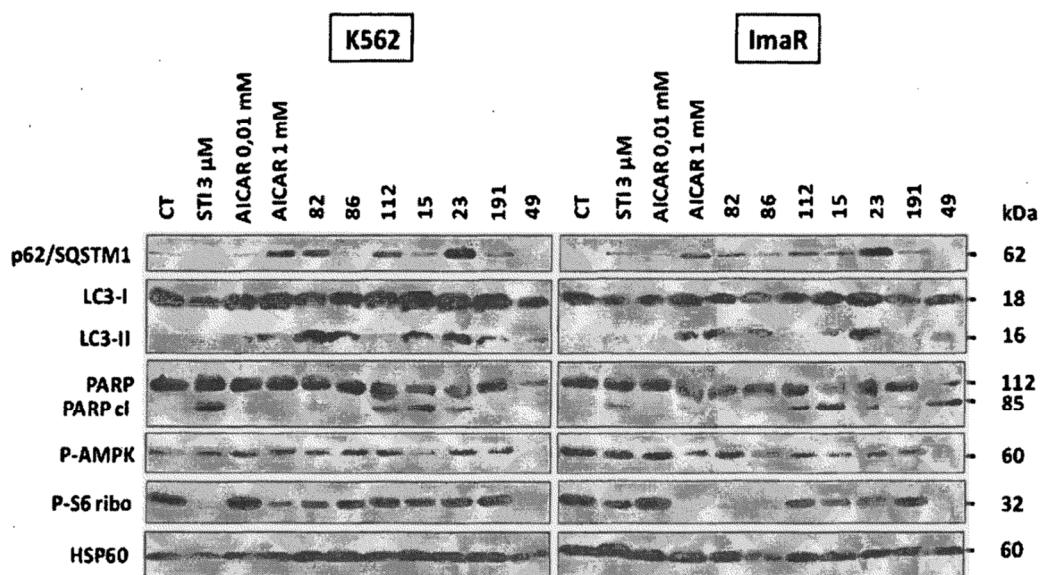


Fig. 16

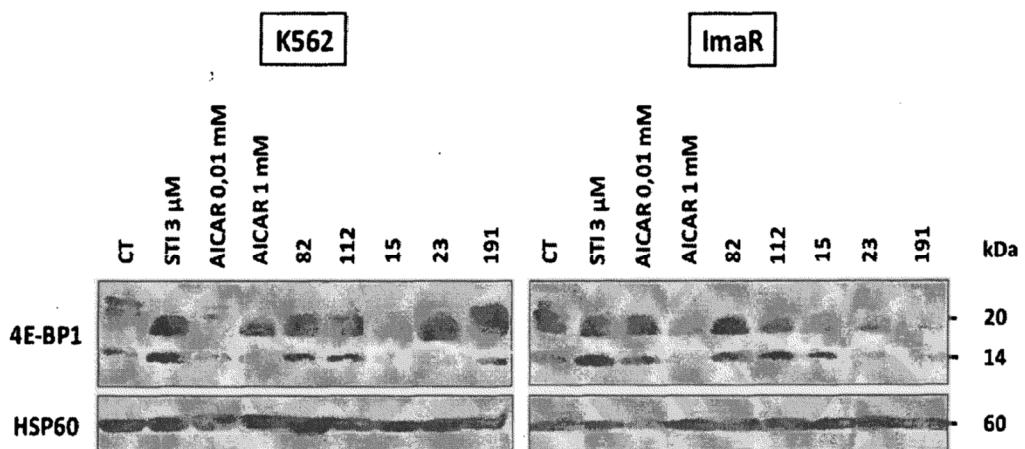


Fig. 17

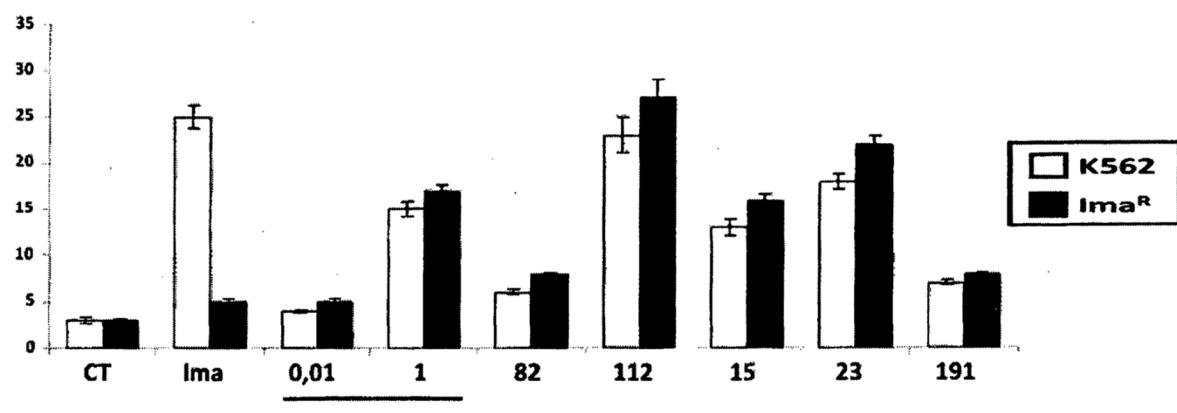


Fig. 18

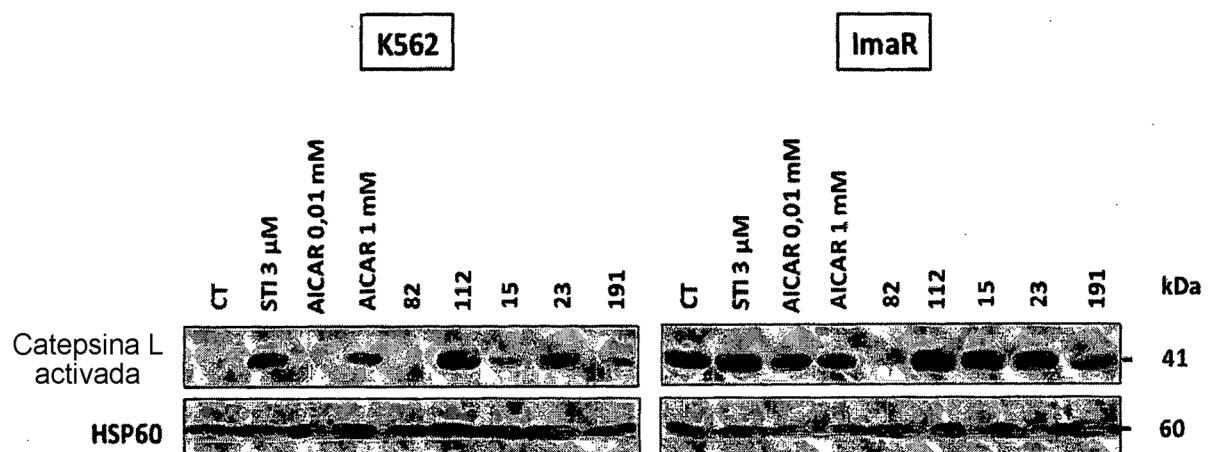


Fig. 19

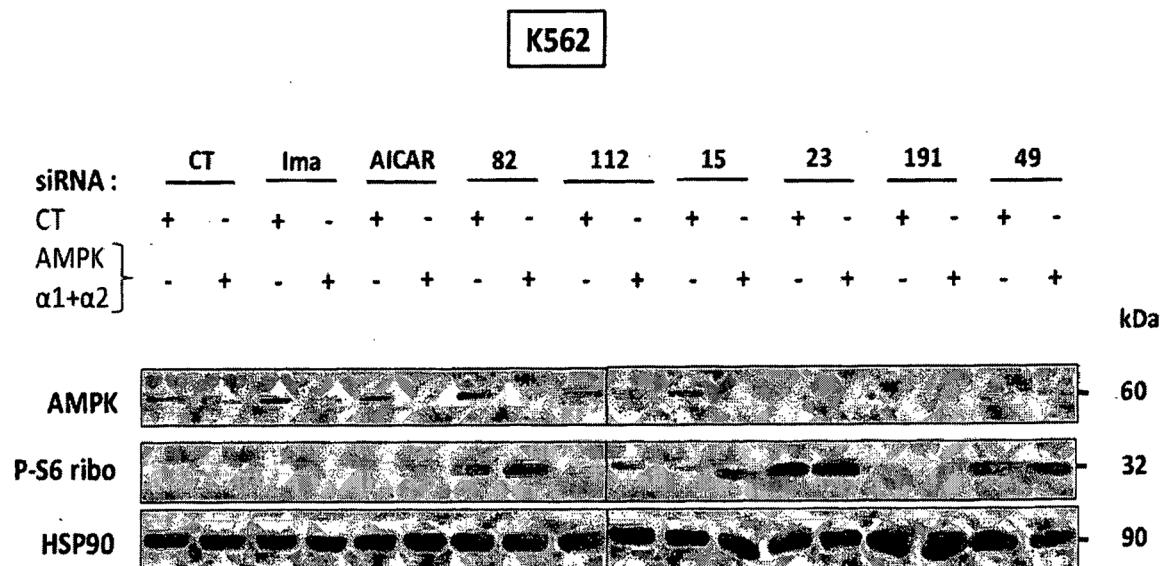


Fig. 20

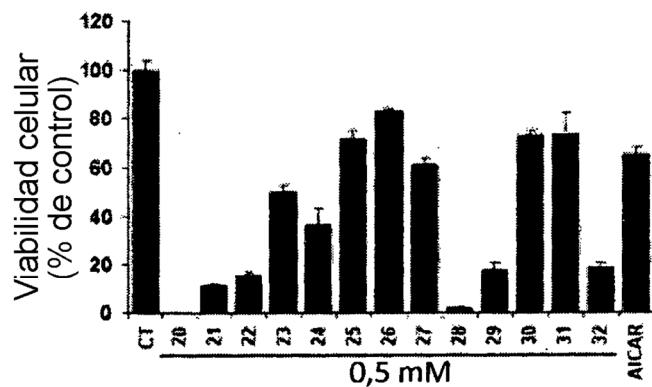


Fig. 21

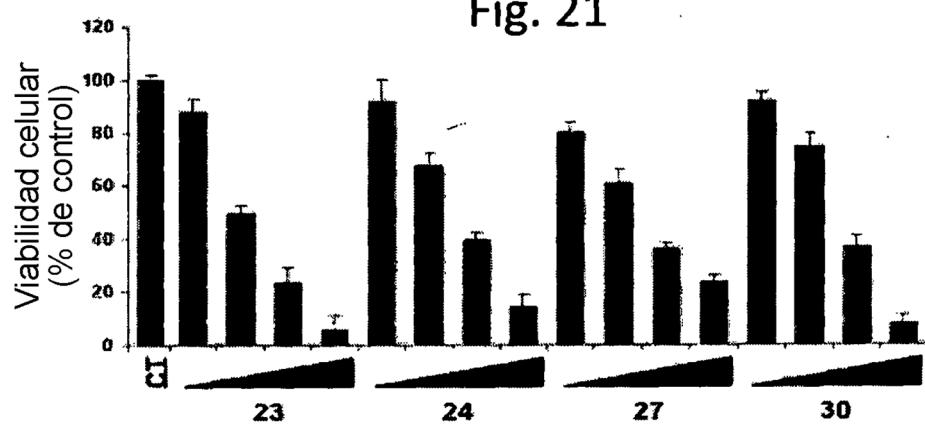


Fig. 22

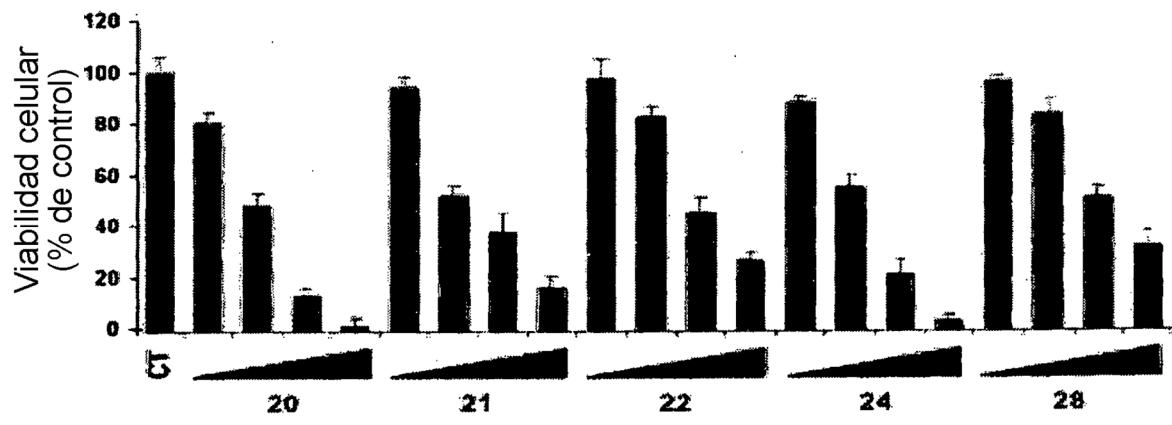


Fig. 23