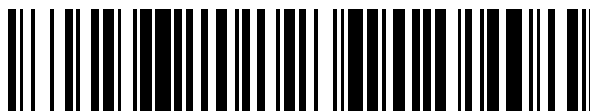


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 611**

51 Int. Cl.:

C07D 295/205 (2006.01)

C07C 311/10 (2006.01)

C07D 295/215 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2004 E 04734821 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 1628965**

54 Título: **Compuestos de hidroxiamidina e hidroxiguanidina como inhibidores de uroquinasa**

30 Prioridad:

26.05.2003 DE 10323898

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.11.2015

73 Titular/es:

**WILEX AG (100.0%)
GRILLPARZERSTRASSE 10
81675 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**SPERL, STEFAN;
BÜRGLER, MARKUS;
SCHMALIX, WOLFGANG;
WOSIKOWSKI, KATJA y
CLEMENT, BERND**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 611 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

Compuestos de hidroxiamidina e hidroxiguanidina como inhibidores de uroquinasa

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos para la inhibición del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) con alta biodisponibilidad y aptitud para administración oral, así como a su empleo como productos activos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas a uroquinasa y/o al receptor de uroquinasa, como por ejemplo tumores y metastatización. La invención se refiere en especial a compuestos que contienen grupos hidroxiamidina o hidroxiguanidina.

10 El activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) juega un papel decisivo en la invasión tumoral y en la formación de metástasis (Schmitt et al., J. Obst. Gyn. 21 (1995), 151-165). uPA se expresa en los más diversos tipos de células tumorales (Kwaan, Cancer Metastasis Rev. 11 (1992), 291-311), y se une al receptor de uPA (uPAR) asociado al tumor, donde tiene lugar la activación de plasminógeno para dar plasmina. Plasmina es apta para degradar diferentes componentes de la matriz extracelular (ECM), como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV. Este activa también otros enzimas que degradan ECM, en especial metaloproteinasas de matriz. Cantidades elevadas de uPA asociado al tumor se correlacionan con un riesgo de metastatización más elevado para pacientes con cáncer (Harbeck et al. Cancer Research 62 (2002), 4617-4622). Por lo tanto, una inhibición de la actividad proteolítica de uPA es un buen punto de partida para una terapia anti-metastática.

Se describen ya algunos inhibidores de uroquinasa activos y selectivos. De este modo, se dan a conocer inhibidores de uPA de tipo benzamidina en el documento EP 1 098 651, inhibidores de uPA de tipo arilguanidina en los documentos WO 01/96286 y WO 02/14349.

20 Stürzebecher et al. (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9 (1999), 3147-3152) dan a conocer inhibidores de uroquinasa a base de 3-amidinofenilalanina. Una característica común de estos inhibidores sintéticos es un resto básico constituido por un grupo amidino y/o guanidino.

25 No obstante, los inhibidores de uroquinasa conocidos presentan el inconveniente de reabsorberse mal en la administración oral, y por consiguiente pueden ejercer apenas una acción farmacológica reducida en el cuerpo con este tipo de aplicación. Por lo tanto, los preparados farmacéuticos se administran al paciente casi siempre una vez, incluso dos veces, semanalmente por vía intravenosa durante un intervalo de tiempo de varias horas. Esto va unido a una elevada carga del paciente, ya que va acompañado de una inversión de tiempo considerable y de frecuentes visitas clínicas, y requiere un alto grado de cooperación del paciente.

30 En el caso de aplicación intravenosa existe además el riesgo de infecciones, y sobre todo en el caso de infundido paravasal saliente se puede llegar a fuertes irritaciones locales, así como a necrosis de tejidos, que hacen necesario, del mismo modo, un tratamiento y control subsiguiente prolongado.

35 Como ya se ha expuesto, los inhibidores de uroquinasa que contienen amidina y guanidina muestran una acción farmacológica apenas reducida en el caso de aplicación oral. Una condición para el efecto terapéutico de un producto activo constituye su biocompatibilidad. De este modo, tras administración oral se debe efectuar una exploración del tracto gastrointestinal. Un mecanismo importante para tal paso de membrana es, en este caso, la difusión pasiva (Gangvar S. et al. DDT (1997) 148-155). En la bibliografía se supuso en parte que la lipofilia de un producto activo juega un papel importante para la difusión pasiva a través de barreras de membrana del tracto gastrointestinal. De este modo, en el documento EP 0 708 640 se describe una modificación de funciones amidina a amidoxima, ésteres de amidoxima y oxadiazol para pentamidinas de acción antihelmíntica, empleándose preferentemente los ésteres de amidoxima y oxadiazol como modificaciones apropiadas.

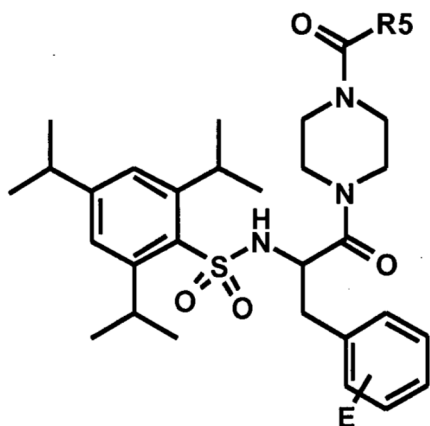
No obstante, por otra parte se mostró que el grado de lipofilia en sí mismo no es suficiente (Hansch et al. J. Am. Chem. Soc. 86 (1984) 1616-1626), y un aumento de la lipofilia de los compuestos no constituye un parámetro apropiado de predicción para el paso de membrana. De este modo, no se pudo verificar una relación directa entre lipofilia y permeación de membrana (Conradi et al., Pharm. Res. 9 (1992) 435-439).

45 Por lo tanto, el aumento de la lipofilia puede incrementar en casos aislados la permeación de membrana, lo que no tiene por consecuencia necesariamente, no obstante, una alta biodisponibilidad oral. De este modo, la transformación del resto básico en la amidoxima como profármaco para argatroban conduce a permeabilidad mejorada, pero adicionalmente a la pérdida de actividad (Rewinkel, Adang Cur. Pharm. Design 5 (1999) 1043-1075). Por consiguiente, no era previsible sin más sí, y en qué modificaciones, se puede mejorar el paso de membrana en el tracto gastrointestinal con un producto activo. Es aún menos previsible qué influencia pueden tener estas modificaciones sobre las propiedades farmacéuticas del producto activo.

Una tarea de la presente invención consistía en la puesta a disposición de nuevos medicamentos para la inhibición de uroquinasa, que poseen claramente una biodisponibilidad y actividad claramente elevada en el

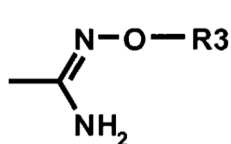
organismo en el caso de administración oral.

Según la invención, esta tarea se soluciona mediante uno o varios compuestos de la fórmula general I

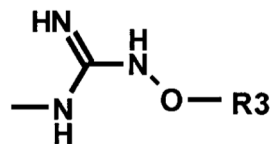


donde

5 E significa un grupo de



(Am)



(Gua)

R³ significa H,

R⁵ significa -OR⁶, -N(R⁶)₂, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alquenilo o C₂-C₆-alquinilo, no sustituido o sustituido, y

10 R⁶ significa H, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alquenilo o C₂-C₆-alquinilo, no sustituido o sustituido, o un resto cíclico,

pudiendo portar cada resto cíclico uno o varios sustituyentes, seleccionados a partir de C₁-C₃-alquilo, C₁-C₃-alcoxi, halógeno, -OR⁶, =O, -NO₂, -CN, -COOR⁶, -N(R⁶)₂, -NR⁶COR⁶, -NR⁶CON(R⁶)₂ y -OCOR⁶,

15 y pudiendo cada alquilo, alquenilo y alquinilo ser de cadena lineal o ramificado, y portar uno o varios sustituyentes, seleccionados a partir de halógeno, -OR⁶, -OCOR⁶, -N(R⁶)₂, -NR⁶COR⁶, -NR⁶CON(R⁶)₂, COOR⁶, o un resto cíclico, o sales de estos compuestos para empleo como medicamento. Este contiene como producto activo uno o varios compuestos de la fórmula general I, así como, en caso dado, soportes habituales para fines farmacéuticos, agentes diluyentes y/o auxiliares.

20 El medicamento es preferentemente un agente administrable por vía oral. El medicamento se emplea de modo especialmente preferente para la inhibición del activador de plasminógeno tipo uroquinasa.

El grupo E se encuentra preferentemente en posición para del anillo de fenilo en el compuesto I. Son especialmente preferentes compuestos de la fórmula general I, donde E es Am.

25 Los compuestos según la invención presentan una función hidroxiguanidino o hidroxiamidino. Tales modificaciones eran conocidas únicamente como productos intermedios de síntesis en la producción de inhibidores de uroquinasa de tipo guanidino o amidino (WO 03/072559 y WO 2004/011449). Hasta el momento no se supuso una eficacia farmacéutica.

Los compuestos se pueden presentar como sales, preferentemente como sales de ácido compatibles desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo sales de ácidos minerales, de modo especialmente preferente como hidroclouros o hidrogenosulfatos, o como sales de ácidos orgánicos apropiados, por ejemplo de ácidos

carboxílicos o sulfónicos orgánicos, como por ejemplo tartratos, mesilatos o besilatos. Son especialmente preferentes los hidrogenosulfatos. Los compuestos se pueden presentar como compuestos ópticamente puros o como mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros.

5 Restos cíclicos pueden contener uno o varios anillos saturados, insaturados o aromáticos. Son ejemplos preferentes de restos cíclicos restos cicloalquilo, restos arilo, restos heteroarilo y restos bicíclicos. Son especialmente preferentes restos mono- o bicíclicos. Los restos cíclicos contienen preferentemente 4 a 30, en especial 5 a 10 átomos de carbono y heteroátomos como átomos de anillo, así como, en caso dado, uno o varios substituyentes como se indican anteriormente. Sistemas heterocíclicos contienen preferentemente uno o varios átomos de O, S o/y N. Sistemas de anillo bicíclicos preferentes son aquellos con un resto -CO.

10 Grupos alquilo, alqueno y alquino contienen preferentemente hasta 4 átomos de carbono. R³ es H. En los compuestos I, R² significa preferentemente -NHR⁶, de modo especialmente preferente -NH-(C₁-C₅)-alquilo, no substituido o substituido, por ejemplo -NHC₂H₅ u -OR⁶, de modo especialmente preferente -O-(C₁-C₃)-alquilo, no substituido o substituido, por ejemplo etiloxi o benciloxi, u -O-arilo, por ejemplo feniloxi.

En el más preferente de los casos, los compuestos son seleccionados a partir de

15 N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiamidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-671),

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiamidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiamidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-683),

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

20 N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida (WX-685),

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,

N-α-(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,

25 o sales de los mismos compatibles desde el punto de vista fisiológico, preferentemente en forma de sales de hidrogenosulfato, de modo especialmente preferente WX-671.HSO₄.

30 Los compuestos según la invención para empleo como medicamento en hombres y animales se pueden emplear, en caso dado, junto con sustancias auxiliares o soportes farmacéuticos apropiados para la producción de medicamentos. En este caso es posible una administración en combinación con otros productos activos, por ejemplo inhibidores de uroquinasa, como por ejemplo anticuerpos y/o péptidos, pero también con productos quimioterapéuticos y citostáticos y/o productos activos citostáticos.

35 Los medicamentos se pueden administrar en hombres y animales por vía tópica, rectal o parenteral, por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, sublingual, nasal y/o inhalativa, por ejemplo en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, aglomerados, supositorios, disoluciones, emulsiones, suspensiones, liposomas, sprays de inhalación o sistemas transdérmicos, como apósitos, y de modo especialmente preferente por vía oral, como formulación de liberación lenta/retardada.

40 Los compuestos según la invención son apropiados para el combate de enfermedades que están asociadas a una sobreexpresión patológica de uPA y/o del receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR). A modo de ejemplo, son aptos para inhibir con eficacia elevada el crecimiento y/o la propagación de tumores malignos, así como la metastatización de tumores. Son ejemplos a tal efecto enfermedades tumorales, por ejemplo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de cérvix, cáncer de ovarios, cáncer de riñón, cáncer de próstata y sarcoma de tejidos blandos, en especial tumores asociados con una alta velocidad de metastatización. En este caso los compuestos se pueden emplear, en caso dado, junto con otros agentes tumorales o con otros tipos de tratamiento, por ejemplo irradiación o/e intervenciones quirúrgicas.

45 Además, los compuestos según la invención son también eficaces para otras enfermedades asociadas a uPA y/o uPAR. Son ejemplos de tales enfermedades, eventualmente, alta presión sanguínea pulmonar y/o

afecciones cardíacas (por ejemplo WO 02100248), enfermedades gástricas e intestinales, como por ejemplo afección intestinal inflamatoria, adenoma de colon premaligno, enfermedades inflamatorias, como por ejemplo artritis séptica, osteoartritis, artritis reumatoide, u otras enfermedades, como osteoporosis, colesteatoma, enfermedades dérmicas y oculares, así como infecciones virales o bacterianas, haciéndose referencia expresamente a las enfermedades citadas en los documentos EP-A-0 691 350, EP-A-1 182 207 y la patente US 5 712 291.

Los compuestos de la fórmula general I se pueden obtener, a modo de ejemplo, como en los esquemas de síntesis en la figura 1, 2 y 3. Los inhibidores de uPA según la invención están caracterizados preferentemente porque presentan una biodisponibilidad al menos 5 veces, preferentemente 10 veces, y de modo especialmente preferente 100 veces más elevada que los correspondientes inhibidores de uroquinasa de esta clase con una función amidino o guanidino no modificada tras administración oral.

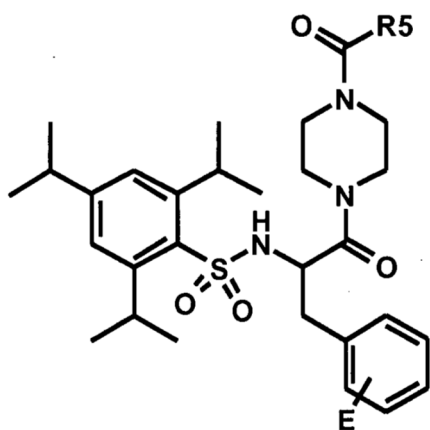
Sorprendentemente se determinó que los inhibidores de uPA presentan no sólo una biodisponibilidad mejorada, sino también una actividad claramente mejorada frente a un tumor primario.

Las sustancias de la fórmula I según la invención se pueden emplear por separado o en combinación con otras sustancias activas desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo con productos radioterapéuticos o con agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo productos quimioterapéuticos, como por ejemplo cis-platino, doxorubicina, 5-fluoruracilo, derivados de taxol, o/y otros agentes quimioterapéuticos, a modo de ejemplo seleccionados a partir del grupo de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, epidofilotoxinas y alcaloides de la vinca. Del mismo modo es posible una combinación con terapias de radiación o/ intervenciones quirúrgicas.

Se describe un procedimiento para la inhibición de uroquinasa en seres vivos, en especial el hombre, mediante administración de una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la fórmula general.

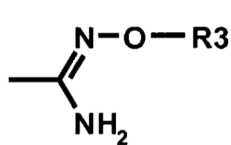
La dosis a administrar depende del tipo y de la gravedad de las enfermedades a tratar. A modo de ejemplo, la dosis diaria se sitúa en el intervalo de 0,01-100 mg/kg de sustancia activa.

Finalmente, la invención se refiere a compuestos de la fórmula I en forma de sales de hidrogenosulfato

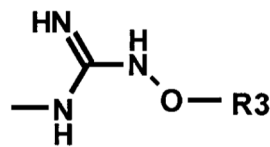


donde

E significa un grupo de



(Am)



(Gua)

R³ significa H, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alquenilo o C₂-C₆-alquinilo, no sustituido o sustituido, o -COR⁶ o -COOR⁶, o un resto oligo- o polialquilenoxi,

pudiendo cada alquilo, alquenilo y alquinilo ser de cadena lineal o ramificado, y portar uno o varios

substituyentes, seleccionados a partir de halógeno, $-OR^6$, $-OCOR^6$, $-N(R^6)_2$, $-NR^6COR^6$, $-NR^6CON(R^6)_2$, $COOR^6$, o un resto cíclico, y

siendo definidos R^5 y R^6 como anteriormente.

La invención se debe explicar más detalladamente por medio de las siguientes figuras y los ejemplos.

- 5 Las figuras 1-4 y 6 muestran esquemáticamente la obtención de compuestos WX-671 (figuras 1 y 2), WX-683 (figura 3) y WX-678 (figuras 4 y 6).

La figura 5 muestra resultados en el modelo de cáncer de mama de rata con la sustancia según la invención WX-671 en comparación con controles.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1: producción de WX-671

1.1 N-acetil-3-ciano-(D/L)-fenilalanina

Se disolvieron bromuro de 3-cianobencilo (935 g; 4,77 moles), acetamidomalonato de dietilo (1036 g; 4,77 moles) y yoduro potásico (20 g), a 98°C bajo argón, en 5 l de dioxano, y se agitaron 5 h. A continuación se añadió gota a gota una disolución de etanolato sódico (340 g; 5 mmoles) en 2 l de etanol durante 3 h. Después se añadieron 4,4 l de NaOH 3 M y se agitó 2 h más a 98°C, y después durante la noche a temperatura ambiente (RT). La disolución se concentró por evaporación a - 2 l en vacío, se añadieron 3 l de agua destilada, y se enfrió a RT. Tras ajuste del valor de pH a > 9 se extrajo 3 veces con 1 l de acetato de etilo. La fase acuosa se llevó a pH 1 con HCl 4M (aproximadamente 4 l de HCl 4M) y se extrajo 4 veces con 1,2 l de acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaCl saturado, se extrajo el disolvente, y se recristalizó a partir de acetato de etilo.

Rendimiento: 815 g (3,5 moles) 73 %.

1.2 3-ciano-(L)-fenilalanina (disociación de racematos)

Se disolvió N-acetil-3-ciano-(D/L)-fenilalanina (696 g; 3 moles) en 2 l de agua y 3 l de NaOH 1 M, se ajustó el valor de pH a 7,2 con aproximadamente 10 ml de HCl 4M, y se temperó a 37°C. Tras adición de 28 g de acilasa I (*Aspergillus Melleus*) se agitó lentamente 60 h a 37°C. Tras filtración del precipitado producido (producto) se concentró por evaporación la disolución a aproximadamente 1,5 l de volumen, y se separó por filtración el precipitado. Las tortas de filtración reunidas se suspendieron en 0,5 l de agua, se agitaron, se filtraron de nuevo, y se secaron en vacío.

Rendimiento: 190 g (33 %), pureza 99 % (HPLC)

- 30 1.3 Triisopropilfenilsulfonil(TIPPS)-3-ciano-(L)-fenilalanina

Se disolvió 3-ciano-(L)-fenilalanina (133 g, 700 mmoles) en 1,2 l de dioxano y 1540 ml de NaOH 1M, y se enfrió a 5°C. Se disolvió cloruro de triisopropilfenilsulfonilo (TIPPS-Cl) (212 g; 700 mmoles) en 1 l de dioxano y se añadió gota a gota durante 1 hora. A continuación se añadió TIPPS-Cl adicional y NaOH, y se agitó hasta que ya no se pudo detectar educto. La disolución de color naranja se acidificó a pH 5 con HCl 4M, y se extrajo 2 veces con MTBE. Las disoluciones orgánicas reunidas se extrajeron 2 veces con disolución de NaCl, y a continuación el disolvente se extrajo en vacío y se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno.

Rendimiento: 302 g (88 %) con 93 % de pureza (HPLC)

1.4 TIPPS-3-ciano-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida

Se disolvieron TIPPS-3-ciano-(L)-fenilalanina (215 g; 0,435 mmoles: 93 % de pureza), etiloxicarbonilpiperazina (68,8 g; 0,435 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (13,3 g; 0,087 mmoles) en 650 ml de DMF, y se enfrió a 10°C. Durante 2 h se añadió gota a gota una disolución de dicitohexilcarbodiimida (98,7 g; 0,478 mmoles) en 216 ml de DMF, y se agitó la disolución de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente se disolvió el residuo en 436 ml de MTBE, se separó el precipitado por filtración, y la disolución orgánica se extrajo respectivamente 2 veces con un 5 % de $KHSO_4$, un 5 % de $NaHCO_3$ y agua destilada. El disolvente se extrajo en vacío, se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno, y el producto se secó en vacío.

Rendimiento: 261 de producto sólido amarillo claro (90 %) con un 90 % de pureza (HPLC)

1.5 TIPPS-3-hidroxiamidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-671)

5 Se disolvieron TIPPS-3-ciano-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (130 g; 196 mmoles; 90 % de pureza), hidrocloreto de hidroxilamina (22 g; 313 mmoles) y trietilamina (63 g, 626 mmoles) en 470 ml de etanol, y se agitó 1 día a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente se absorbió el residuo en 300 ml de acetato de etilo, y se extrajo respectivamente 2 veces con un 5 % de KHSO_4 , un 5 % de NaHCO_3 y agua destilada. Tras extracción del disolvente se secó el producto crudo en vacío, y a continuación se recrystalizó a partir de acetato de etilo/éter.

Rendimiento: 63 g (50 %) de polvo blanco con un 97 % de pureza (HPLC).

10 Ejemplo comparativo 2: obtención de WX-678

2.1 Hidrocloreto de H-Gly-4-nitrobencilamida

15 Se disolvieron hidrocloreto de 4-nitrobencilamina (1 g; 5,3 mmoles) y diisopropiletilamina (1,8 ml; 10,6 mmoles) a temperatura ambiente en 70 ml de diclorometano. Se añadió BOC-Gly-OSu (1,44 g; 5,3 mmoles) y se agitó la disolución durante la noche a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente en el evaporador rotativo se absorbió el residuo en 50 ml de acetato de etilo, y se extrajo respectivamente 2 veces con un 5 % de KHSO_4 , un 5 % de NaHCO_3 y agua destilada. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , y el disolvente se extrajo y se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno. El aceite producido se disolvió directamente en 15 ml de HCl 4M/dioxano sin elaboración subsiguiente, y se agitó a temperatura ambiente. Tras un tiempo breve, el producto comienza a precipitar. Después de 1 h se extrajo el disolvente, se suspendió el producto sólido en 100 ml de acetato de etilo, se separó por filtración y se lavó con éter de petróleo. El producto sólido blanco se secó en vacío.

Rendimiento: 1,17 g (90 %)

2.2 Fmoc-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida

25 Se disolvieron hidrocloreto de H-Gly-4-nitrobencilamida (1,17 g; 4,77 mmoles), Fmoc-(D)-Ser(tBu)-OH (1,83 g; 4,77 mmoles) y diisopropiletilamina (2,5 ml; 14,3 mmoles) en 40 ml de DMF:diclorometano 1 : 1. Tras adición de PyBOP (2,73 g; 5,25 mmoles) se agitó la disolución a temperatura ambiente. Después de 2,5 h se extrajo completamente el disolvente en alto vacío, y el residuo se disolvió en 300 ml de diclorometano y se extrajo 2 veces con TIPPS-3-amino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida y 1 vez con NaCl concentrado. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , el disolvente se extrajo y se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno. El producto se secó en alto vacío.

2.3 Hidrocloreto de H-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida

35 Se suspendió Fmoc-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida (3,1 g) en 100 ml de diclorometano, y se añadieron 5 g de resina de piperazinometil-poliestireno (= 5,5 mmoles de piperazina). Después de 1 hora no se produjo ninguna reacción, y se añadieron 5 mmoles de diisopropiletilamina (856 μl). Después de un día tampoco se produjo aún una reacción, y se añadió de nuevo diisopropiletilamina (5 mmoles; 856 μl), y la suspensión se concentró por evaporación en el evaporador rotativo a aproximadamente un 20 % de volumen original. Después de 5 días se había formado aproximadamente un 50 % de producto, se añadió de nuevo diisopropiletilamina (5 mmoles; 856 μl), y se mezcló la disolución con 20 ml de DMF para aumentar la solubilidad. Después de otros 6 días se separó la resina por filtración y se extrajo el disolvente. El aceite remanente se trató en baño ultrasónico con éter de petróleo y se separó por decantación. El proceso se repitió con dietiléter para separar el producto secundario dibenzofulveno. A continuación se disolvió el aceite en 30 ml de diclorometano y se precipitó el producto con una disolución de 2 ml de HCl 4M/dioxano en 20 ml de diclorometano. La precipitación se completó con 50 ml de éter de petróleo, la disolución saliente se separó por decantación, y el precipitado se secó en vacío.

45 Rendimiento: 1,68 g de polvo amarillo claro (90 % para las dos últimas etapas de síntesis).

2.4 Bencilsulfonil-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida

Se disolvieron 1,68 g de hidrocloreto de H-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida (4,32 mmoles) y diisopropiletilamina (2,22 ml; 12,96 mmoles) en 80 ml de diclorometano. Tras adición de cloruro de bencilsulfonilo (824 mg; 4,32 mmoles) se agitó a temperatura ambiente. Después de 3,5 h se añadió de nuevo

5 cloruro de bencilsulfonilo (100 mg) y diisopropiletilamina (500 µl) para completar la reacción. Después de otras 2 h se extrajo el disolvente, se absorbió el residuo en 130 ml de acetato de etilo, se extrajo la disolución respectivamente 2 veces con un 5 % de NaHCO₃ y un 5 % de KHSO₄, y una vez con NaCl concentrado. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, el disolvente se extrajo y se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno. El producto se secó en alto vacío.

Rendimiento: 1,85 g de polvo amarillo claro (84 %)

2.5 Bencilsulfonil-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-aminobencilamida

10 Se disolvieron 1,85 g de bencilsulfonil-(D)-Ser(tBu)-Gly-4-nitrobencilamida (3,65 mmoles) en 50 ml de metanol, y se hidrogenaron sobre Pd/C. Después de 8 h se separó por filtración el catalizador, se extrajo el disolvente, se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno, y se disolvió el producto crudo en poco diclorometano. En la extracción del disolvente en el evaporador rotativo, el producto se espumó y solidificó en alto vacío.

Rendimiento: 1,6 g de polvo amarillo claro (92 %)

2.6 Hidrocloruro de bencilsulfonil-(D)-Ser-Gly-4-aminobencilamida

15 Para la disociación del grupo protector terc-butilo se suspendió bencilsulfonil-(D)-Ser-(tBu)-Gly-4-aminobencilamida (1 g) en 20 ml de HCl 4M/dioxano, y se agitó a temperatura ambiente. Después de 7 h, el disolvente se extrajo en vacío, se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno, y el producto se secó en vacío.

Rendimiento: 1,07 g de producto altamente puro (cuantitativo)

2.7 Bencilsulfonil-(D)-Ser-Gly-4-cianaminobencilamida

20 Se disolvieron hidrocloruro de bencilsulfonil-(D)-Ser-Gly-4-aminobencilamida (500 mg; 1,09 mmoles), acetato sódico (224 mg; 2,725 mmoles) y bromociano (127 mg; 1,2 mmoles) en etanol absoluto, desecado sobre tamiz molecular, y se agitó 3 h a temperatura ambiente. La disolución se enfrió en baño de hielo y las sales precipitadas se separaron por filtración. La disolución se empleó directamente en el siguiente paso de reacción.

2.8 Bencilsulfonil-(D)-Ser-Gly-4-hidroxiguanidinobencilamida

25 A la disolución etanólica de producto crudo de bencilsulfonil-(D)-Ser-Gly-4-cianaminobencilamida se añadió hidrocloruro de hidroxilamina (83,4 mg; 1,2 mmoles) y diisopropiletilamina (195 µl; 1,2 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a 0°C. Las sales precipitadas se separaron por filtración y el disolvente se extrajo. El producto se purificó a través de HPLC en fase inversa.

30 Rendimiento: 120 mg (0,25 mmoles; 21 %); pureza (HPLC): 95 %: ESI-MS: m/z = 479,0 (M+H⁺); calculado para C₂₀H₂₆N₆O₆S₁: 478

Ejemplo 3: producción de WX-683

3.1 N-acetil-3-nitro-(D/L)-fenilalanina

35 Se disolvieron bromuro de 3-nitrobencilo (1000 g; 4,63 moles), acetamidomalonato de dietilo (1005 g; 4,63 moles) y yoduro potásico (20 g) a 98°C bajo argón en 4 l de dioxano, y se agitó 5 h. A continuación se añadió gota a gota una disolución de etanolato sódico (340 g; 5 mmoles) en 2 l de etanol durante 3 h. A continuación se añadieron 550 g de NaOH (13,75 moles) y se agitó 2 h más a 98°C, y después durante la noche a temperatura ambiente. La disolución se concentró por evaporación en vacío a 2 l, se añadieron 3 l de agua destilada y se enfrió a temperatura ambiente. Tras ajuste del valor de pH a > 9 se extrajo tres veces con 1 l de acetato de etilo. La fase acuosa se llevó a pH 1 con HCl 4M (aproximadamente 4 l de HCl 4M), y se extrajo 4 veces con 1,2 l de acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaCl saturado, el disolvente se extrajo y se recristalizó a partir de acetato de etilo.

Rendimiento: 1011 g (3,2 moles) 69 %

3.2 3-nitro-(L)-fenilalanina (disociación de racematos)

45 Se disolvió N-acetil-3-nitro-(D/L)-fenilalanina (1000 g; 3,17 moles) en 2 l de agua y 3 l de NaOH 1M, se ajustó el valor de pH a 7,2 con aproximadamente 10 ml de HCl 4M, y se temperó a 37°C. Tras adición de 28 g acilasa l

(*Aspergillus Melleus*) se agitó lentamente 60 h a 37°C. Tras filtración del precipitado formado (producto), la disolución se concentró por evaporación a aproximadamente 1,5 l de volumen, y el precipitado se separó por filtración. Las tortas de filtración reunidas se suspendieron en 0,5 l de agua, se agitaron, se filtraron de nuevo y se secaron en vacío.

5 Rendimiento: 245 g (37 %), pureza: 99 % (HPLC)

3.3 TIPPS-3-nitro-(L)-fenilalanina

10 Se disolvió 3-nitro-(L)-fenilalanina (210 g, 1 mol) en 1,2 l de dioxano y 500 ml de NaOH 4M, y se enfrió a 5°C. Se disolvió TIPPS-Cl (363 g; 1,2 moles) en 1 l de dioxano, y se añadió gota a gota durante 1 h. A continuación se añadió TIPPS-Cl y NaOH adicional, y se agitó hasta que ya no se pudo detectar educto. La disolución de color naranja se acidificó a pH 5 con HCl 4M y se extrajo 2 veces con MTBE. Las disoluciones orgánicas reunidas se extrajeron 2 veces con disolución de NaCl, y a continuación el disolvente se extrajo en vacío y se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno.

Rendimiento: 427 g (68 %) con un 76 % de pureza (HPLC)

3.4 TIPPS-3-nitro-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida

15 Se disolvieron TIPPS-3-nitro-(L)-fenilalanina (210 g; 0,44 mmoles; 76 % de pureza), etiloxicarbonilpiperazina (69,7 g; 0,44 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (101 g; 660 mmoles) en 650 ml de DMF, y se enfrió a 10°C. Durante 2 h se añadió gota a gota una disolución de dicitohexilcarbodiimida (100 g; 0,484 mmoles) en 216 ml de DMF, y se agitó la disolución de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente se disolvió el residuo en 436 ml de MTBE, se separó el precipitado por filtración, y la disolución orgánica se extrajo 2 veces con un 5 % de KHSO₄, un 5 % de NaHCO₃ y agua destilada. El disolvente se extrajo en vacío, se evaporó por rotación adicionalmente con tolueno, y el producto se secó en vacío.

20

Rendimiento: 278 de resina marrón (70 %) con un 69 % de pureza (HPLC)

3.5 TIPPS-3-amino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida

25 Se disolvió TIPPS-3-nitro-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (157 g; 176 mmoles) en 800 ml de etanol, se mezcló con 19,7 g de paladio al 10 % sobre carbón activo y se hidrogenó 3 días bajo paso lento de hidrógeno. Tras separación por filtración del catalizador, el disolvente se extrajo en vacío y el producto crudo se purificó mediante cromatografía a través de gel de sílice.

Rendimiento: 21 g (38 %) con un 95 % de pureza (HPLC)

3.6 TIPPS-3-cianamido-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida

30 Se disolvieron TIPPS-3-amino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (14,6 g; 24,9 mmoles), acetato sódico (anhidro) (5,11 g; 62,2 mmoles) y bromociano (2,9 g; 27,4 mmoles) en etanol, y se agitó la disolución 10 h a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente se disolvió el residuo en acetato de etilo, y la disolución se extrajo con un 5 % de KHSO₄, un 5 % de NaHCO₃ y agua destilada. Tras extracción del disolvente se purificó el producto crudo mediante cromatografía a través de gel de sílice.

35 Rendimiento: 10 g (60 %) con un 92 % de pureza

3.7 TIPPS-2-hidroxiguanidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonil-piperazida (WX-683)

40 Se disolvieron TIPPS-3-cianamido-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (9,3 g; 15 mmoles), hidrocloreuro de hidroxilamina (1,15 g; 16,5 mmoles) y diisopropiletilamina (3,87 g; 30 mmoles) en etanol, y se agitó la disolución durante la noche a temperatura ambiente. Tras extracción del disolvente se purificó el producto crudo mediante cromatografía a través de gel de sílice.

Rendimiento: 3,87 g (39 %); pureza 98 % (HPLC)

Ejemplo 4: ensayo in vivo del profármaco inhibidor de uPA WX-671 en propagación tumoral, crecimiento tumoral y metastatización en la rata

Modelo de cáncer de mama

- 5 Se implantaron fragmentos de cáncer de mama BN472 de 10-25 mm³ de tamaño (Kort et al., J. Natl. Cancer Inst 72, 709-713, 1984), procedente de un animal donante, bajo el panículo de una glándula mamaria de grupos (n = 15 por grupo) de ratas de Noruega hembra de 7-8 semanas de edad. Los tratamientos comenzaron 72 h tras el implante del tumor, y se repitieron diariamente hasta la muerte de los animales después de 30 días. El grupo de control (A) recibió 0,75 ml de disolución de sustancia soporte exenta de sustancia, constituida por un 5 % de etanol, un 5 % de D-manitol y un 5 % de Tween 20 en agua, por vía oral a través de una cánula de intubación. Los grupos de tratamiento (B y C) recibieron por vía oral, a través de cánula de intubación, en un volumen de 0,75 ml, 1 mg/kg (grupo B) o 5 mg/kg (grupo C) de WX-671 en disolución de sustancia soporte. El grupo comparativo 1 recibió 1 mg/kg de WX-UK 1 disuelto en un 5 % de D-manitol por inyección intraperitoneal.
- 10 El crecimiento de los tumores inoculados se determinó dos veces semanalmente con un calibrador en las dimensiones longitud y anchura. Tras la muerte de los animales se determinaron puntos finales de terapia, peso de tumor, pesos de ganglios linfáticos axilares e intraperitoneales, así como el número de metástasis pulmonar macroscópica.

Resumen de los resultados

- 15 En todos los ensayos, mediante el tratamiento con WX-671, se consiguió una reducción considerable de tamaño de tumor, o bien del peso de tumor, y del número, o bien masa de tumores secundarios en comparación con el grupo de control. En el modelo de tumor de mama, en el grupo tratado con WX-671, los pesos de tumor medios al final del tratamiento se habían reducido en más de un 66 % (p.o.) en comparación con el control, mientras que con el tratamiento con sustancia comparativa inhibidora WX-UK 1 i.p. se consiguió apenas una reducción
- 20 de aproximadamente un 5 %. El número focos pulmonares en grupos tratados con profármaco inhibidor se había reducido en un 42 % (p.o.) y los pesos medios de ganglios linfáticos axilares se había reducido en más de un 63 % (p.o.) (figura 5).

- 25 El desarrollo de aumento de peso corporal y la comparación de pesos de órgano entre grupos tratados con inhibidor y vehículo no advertían de una eventual toxicidad considerable del inhibidor bajo las condiciones descritas.

Ejemplo 5: producción y caracterización de hidrogenosulfato WX-671

Producción

- 30 Se disolvieron 6,0 g de base libre WX-671 en 50 ml de acetona, se añadieron 1,25 equivalentes molares de H₂SO₄. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El hidrogenosulfato se separó de la disolución por cristalización. Tras eliminación del disolvente se secó bajo vacío el producto sólido blanco remanente.

Caracterización

- La solubilidad en agua de hidrogenosulfato a 25°C era 1172,5 mg/l (calculado como base). La pureza era ≥ 98 % (% de superficie según HPLC).

- 35 Se agitaron 5 g de hidrogenosulfato en 25 ml de agua/acetona (80/20) durante 7 días, se filtró y se secó durante 60 h a temperatura ambiente. La estequiometría medida mostraba que la sal era estable frente a una disociación.

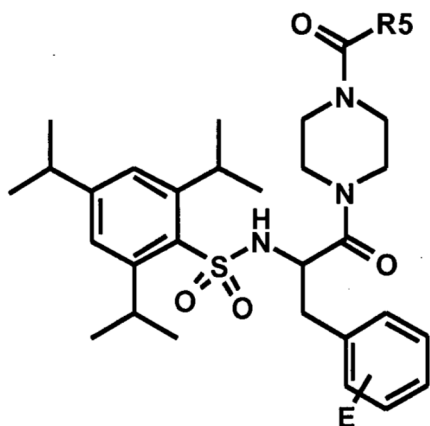
Tras la agitación no se halló un aumento del contenido en impurezas orgánicas (determinación mediante HPLC).

Tras almacenaje durante 1 semana a 90°C como sustancia sólida se halló < 1,5 % de impurezas orgánicas (determinación mediante HPLC).

- 40 En base a los anteriores resultados, el hidrogenosulfato es extraordinariamente apropiado para la obtención de preparados farmacéuticos.

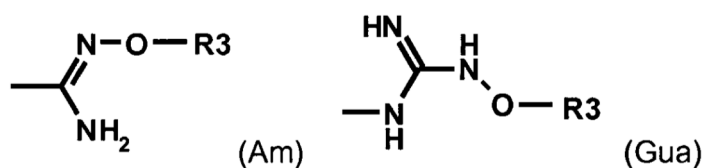
REIVINDICACIONES

1.- Compuestos de la fórmula general I



donde

5 E significa un grupo de



R³ significa H,

R⁵ significa -OR⁶, -N(R⁶)₂, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alqueno o C₂-C₆-alquino, no sustituido o sustituido, y

10 R⁶ significa H, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alqueno o C₂-C₆-alquino, no sustituido o sustituido, o un resto cíclico,

pudiendo portar cada resto cíclico uno o varios sustituyentes, seleccionados a partir de C₁-C₃-alquilo, C₁-C₃-alcoxi, halógeno, -OR⁶, =O, -NO₂, -CN, -COOR⁶, -N(R⁶)₂, -NR⁶COR⁶, -NR⁶CON(R⁶)₂ y -OCOR⁶,

15 y pudiendo cada alquilo, alqueno y alquino ser de cadena lineal o ramificado, y portar uno o varios sustituyentes, seleccionados a partir de halógeno, -OR⁶, -OCOR⁶, -N(R⁶)₂, -NR⁶COR⁶, -NR⁶CON(R⁶)₂, COOR⁶, o un resto cíclico, o sales de estos compuestos, así como, en caso dado, soportes, diluyentes y/o agentes auxiliares habituales desde el punto de vista farmacéutico, para empleo como medicamento.

2.- Compuestos según la reivindicación 1, seleccionados a partir de

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiamidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-671),

20 N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiamidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiamidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-683),

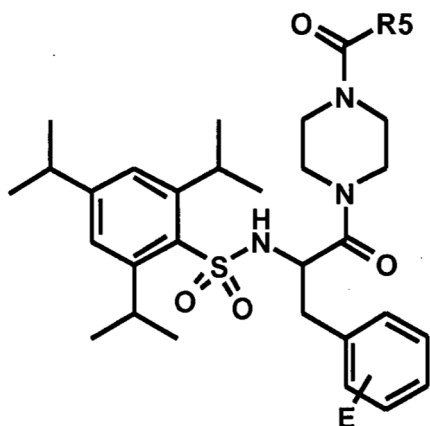
N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

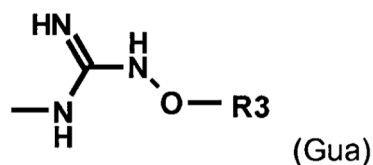
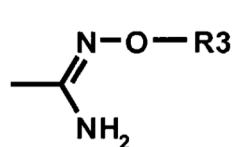
25 N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida (WX-685),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,
 N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,
 o sales de las mismas compatibles desde el punto de vista fisiológico.

- 5 3.- Compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizados por que se trata de un agente de administración oral.
- 4.- Compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por que los compuestos se presentan en forma de hidrogenosulfatos.
- 5.- Compuestos según la reivindicación 4, donde el compuesto es hidrogenosulfato de N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazinio (WX-671 . HSO₄).
- 10 6.- Empleo de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 5 para la obtención de una composición farmacéutica para el combate de enfermedades, que están asociadas a una sobreexpresión patológica de uroquinasa y/o receptor de uroquinasa.
- 7.- Empleo según la reivindicación 6 para el tratamiento o prevención de tumores.
- 8.- Empleo según la reivindicación 7 para el tratamiento o prevención de la formación de metástasis.
- 15 9.- Empleo según la reivindicación 8 para el combate de tumores primarios.
- 10.- Empleo según una de las reivindicaciones 6 a 9, donde se obtiene una composición administrable por vía oral.
- 11.- Empleo según una de las reivindicaciones 6 a 10, donde la composición se obtiene en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, aglomerados, disoluciones, emulsiones y/o suspensiones.
- 20 12.- Compuestos de la fórmula I en forma de sales de hidrogenosulfato



donde E significa un grupo de



- 25 R³ significa H, C₁-C₆-alquilo, C₂-C₆-alquenoilo o C₂-C₆-alquiniilo, no sustituido o sustituido, o -COR⁶ o -COOR⁶, o un resto oligo- o polialquilenoxi,

pudiendo cada alquilo, alquenoilo y alquiniilo ser de cadena lineal o ramificado, y portar uno o varios

substituyentes, seleccionados a partir de halógeno, $-OR^6$, $-OCOR^6$, $-N(R^6)_2$, $-NR^6COR^6$, $-NR^6CON(R^6)_2$, $COOR^6$, o un resto cíclico, y

siendo definidos R^5 y R^6 como en la reivindicación 1.

13.- Compuestos según la reivindicación 12, seleccionados a partir de

5 N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiimidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-671),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiimidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiimidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-683),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

10 N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida (WX-685),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-fenilalanin-4-etilaminocarbonilpiperazida,

en forma de sales de hidrogenosulfato.

15 14.- Compuestos según una de las reivindicaciones 12 a 13,

donde el compuesto es hidrogenosulfato de N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-hidroxiimidino-(L)-fenilalanin-4-etoxicarbonilpiperazinio (WX-671 . HSO_4).

Siguen 6 hojas de dibujos

Figura 2

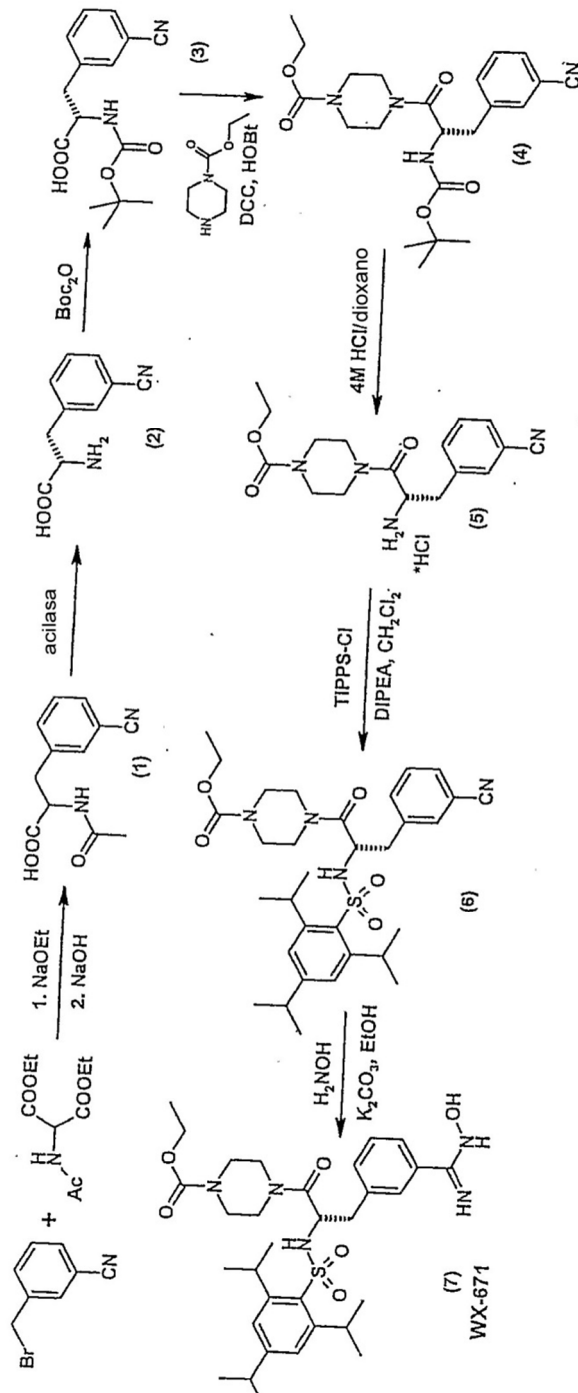
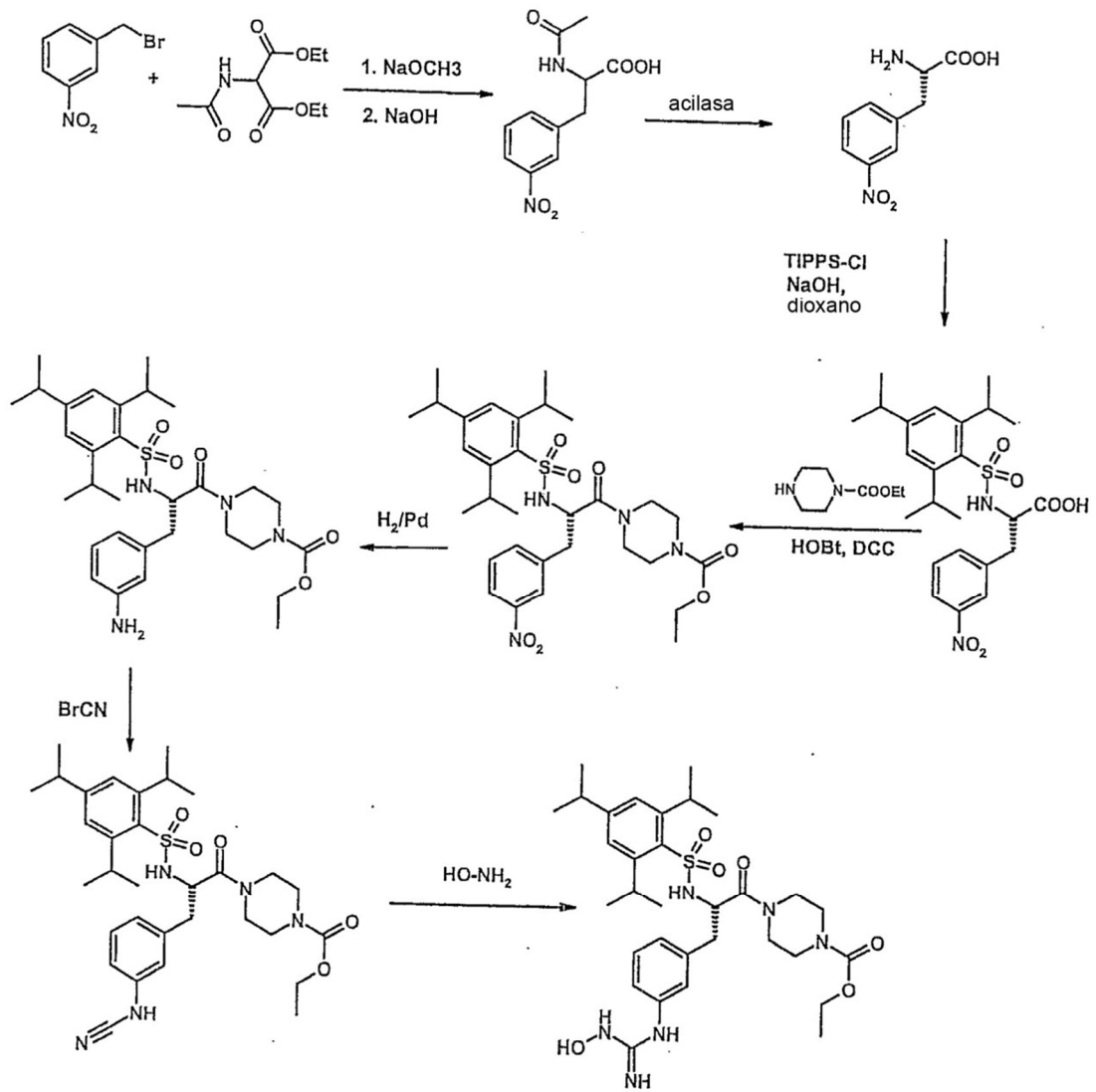
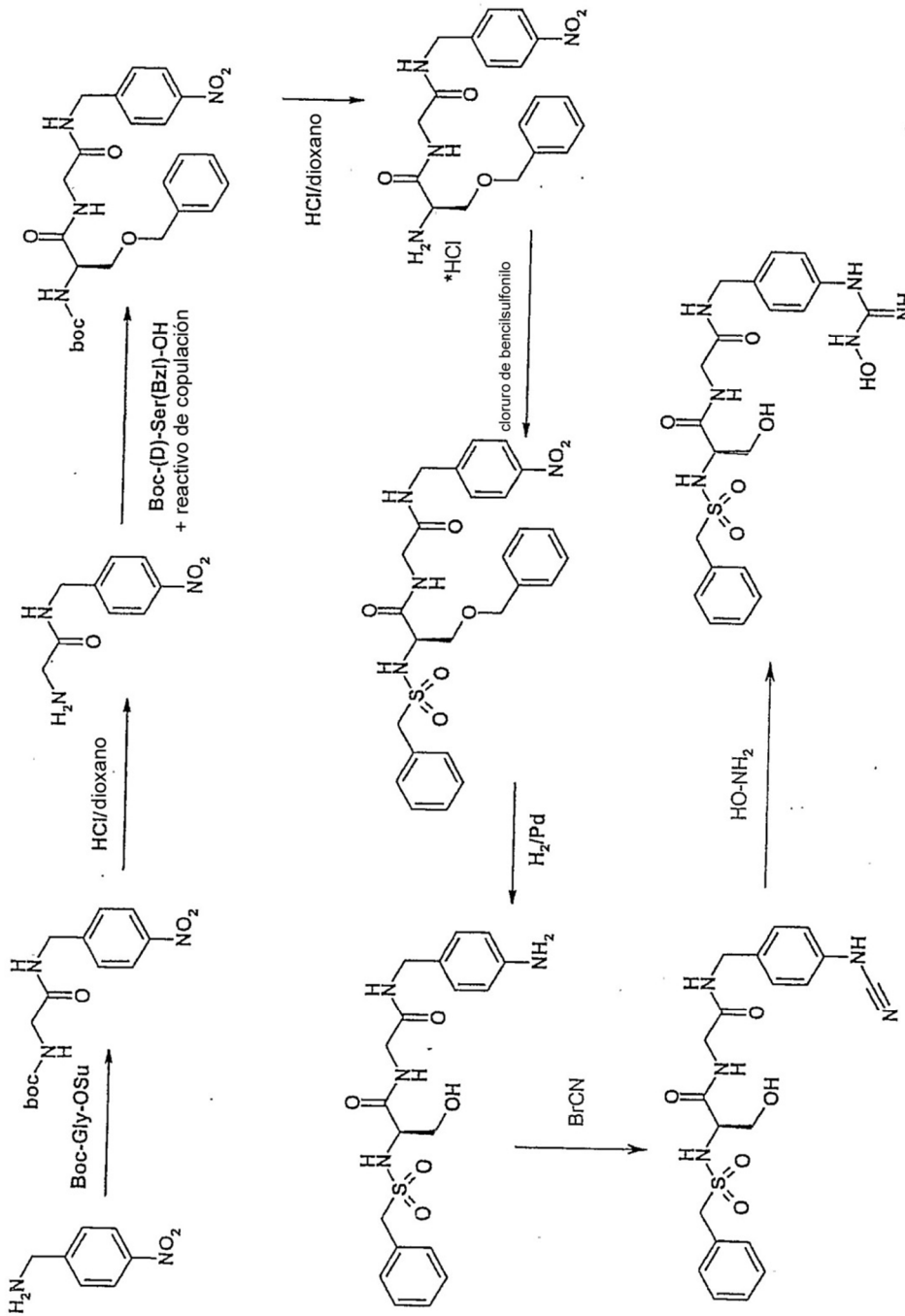


Figura 3



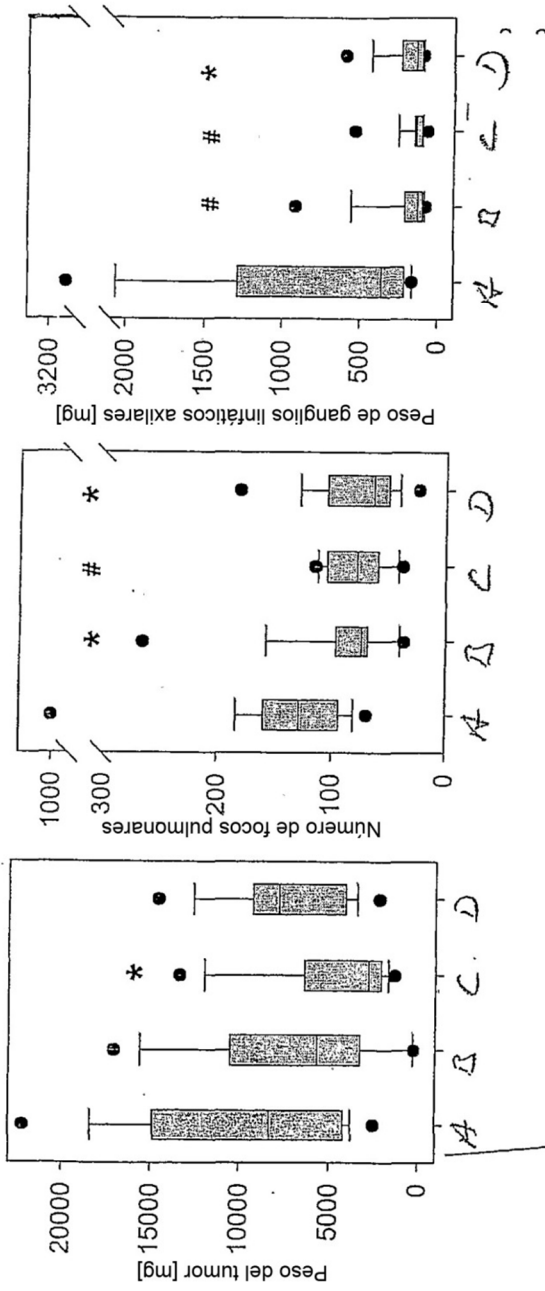
WX-683

Figura 4



WX-678

Figura 5



* P < 0.01 U-test frente a controles a pares # P < 0.001 U-test frente a controles a pares

- A: grupo de control
- B: 1 mg/kg de profármaco inhibidor WX-671 p.o.
- C: 5 mg/kg de profármaco inhibidor WX-671 p.o.
- D: 1 mg/kg de inhibidor WX-UKI i.p.

Figura 6

