

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 937**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010 PCT/JP2010/068895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO2011052554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010 E 10826686 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2495243**

54 Título: **Nuevo derivado de 5-fluorouracilo**

30 Prioridad:

27.10.2009 JP 2009246400

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

27.06.2017

73 Titular/es:

**DELTA-FLY PHARMA, INC. (100.0%)
37-2, Nishikino, Miyajima Kawauchi-cho
Tokushima-shi, Tokushima 771-0116, JP**

72 Inventor/es:

**FUKUSHIMA, MASAKAZU;
YAMADA, SHOZO y
OYAMA, RYO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 619 937 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

Nuevo derivado de 5-fluorouracilo.

5 **Campo técnico**

[Referencia cruzada de solicitudes relacionadas]

Esta solicitud reivindica la prioridad de la patente japonesa nº 2009-246400, presentada el 27 de octubre de 2009.

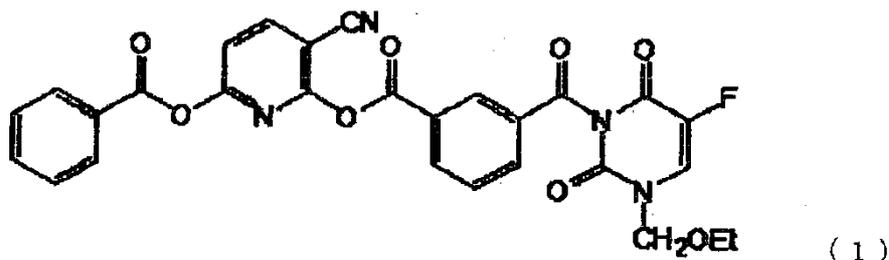
10 La presente invención se refiere a un nuevo derivado de 5-fluorouracilo o una sal del mismo, y a la utilización del mismo.

15 **Técnica anterior**

El 5-fluorouracilo (en adelante denominado como 5-FU) se usa ampliamente para tratar diversos cánceres, principalmente cánceres gastrointestinales, de forma individual o en combinación con otros agentes anticancerosos. Sin embargo, el propio 5-FU presenta únicamente un efecto antitumoral débil y provoca diversos efectos secundarios, tales como diarrea, estomatitis y otros, debido a toxicidad gastrointestinal, y mielosupresión. Por lo tanto, resulta difícil afirmar que el 5-FU es siempre fácil de usar para pacientes con cáncer. Para resolver estos problemas, existen bajo desarrollo diversos derivados de 5-FU administrados oralmente; sin embargo, todavía no se han obtenido efectos clínicos satisfactorios. Las razones probables para ello son las siguientes. El 5-FU se descompone rápidamente *in vivo* mediante dihidropirimidina deshidrogenasa (en adelante denominada como DPD), que está contenida, en particular, en el hígado y tejidos tumorales; por lo tanto, es difícil de lograr un efecto antitumoral suficiente correspondiente a su dosificación. El 5-FU es captado no únicamente en células cancerosas sino también en células normales, tales como células de la médula y células de la mucosa gastrointestinal, y es convertido en metabolitos activos por la acción de orotato fosforribosil transferasa (en adelante denominada como OPRT). Tales metabolitos activos provocan daño celular, es decir, tienen citotoxicidad; por lo tanto, su efecto antitumoral y sus efectos secundarios no están bien compensados.

30 Como ejemplos de derivados de 5-FU, se han dado a conocer compuestos que tienen una actividad inhibidora de DPD y una actividad antitumoral (véase la bibliografía de patente 1 a 3).

Además, también PTL 4 se refiere a derivados de 5-fluorouracilo para uso como agentes anticancerosos. Entre estos, PTL 2 describe específicamente el compuesto (1) mostrado a continuación, que es un compuesto generalmente conocido como Emitefur (también denominado como BOF-A2). Se llevó a cabo un ensayo clínico para evaluar Emitefur; sin embargo, su desarrollo se discontinuó, puesto que tuvo fuertes efectos secundarios.



40 Como se describió anteriormente, todavía no se han desarrollado derivados de 5-FU que puedan potenciar el efecto antitumoral suprimiendo la descomposición de 5-FU *in vivo* y, al mismo tiempo, que puedan reducir los efectos secundarios. Por lo tanto, es necesario desarrollar un nuevo derivado de 5-FU que tenga un efecto antitumoral potenciado y una baja toxicidad para mejorar el efecto terapéutico para tratar pacientes con cáncer.

45 Como se describe anteriormente, no existen informes sobre un derivado que presente una actividad antitumoral además de una actividad inhibidora de DPD y una actividad inhibidora de OPRT en un compuesto. Por lo tanto, se demanda el desarrollo de un fármaco que logre un equilibrio entre los efectos y la toxicidad, es decir, que tenga un fuerte efecto antitumoral sobre cánceres humanos y un daño gastrointestinal reducido, y que mejore la QOL de pacientes con cáncer.

Listado de referencias

Bibliografía de patente

55 PTL 1: Publicación de patente japonesa sin examinar nº S63-201127

PTL 2: Publicación de patente japonesa sin examinar S 63-301880

PTL 3: Documento WO87/06582

5 PTL 4: Documento EP 0 436 902 A1

Sumario de la invención

Problema técnico

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo agente anticanceroso antimetabólico que presente un fuerte efecto antitumoral sobre células tumorales a la vez que reduzca el daño al tubo digestivo, es decir, que tenga efectos y toxicidad bien equilibrados, al presentar una actividad inhibidora de DPD así como una actividad inhibidora de OPRT *in vivo*.

15 Solución al problema

En el contexto de la presente invención se ha realizado una investigación exhaustiva para resolver el problema anterior. Como resultado, se ha descubierto que el derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) a continuación (en adelante también denominado compuesto (I) de la presente invención), o una sal del mismo, presenta (1) actividad inhibidora de DPD y (2) actividad inhibidora de OPRT, y, como resultado, (3) logra un equilibrio entre un fuerte efecto antitumoral y un daño gastrointestinal reducido, es decir, es superior a los derivados de 5-FU conocidos en términos del equilibrio entre efectos y toxicidad.

25 La presente invención se ha logrado basándose en estos hallazgos.

Más específicamente, la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

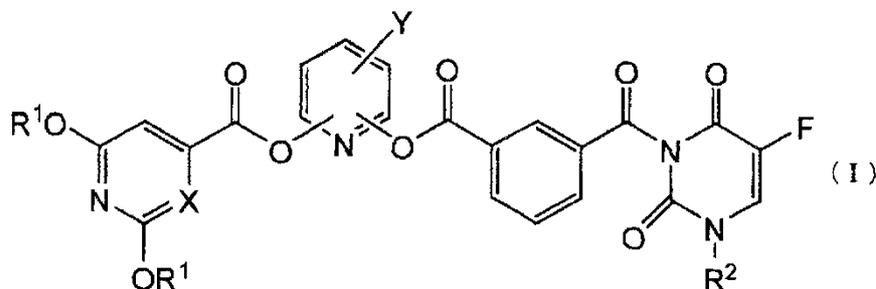
Efectos ventajosos de la invención

30 El compuesto (I) de la presente invención, o una sal del mismo, muestra unos excelentes efectos antitumorales con efectos secundarios reducidos tales como daño gastrointestinal; por lo tanto, es útil como un agente antitumoral.

35 Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar al administrar un fármaco que comprende el compuesto de la presente invención incluyen, en el caso de tumores malignos, cánceres de cabeza y cuello, cánceres esofágicos, cánceres gástricos, cánceres colónicos, cánceres rectales, cánceres hepáticos, cánceres de la vesícula biliar y del conducto biliar, cánceres de las vías biliares, cánceres pancreáticos, cánceres pulmonares, cánceres de mama, cánceres ováricos, cánceres de cuello uterino, cánceres endometriales, cánceres renales, cánceres de vejiga, cánceres prostáticos, tumores testiculares, sarcoma de hueso y de tejido blando, leucemia, linfomas malignos, mielomas múltiples, cánceres de piel, tumores de cerebro, y mesoteliomas.

Descripción de las formas de realización

45 La presente invención se refiere al derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) a continuación, o una sal del mismo:

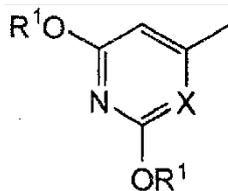


50 en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo hidroxilo, R² representa un grupo alcoxi inferior-alquilo inferior o un grupo tetrahidrofuranilo, X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, e Y representa un átomo de halógeno o un grupo ciano.

En la presente invención, el derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) anterior, o una sal del mismo, incluye sus tautómeros.

55 Más específicamente, la presente invención incluye el derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I), o

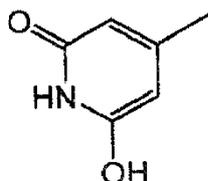
una sal del mismo, en el que el grupo representado por la siguiente fórmula:



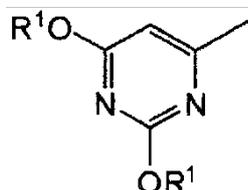
5 es un grupo representado por:



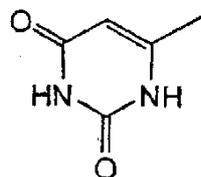
10 en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo hidroxilo;
un grupo representado por:



15 un grupo representado por:



20 en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo hidroxilo; o
un grupo representado por:



25 Los ejemplos específicos de los grupos representados por la fórmula (I) son como se exponen a continuación.

En la fórmula (I), R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo hidroxilo.

30 El grupo protector de un grupo hidroxilo representado por R¹ se define en la reivindicación 1 aneja. Un grupo protector es un grupo que se puede escindir mediante un procedimiento químico, tal como hidrogenólisis, hidrólisis, electrolisis, y fotólisis, o un proceso biológico, tal como realizando la hidrólisis en un cuerpo humano. Sus ejemplos específicos incluyen grupos acilo, tales como grupos acilo alifático sustituidos o no sustituidos o grupos acilo aromático sustituidos o no sustituidos o grupos acilo alicíclico; grupos alcóxicarbonilo inferior; grupos alquilcarbamoilo inferior; grupos alquilo inferior sustituidos o no sustituidos; grupos alquenoilo inferior; grupos arilalquilo sustituidos o no sustituidos; grupos protectores de sililo; y restos de aminoácidos.

Los ejemplos de grupos acilo alifático incluyen un grupo formilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo butirilo, un grupo isobutirilo, un grupo pentanoilo, un grupo isovalerilo, un grupo pivaloilo, un grupo hexanoilo, y

- 5 grupos acilo lineales o ramificados de C₁₋₆ similares. Los ejemplos de grupos acilo aromático incluyen un grupo benzoílo, un grupo α -naftoílo, y un grupo β -naftoílo. Estos grupos pueden tener 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo carboxi, y similar.
- 10 Los ejemplos de grupos acilo alicíclico incluyen un grupo ciclobutanocarbonilo, un grupo ciclopentanocarbonilo, un grupo ciclohexanocarbonilo, y grupos cicloalquilcarbonilo de C₃₋₆ similares.
- 15 Los ejemplos de grupos alcoxicarbonilo inferior incluyen un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo n-propoxicarbonilo, un grupo isopropoxicarbonilo, un grupo n-butoxicarbonilo, un grupo isobutoxicarbonilo, un grupo sec-butoxicarbonilo, un grupo terc-butoxicarbonilo, un grupo pentiloxicarbonilo, un grupo hexiloxicarbonilo, y grupos alcoxicarbonilo lineales o ramificados de C₂₋₇ similares.
- 20 Los ejemplos de grupos alquilcarbamoílo inferior incluyen un metilcarbamoílo, un grupo etilcarbamoílo, un grupo propilcarbamoílo, un grupo butilcarbamoílo, un grupo pentilcarbamoílo, un grupo hexilcarbamoílo, un grupo dimetilcarbamoílo, un grupo dietilcarbamoílo, y grupos carbamoílo similares mono- o disustituidos con un grupo alquilo inferior de C₁₋₆.
- 25 Los ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, y grupos alquilo lineales o ramificados de C₁₋₆ similares. Los ejemplos específicos de los mismos también incluyen un grupo clorometilo, un grupo metoximetilo, un grupo etoximetilo, un grupo metoxietilo, un grupo etoxietilo, y grupos alquilo sustituidos similares.
- 30 Los ejemplos de grupos alquenilo inferior incluyen un grupo etenilo, un grupo alilo, un grupo butenilo, un grupo butadienilo, un grupo hexatrienilo, y grupos alquenilo lineales o ramificados de C₂₋₆ similares.
- 35 Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen un grupo bencilo, un grupo benzhidrilo, y un grupo tritilo. Estos grupos pueden tener 1 a 5, o preferentemente 1 a 3 sustituyentes, tales como un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un átomo de halógeno, un grupo nitro, y un grupo ciano.
- 40 Los ejemplos de grupos protectores de sililo incluyen un grupo trimetilsililo, un grupo terc-butildimetilsililo, un grupo metildiisopropilsililo, un grupo triisopropilsililo, un grupo tetraisopropildisiloxilo (TIPDS), y un grupo difenilmetilsililo.
- 45 Los ejemplos de restos de aminoácidos incluyen aquellos formados eliminando un grupo hidroxí de un grupo carboxi de un aminoácido. Estos restos de aminoácidos pueden derivar de un aminoácido natural o sintético. Los ejemplos específicos de aminoácidos utilizables incluyen glicina, alanina, β -alanina, valina, e isoleucina; y se pueden usar cualesquiera restos de aminoácidos descritos en la publicación de patente japonesa sin examinar nº H1-104093.
- 50 Los ejemplos de grupos alquilo inferior utilizables en la presente memoria como un sustituyente incluyen los mencionados anteriormente.
- 55 Los ejemplos de grupos alcoxi inferior incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propiloxi, un grupo isopropiloxi, un grupo n-butiloxi, un grupo isobutoxi, a sec-butiloxi, un grupo terc-butiloxi, un grupo n-pentiloxi, un grupo n-hexiloxi, y grupos alcoxi lineales o ramificados de C₁₋₆ similares.
- 60 Los ejemplos de átomos de halógeno incluyen un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, y un átomo de yodo.
- 65 R² representa un grupo alcoxi inferior-alquilo inferior o un grupo tetrahidrofurano.
- En la fórmula (I), los ejemplos del resto "alcoxi inferior" en un "grupo alcoxi inferior-alquilo inferior" representado por R² incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propiloxi, un grupo isopropiloxi, un grupo n-butiloxi, un grupo sec-butiloxi, un grupo terc-butiloxi, un grupo n-pentiloxi, un grupo n-hexiloxi, y grupos alcoxi lineales o ramificados de C₁₋₆ similares. Los ejemplos de los restos alcoxi inferior incluyen preferentemente un grupo alcoxi de C₁₋₃, más preferentemente un grupo metoxi y un grupo etoxi, y todavía más preferentemente un grupo etoxi. Los ejemplos del "grupo alquilo inferior" en el "grupo alcoxi inferior-alquilo inferior" incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, y grupos alquilo lineales o ramificados de C₁₋₆ similares. Los ejemplos de los restos alquilo inferior incluyen preferentemente un grupo alquilo de C₁₋₃, más preferentemente un grupo metilo y grupo etilo, y todavía más preferentemente un grupo metilo.
- Los ejemplos de "grupos alcoxi inferior-alquilo inferior" incluyen los grupos alquilo inferior mencionados anteriormente que tienen los "restos alcoxi inferior" descritos anteriormente. Sus ejemplos específicos incluyen grupos alcoxialquilo tales como un grupo metoximetilo, un grupo etoximetilo, un grupo propoximetilo, un grupo

metoxietilo, un grupo etoxietilo, un grupo propoxietilo, un grupo 3-metoxipropilo, un grupo 4-etoxibutilo, un grupo 6-propoxihexilo, un grupo 5-isopropoxipentilo, un grupo 1,1-dimetil-2-butoxietilo, un grupo 2-metil-3-t-butoxipropilo, un grupo 2-pentiloxietilo, y un grupo 2-hexiloxietilo. El grupo alcoxi inferior-alquilo inferior es preferentemente un grupo metoximetilo, un grupo etoximetilo, o un grupo propoximetilo, y más preferentemente un grupo etoximetilo.

5 Los ejemplos de grupos tetrahidrofurano incluyen un grupo 2-tetrahidrofurano y un grupo 3-tetrahidrofurano. Entre estos, resulta preferido un grupo 2-tetrahidrofurano.

X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno.

10 Y representa un átomo de halógeno o un grupo ciano. En la fórmula (I), los ejemplos de átomos de halógeno representados por Y incluyen un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, y un átomo de yodo.

15 Los ejemplos de grupos en una forma de realización particularmente preferida son como se describen a continuación:

Preferentemente, R¹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alilo, un grupo bencilo, un grupo acilo alifático, un grupo acilo aromático, o un grupo acilo alicíclico, más preferentemente un átomo de hidrógeno, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo isobutirilo, un grupo pivaloilo, un grupo benzoilo, un grupo p-clorobenzoilo, o un grupo ciclopentanocarbonilo, y todavía más preferentemente un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo.

20 Preferentemente, R² es un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior presenta 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo 2-tetrahidrofurano, más preferentemente un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior tiene 1 a 6 átomos de carbono, y todavía más preferentemente un grupo etoximetilo.

25 Preferentemente, X es un átomo de carbono.

Preferentemente, X es un átomo de flúor o un átomo de cloro, y más preferentemente un átomo de cloro.

30 Las formas de realización preferidas de R¹, R², X, e Y se pueden usar en cualquier combinación.

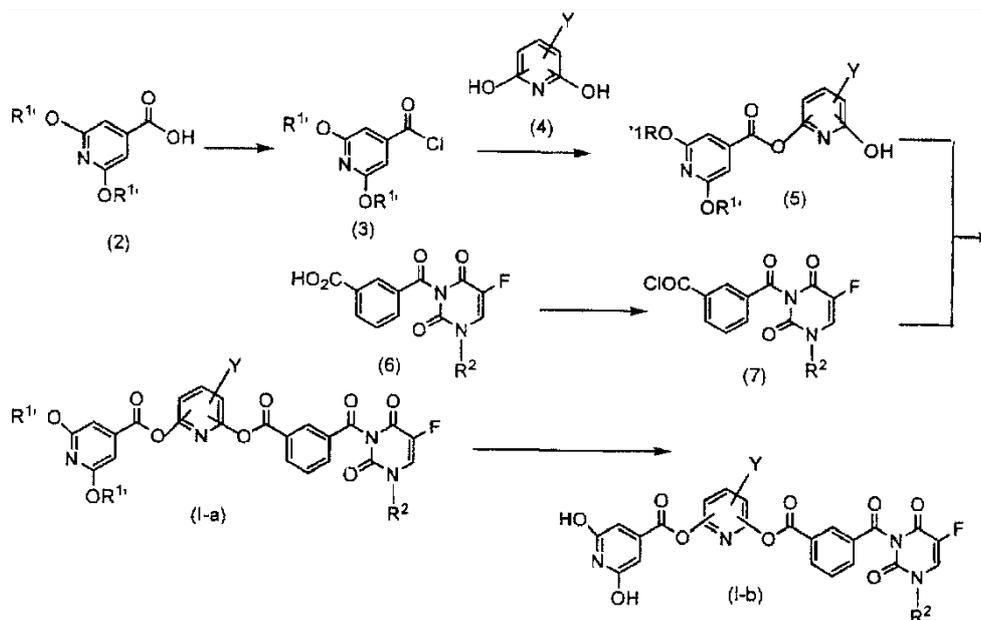
El derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) de la presente invención comprende estereoisómeros, isómeros ópticos, solvatos tales como un hidrato, y polimorfismos cristalinos.

35 El derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) de la presente invención puede ser una sal. Como tal, resulta preferida una sal farmacológicamente aceptable. Sus ejemplos incluyen sales con un ácido inorgánico, y sales con un ácido orgánico.

40 Sus ejemplos específicos incluyen sales con un ácido inorgánico que incluye ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, y ácido fosfórico.

45 Sus ejemplos específicos incluyen sales con un ácido orgánico que incluye ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido benenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, y ácido metanosulfónico.

50 El compuesto de la presente invención se puede producir mediante diversos métodos, y un ejemplo de tal método se ilustra mediante el esquema mostrado a continuación. Los materiales necesarios para sintetizar el compuesto de la presente invención se pueden obtener fácilmente a partir de productos comercialmente disponibles o según un método de producción descrito en un artículo o similar. Los sustituyentes en la fórmula (I) son los mismos que los definidos anteriormente.



Esquema 1

en el que R^1 representa un grupo alilo, o un grupo bencilo sustituido o no sustituido, R^2 representa un grupo alcoxi inferior-alquilo inferior o un grupo tetrahydrofurano, e Y representa un átomo de halógeno o un grupo ciano.

Síntesis de derivado de ácido isonicotínico (2)

Una sal sódica o potásica de alcohol alílico, alcohol bencilo, o alcohol bencilo sustituido, se disuelve en un disolvente que no afecte a la reacción, tal como tetrahydrofurano, tolueno, y dimetilformamida, y preferentemente dimetilformamida. A la disolución resultante se le añade una sal sódica de ácido 2,6-dicloroisonicotínico, a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agita a 60 hasta 100°C durante 2 hasta 24 horas. La mezcla se deja reaccionar, preferentemente, a 80°C durante 4 horas. En la presente memoria, se usan 2 a 10 equivalentes, y preferentemente 4 equivalentes de alcoholato con respecto a una sal sódica de ácido 2,6-dicloroisonicotínico. Después de que la reacción haya terminado, se añade agua al producto de reacción, y la capa acuosa se separa usando acetato de etilo o un disolvente similar. El pH de la capa acuosa se ajusta a 5 hasta 6 usando ácido clorhídrico 1 N o ácido acético. El resultado se somete a extracción usando acetato de etilo, un disolvente mixto de acetato de etilo y n-hexano, tolueno, o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio, etc., y después se concentra para obtener un derivado de ácido isonicotínico de aliloxi, benciloxi, o benciloxi sustituido (2) (en la presente memoria, el derivado de ácido isonicotínico de aliloxi, benciloxi, o benciloxi sustituido (2) se puede denominar como derivado de ácido isonicotínico (2)).

Etapas 1. Síntesis de derivado de cloruro de ácido del ácido isonicotínico (3)

El derivado de ácido isonicotínico (2) obtenido anteriormente se disuelve en un disolvente que no afecte a la reacción, tal como cloroformo, 1,2-dicloroetano, y tolueno, y preferentemente tolueno. Después, se añade gota a gota cloruro de tionilo a temperatura ambiente a la disolución así preparada. La cantidad del cloruro de tionilo usada es 1 a 10 equivalentes, y preferentemente 5 equivalentes con respecto a la disolución. Después de que la adición gota a gota se ha terminado, la mezcla resultante se agita a reflujo durante 2 a 8 horas, y preferentemente durante 4 horas. Después de que la reacción se ha terminado, la mezcla se concentra y el residuo se usa en la siguiente etapa como tal.

Síntesis de derivado de piridina (4)

El derivado de piridina (4) se puede producir mediante un método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar nº H05-80451, Heterocycles, Vol. 36, nº 1, 145-148, 1993, etc.

Estos derivados de piridina (4) están presentes como tautómeros de una estructura de hidroxipiridina y una estructura de 2(1H)-piridona.

Etapas 2. Síntesis de sustancia enlazada a éster (5)

5 El derivado de piridina (4) obtenido anteriormente se disuelve en una sal de amina orgánica tal como trietilamina, diisopropiletilamina, y dimetilanilina, preferentemente una mezcla de trietilamina con un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilacetamida, y preferentemente una mezcla de trietilamina con dimetilacetamida. Una disolución dimetilacetamídica del derivado de cloruro de ácido del ácido isonicotínico (3) obtenido en la etapa 1 se añade gota a gota a la sustancia resultante con enfriamiento con hielo. En la presente memoria, se usa 1,0 a 1,2 equivalentes de derivado de cloruro de ácido del ácido isonicotínico (3) y 1,0 a 1,2 equivalentes de sal de amina orgánica por derivado de piridina (4). Tras permitir que la mezcla reaccione a temperatura ambiente durante 1 a 4 horas, se añade agua a la mezcla, seguido de la extracción usando acetato de etilo, un disolvente mixto de acetato de etilo y n-hexano, tolueno, o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio o similar, se concentra hasta recristalización, se purifica mediante cromatografía en columna, y después se suministra a la siguiente etapa.

Síntesis de monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (6)

15 La monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (6) se puede producir mediante el método descrito en la publicación de patente japonesa sin examinar nº H02-164871.

Etapas 3. Síntesis de cloruro de ácido de la monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (7)

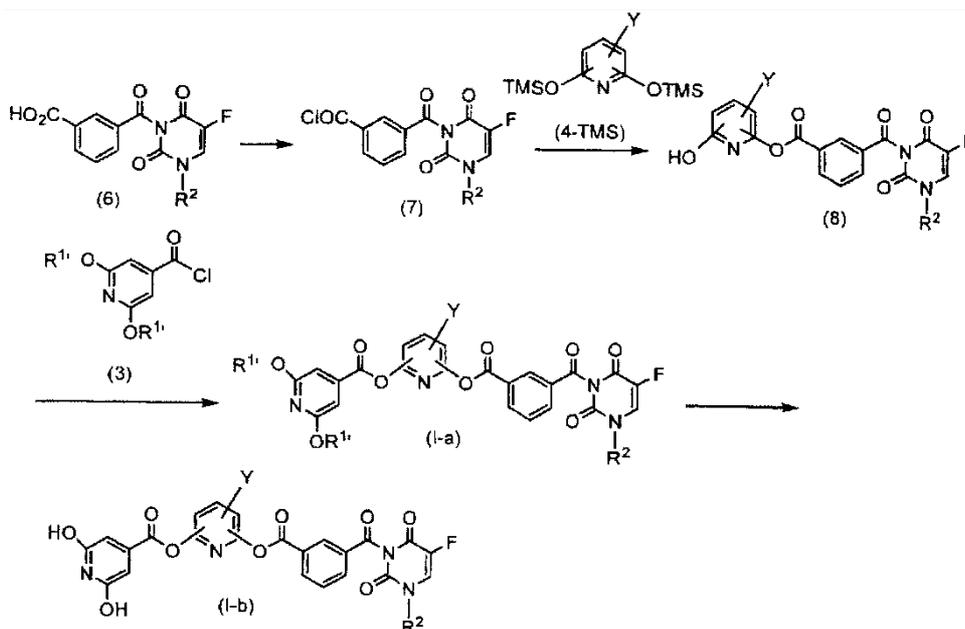
20 La monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (6) se disuelve en un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, y tolueno, y preferentemente diclorometano. A la disolución resultante se le añade gota a gota cloruro de tionilo, a temperatura ambiente. La cantidad de cloruro de tionilo es 1 a 4 equivalentes, y preferentemente 1,2 equivalentes con respecto a la disolución. Después de que la adición gota a gota se ha terminado, la mezcla resultante se agita a reflujo durante 2 a 8 horas, y preferentemente 4 horas. Después de que la reacción se ha terminado, la mezcla se concentra y el residuo se suministra a la siguiente etapa como tal.

Etapas 4. Síntesis del compuesto de la presente invención (I-a)

30 La sustancia enlazada a éster (5) obtenida en la etapa 2 se disuelve en una sal de amina orgánica tal como trietilamina, diisopropiletilamina, y dimetilanilina, y preferentemente trietilamina y un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, acetonitrilo, y dimetilformamida. A la disolución así obtenida se le añade gota a gota con enfriamiento con hielo una disolución diclorometánica del cloruro de ácido de la monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (7) obtenido en la etapa 3. En la presente memoria, se usa 1,0 a 1,2 equivalentes de cloruro de ácido de la monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (7) y 1,0 a 1,2 equivalentes de sal de amina orgánica con respecto a la sustancia enlazada a éster (5). Tras permitir que la mezcla reaccione a temperatura ambiente durante 1 hasta 4 horas, se añade agua al producto de reacción, seguido de la extracción usando diclorometano o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio o similar, se concentra hasta recristalización, se purifica mediante cromatografía en columna, y después se suministra a la siguiente etapa.

Etapas 5. Síntesis del compuesto de la presente invención (I-b)

45 La desprotección se lleva a cabo según el método descrito en Green's "Protective Group in Organic Synthesis".



Esquema 2

en el que R^1 , R^2 , e Y son los mismos como se definen anteriormente.

5

Etapa 6. Síntesis de monoéster de monoamida del ácido isoftálico (8)

Un derivado de piridina (4-TMS), que se trimetilsililó (TMS) según el método descrito en Chem. Pharm. Bull. Vol. 41, No. 9, 1498-1506, 1993, se disuelve en un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, acetonitrilo, y dimetilformamida, y preferentemente acetonitrilo. A la disolución así obtenida se le añade gota a gota con enfriamiento con hielo una disolución acetonitrílica de cloruro de ácido de la monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (7). Subsiguientemente, se le añade gota a gota un ácido de Lewis, tal como cloruro estánnico y tetracloruro de titanio. En la presente memoria, se usan 0,8 a 1,0 equivalentes de cloruro de ácido de la monoamida 5-fluorouracílica del ácido isoftálico (7) y una cantidad catalítica de ácido de Lewis con respecto al derivado de piridina (4-TMS). Después de permitir que la mezcla reaccione a temperatura ambiente durante 1 hasta 4 horas, se añade agua al líquido de reacción, seguido de la extracción usando diclorometano o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio o similar, se concentra hasta recristalización, se purifica mediante cromatografía en columna, y después se suministra a la siguiente etapa.

10

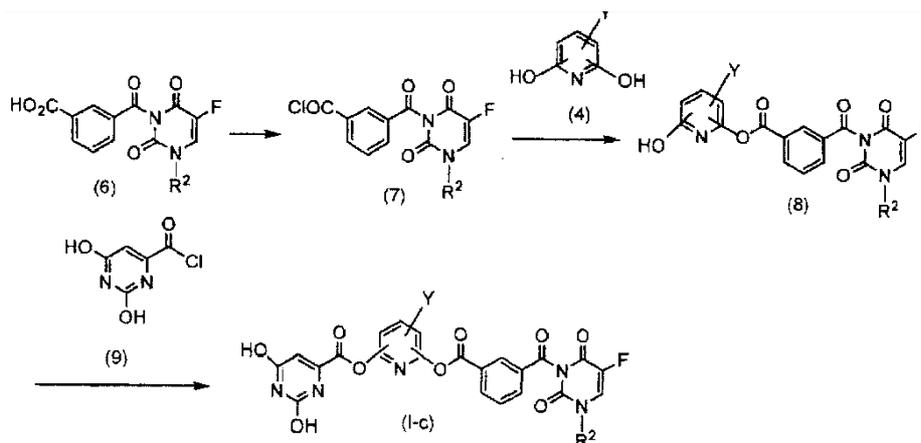
15

20 Etapa 7. Síntesis del compuesto de la presente invención (I-a)

El monoéster de la monoamida del ácido isoftálico (8) se disuelve en una mezcla de una sal de amina orgánica, tal como trietilamina, diisopropiletilamina, y dimetilaniolina, preferentemente trietilamina, y un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, acetonitrilo, y dimetilformamida, y preferentemente diclorometano. A la mezcla resultante se le añade gota a gota una disolución diclorometánica de derivado de cloruro de ácido del ácido isonicotínico (3). En la presente memoria, se usa 1,0 a 1,2 equivalentes de derivado de cloruro de ácido del ácido isonicotínico (3) y 1,0 a 1,2 equivalentes de sal de amina orgánica con respecto al monoéster de la monoamida del ácido isoftálico (8). Tras permitir que la mezcla reaccione a temperatura ambiente durante 1 hasta 4 horas, se añade agua al líquido de reacción, seguido de la extracción usando diclorometano o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio o similar, se concentra hasta recristalización, se purifica mediante cromatografía en columna, y después se suministra a la etapa 5 mostrada en el esquema 1.

25

30



Esquema 3

en el que R^2 e Y son como se definen anteriormente.

5

Síntesis de cloruro de ácido del ácido orótico (9)

Se añade gota a gota cloruro de tionilo a ácido orótico a temperatura ambiente, junto con un disolvente que no afecte a la reacción, tal como cloroformo, 1,2-dicloroetano, y tolueno, o sin disolvente. En la presente memoria, se añade 1 a 5 equivalentes, preferentemente 4 equivalentes de cloruro de tionilo, con respecto a ácido orótico. Después de que la adición gota a gota se ha terminado, la mezcla resultante se agita a reflujo durante 2 a 8 horas, y preferentemente durante 4 horas. Después de que la reacción ha terminado, la mezcla se concentra y el residuo se suministra a la siguiente etapa como tal.

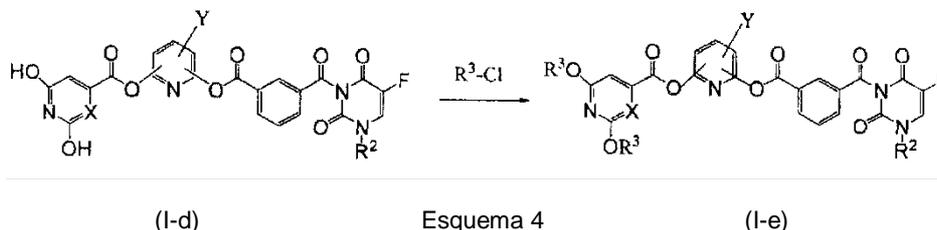
10

15 Etapa 8. Síntesis del compuesto de la presente invención (I-c)

El monoéster de la monoamida del ácido isoftálico (8) se disuelve en un líquido mixto de una sal de amina orgánica, tal como trietilamina, diisopropilamina, y dimetilaminilina, preferentemente trietilamina, con un disolvente que no afecte a la reacción, tal como diclorometano, acetonitrilo, y dimetilformamida, y preferentemente un líquido mixto de trietilamina con diclorometano. A la disolución resultante se le añade gota a gota con enfriamiento con hielo una disolución diclorometánica de cloruro de ácido del ácido orótico (9). En la presente memoria, se usa 1,0 a 1,2 equivalentes de cloruro de ácido del ácido orótico (9) y 1,0 a 1,2 equivalentes de sal de amina orgánica con respecto al monoéster de la monoamida del ácido isoftálico (8). Tras permitir que la mezcla reaccione a temperatura ambiente durante 1 hasta 4 horas, se añade agua al producto de reacción, seguido de la extracción usando diclorometano o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio o similar, se concentra hasta recristalización, y entonces se purifica mediante cromatografía en columna.

20

25



30

en el que X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, R^3 representa un grupo protector de un grupo hidroxilo, e Y es el mismo como se define anteriormente.

35 Etapa 9. Síntesis del compuesto de la presente invención (I-e) en el que R^1 es un grupo protector de grupo hidroxilo

El derivado de piridina (I-d) obtenido a través de los esquemas 2 y 3 y un cloruro de ácido representado por la fórmula R^3-Cl se disuelven en un disolvente que no afecte a la reacción, tal como dimetoxietano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida, y dimetilacetamida, y preferentemente dimetoxietano. A la disolución resultante se le añade con enfriamiento con hielo una sal de amina orgánica, tal como piridina, trietilamina, diisopropilamina, y dimetilaminilina, y preferentemente piridina. En la presente memoria, se usan 2,2 a 4,0 equivalentes de cloruro de ácido y 2,2 a 4,0 equivalentes de sal de amina orgánica con respecto a derivado de piridina (I-d). Tras permitir que la

40

mezcla reaccione con enfriamiento con hielo durante 0,5 hasta 4 horas, se añade agua al líquido de reacción, seguido de la extracción usando acetato de etilo, y un disolvente mixto de acetato de etilo y n-hexano, tolueno, o similar. El extracto se seca sobre sulfato de sodio, sulfato de magnesio, etc., se concentra hasta recristalización, y después se purifica mediante cromatografía en columna, etc.

Como se describe anteriormente, el compuesto (I) de la presente invención y sus sales muestran un excelente efecto antitumoral con efectos secundarios reducidos tal como daño gastrointestinal; por lo tanto, son útiles como un agente antitumoral. En consecuencia, el compuesto (I) de la presente invención y sus sales son eficaces para tratar cánceres. En la presente invención, los tratamientos del cáncer incluyen la administración del compuesto (I) de la presente invención o una sal del mismo a fin de evitar la recurrencia del cáncer después de tratar el cáncer mediante radiación, operación quirúrgica, etc.

Cuando el compuesto (I) de la presente invención o una sal del mismo se usa para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente de mamíferos, incluyendo seres humanos, la dosis, el número de administraciones, y similares deberían variar dependiendo de las condiciones y gravedad de la enfermedad seleccionada como diana, y la vía de administración del compuesto (I) de la presente invención. La dosificación, el número de administraciones, y similares también varían dependiendo de la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, fármaco concomitante, respuesta, y similar, del paciente. El compuesto (I) de la presente invención y sus sales se administran habitualmente de forma oral o parenteral. La dosificación es generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente, es decir, de aproximadamente 0,001 a 100 mg, y preferentemente de aproximadamente 0,01 a 50 mg/kg por día por kg de peso corporal del mamífero, tal como un ser humano. Sin embargo, se puede aplicar una dosificación fuera del intervalo anterior, dependiendo del caso.

Mezclando una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención con vehículos fisiológicamente aceptables, el compuesto de la presente invención se puede administrar oral o parenteralmente (por ejemplo, uso externo, inhalación, inyección subcutánea, inyección arterial e intravenosa, inyección intramuscular, instilación intravesical, instilación intracerebral, rinenquisis, y colirio) como preparaciones sólidas tales como un comprimido, cápsula, gránulo, y polvo; preparaciones líquidas tales como un jarabe e inyección; y como preparaciones externas tales como un ungüento, loción, gel, y crema.

Como vehículos farmacológicamente aceptables en la presente invención, se usan diversos vehículos orgánicos o inorgánicos convencionales utilizables como materiales de preparación. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen excipientes, lubricantes, aglutinantes, y disgregantes usados en preparaciones sólidas; y disolventes, solubilizantes, agentes de suspensión, agentes de ajuste de la tonicidad, amortiguadores, y agentes calmantes usados en preparaciones líquidas. Si es necesario, se pueden usar aditivos de la preparación, tales como antisépticos, antioxidantes, colorantes, y edulcorantes. Los ejemplos preferidos de excipientes incluyen lactosa, D-manitol, almidón, celulosa cristalina, y ácido silícico anhidro ligero. Los ejemplos preferidos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, y sílice coloidal. Los ejemplos preferidos de aglutinantes incluyen celulosa cristalina, azúcar blanca, D-manitol, dextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y polivinilpirrolidona. Los ejemplos preferidos de disgregantes incluyen almidón, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica, croscarmelosa sódica, y carboximetil almidón sódico. Los ejemplos preferidos de disolventes incluyen agua para inyección, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, y aceite de maíz. Los ejemplos preferidos de solubilizantes incluyen polietilenglicol, propilenglicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, y citrato de sodio. Los ejemplos preferidos de agentes de suspensión incluyen tensioactivos tales como esteariltriectanolamina, laurilsulfato de sodio, ácido laurilaminopropiónico, lecitina, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, y monoestearato de glicerol; y polímeros hidrófilos tales como polialcohol vinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, e hidroxipropilcelulosa. Los ejemplos preferidos de amortiguadores incluyen disoluciones amortiguadoras de fosfato, acetato, carbonato, y citrato. Los ejemplos preferidos de agentes calmantes incluyen alcohol bencílico. Los ejemplos preferidos de antisépticos incluyen ésteres de ácido parahidroxibenzoico, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, ácidos deshidroacéticos, y ácidos sórbicos. Los ejemplos preferidos de antioxidantes incluyen sales de sulfito y sales de ácido ascórbico.

Ejemplos

En la presente memoria a continuación, la presente invención se describe específicamente haciendo referencia a los ejemplos comparativos, ejemplos, y ejemplos de ensayo. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas formas de realización específicas.

Ejemplo 1 de referencia

Síntesis de ácido 2,6-dibenciloixisonicotínico (Compuesto 2a)

En una atmósfera de argón, se añadió gradualmente ácido 2,6-dicloroisonicotínico (57,6 g) a hidruro de sodio al 55% (52,5 g) y dimetilformamida (1 l), mientras se enfriaba y se agitaba. Subsiguientemente, se añadió gradualmente

gota a gota alcohol bencílico (93 ml) al producto de la reacción a la misma temperatura. Después de que ya no se generó más hidrógeno, el producto de la reacción se agitó durante 4 horas a 80°C, y después se le añadió agua (1 l). La mezcla se separó mediante un disolvente mixto (1 l) de acetato de etilo y n-hexano (1:1). La acidez de la capa acuosa se redujo con ácido acético (75,5 ml), y se le añadió adicionalmente agua (1,7 l). El precipitado se filtró y se secó para obtener el compuesto 2a.

Rendimiento: 77,17 g (77%)

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

13,60 (1H, brs), 7,43-7,29 (10H, m), 6,81 (2H, s), 5,36 (4H, s) Punto de fusión: 145-147°C

Ejemplo 2 de referencia

Síntesis de ácido 2,6-di-p-metoxibenciloxiisonicotínico (Compuesto 2b)

El compuesto 2b se sintetizó según el método del ejemplo 1 de referencia, con la excepción de que se usó alcohol p-metoxibencílico en vez de alcohol bencílico.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

13,56 (1H, brs), 7,39 (4H, d, J = 8,4 Hz), 6,95 (4H, d, J = 8,6 Hz), 5,33 (4H, s), 3,77 (6H, s)

Ejemplo 3 de referencia

Síntesis de ácido 2,6-dialiloxiisonicotínico (Compuesto 2c)

El compuesto 2c se sintetizó según el método del ejemplo 1 de referencia, excepto que se usó alcohol alílico en vez de alcohol bencílico.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

13,60 (1H, brs), 6,77 (2H, s), 6,15-5,99 (2H, m), 5,38 (2H, dd, J = 17,2 Hz, J = 1,5 Hz), 5,23 (2H, d, J = 10,4 Hz), 4,82 (4H, d, J = 5,4 Hz)

Ejemplo 4 de referencia

Síntesis de 4-{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloro-2-hidroxipiridina (Compuesto 5a), 2-{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloro-4-hidroxipiridina (Compuesto 5b), y 2,4-di{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloropiridina (Compuesto 5c).

Se añadieron gota a gota cloruro de tionilo (98,5 ml) y dimetilformamida (1,7 ml) a una disolución de ácido 2,6-dibenciloxiisonicotínico (Compuesto 2a) (75,45 g) obtenido en el ejemplo 1 de referencia y tolueno (800 ml), y la mezcla se agitó a 80°C durante 4,5 horas. Tras enfriarla, los disolventes se evaporaron. Sin purificación, el cloruro de ácido residual se disolvió en dimetilacetamida (100 ml) para obtener una disolución dimetilacetamídica de cloruro de ácido a usar en la reacción siguiente. La disolución dimetilacetamídica de cloruro de ácido se añadió gota a gota, con enfriamiento con hielo, a una disolución de 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina (31,9 g), trietilamina (31,19 ml) y dimetilacetamida (1,6 l). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se le añadió agua (1,7 l). La mezcla se separó mediante un disolvente mixto (1 l) de acetato de etilo y n-hexano (3:1). Después de que la disolución se secó con sulfato de sodio, el disolvente se evaporó. El precipitado se filtró y se secó para obtener el compuesto 5a.

Rendimiento: 44,8g (45%)

Mientras tanto, el filtrado se concentró, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (que se eluye con acetato de etilo/n-hexano (1:1)) para obtener el compuesto 5b (18,94 g) y el compuesto 5c (4,74 g).

Compuesto 5a

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

12,09 (1H, brs), 7,91 (1H, s), 7,50-7,30 (10H, m), 6,99 (2H, s), 6,58 (1H, s), 5,42 (4H, s)

Punto de fusión: 149-150°C

Compuesto 5b

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

5 12,26 (1H, brs), 8,27 (1H, s), 7,50-7,30 (10H, m), 6,98 (2H, s), 6,86 (1H, s), 5,42 (4H, s)

Punto de fusión: 136-138°C (temperatura de descomposición)

Compuesto 5c

10

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,75 (1H, s), 7,79 (1H, s), 7,50-7,30 (20H, m), 7,05 (2H, s), 7,02 (2H, s), 5,42 (8H, s)

15 **Ejemplo 5 de referencia**

Síntesis de 2,6-dihidroxi-3-fluoropiridina (Compuesto 4a)

20 El ácido 2,6-dibenciloxi-5-fluoronicotínico (13,30 g) se obtuvo usando ácido 2,6-dicloro-5-fluoronicotínico (15,15 g) como compuesto de partida, mediante el mismo método como en el ejemplo 1 de referencia. RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,02 (1H, d, J = 10,2 Hz), 7,49-7,28 (10H, m), 5,48 (2H, s), 5,45(2H, s)

25 A continuación, el ácido 2,6-dibenciloxi-5-fluoronicotínico (5,00 g) se disolvió en dioxano (50 ml), y se le añadió hidróxido de paladio al 20% (50% húmedo, 500 mg), y se hizo reaccionar en una atmósfera de hidrógeno durante 1 hora. El hidróxido de paladio se filtró a través de Celite del producto de la reacción resultante, y el disolvente se evaporó para obtener un compuesto, es decir, ácido 2,6-dihidroxi-5-fluoronicotínico (2,58 g). Rendimiento: 88%

30 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

7,44 (1H, d, J = 11,4 Hz)

35 El ácido 2,6-dihidroxi-5-fluoronicotínico (2,25 g) se disolvió en dioxano (25 ml), y se puso a reflujo durante 15 minutos. Tras enfriarlo, el disolvente se evaporó para obtener el compuesto 4a (1,65 g). Rendimiento: 99%

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

40 7,26 (1H, dd, J = 7,7 Hz, J = 11,0 Hz), 5,45 (1H, d, J = 6,6 Hz)

Ejemplo 6 de referencia

6-{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-3-fluoro-2-hidroxipiridina

45 (Compuesto 5d)

El compuesto 5d se sintetizó según el método del ejemplo 4 de referencia, excepto que se usó el compuesto 4a obtenido en el ejemplo 5 de referencia en vez de 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina.

50 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

7,79 (1H, t, J = 9,0 Hz), 7,47-7,30 (11H, m), 6,98 (2H, s), 5,42 (4H, s)

Ejemplo 7 de referencia

55 Síntesis de 3-{3-[4-hidroxi-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo (Compuesto 8a) y 3-{3-[2-hidroxi-5-cloro-4-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto 8b)

60 Se disolvió 1-etoximetil-3-m-hidroxycarbonilbenzoil-5-fluorouracilo (3,46 g) en cloruro de metileno (50 ml). Después se le añadieron cloruro de tionilo (0,9 ml) y dimetilformamida (0,04 ml). El producto de reacción resultante se puso a reflujo durante 2 horas, y después se evaporaron los disolventes. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (12 ml) para obtener una disolución de cloruro de metileno de cloruro de ácido. Después de que 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina (1,5 g) se puso a reflujo en hexametildisilazano (15 ml) durante 6 horas, el disolvente se evaporó, y el

65

residuo resultante se disolvió en cloruro de metileno (30 ml). La disolución de cloruro de metileno de cloruro de ácido anterior se le añadió gota a gota con enfriamiento con hielo, y a continuación se le añadió cloruro estánico anhidro (0,15 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Tras neutralizarla con trietilamina, el residuo obtenido evaporando los disolventes se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con acetato de etilo/n-hexano (1:2)) para obtener el compuesto 8a (2,15 g; rendimiento: 45%) y el compuesto 8b (496 mg; rendimiento: 10%).

Compuesto 8a

10 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,63 (1H, t, J = 1,6 Hz), 8,49 (2H, d, J = 8,2 Hz), 8,45 (1H, d, J = 6,7 Hz), 8,28 (1H, s), 7,86 (1H, t, J = 7,8 Hz), 6,91 (1H, s), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 6,9 Hz), 1,11 (3H, t, J = 7,0 Hz)

15 Compuesto 8b

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

20 8,65 (1H, t, J = 3,3 Hz), 8,51 (2H, dt, J = 1,7, 7,7 Hz), 8,46 (1H, d, J = 6,6 Hz), 7,93 (1H, s), 7,89 (1H, t, J = 7,8 Hz), 6,63 (1H, s), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,1 Hz)

Ejemplo 8 de referencia

Síntesis alternativa de 3-{3-[4-hidroxi-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

25 (Compuesto 8a)

1-etoximetil-3-m-hidroxicarbonilbenzoil-5-fluorouracilo (3,46 g) se disolvió en cloruro de metileno (50 ml). Después se le añadieron cloruro de tionilo (0,9 ml) y dimetilformamida (0,04 ml). El producto de reacción resultante se puso a reflujo durante 2,5 horas, y después se evaporaron los disolventes. El residuo se disolvió en dimetilacetamida (12 ml) para obtener una disolución dimetilacetamídica de cloruro de ácido. La disolución dimetilacetamídica de cloruro de ácido se añadió gota a gota con enfriamiento con hielo a una disolución de 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina (1,5 g), trietilamina (1,57 ml), y dimetilacetamida (15 ml). El producto de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Se le añadió agua, y la mezcla se separó mediante un disolvente mixto de acetato de etilo y n-hexano (1:1). La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, y después se evaporó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con acetato de etilo/n-hexano (1:1)) para obtener el compuesto 8a (668 mg). Rendimiento: 14%

Ejemplo de referencia

40 Síntesis alternativa de 2-{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloro-4-hidroxipiridina (Compuesto 5b), 4-{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloro-2-hidroxipiridina (Compuesto 5a), y 2,4-di{2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi}-5-cloropiridina.

45 (Compuesto 5c)

El cloruro de ácido se obtuvo usando como compuesto de partida el compuesto 2a (1 g) obtenido en el ejemplo de referencia 1, mediante el mismo método como el que se usó en el ejemplo 8 de referencia. Posteriormente, como es el caso con el ejemplo 7 de referencia, la 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina (1,0 g) se trimetilsililó, y después se hizo reaccionar con cloruro de ácido. Tras neutralizarla con trietilamina, el residuo obtenido evaporando el disolvente se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con acetato de etilo/n-hexano (1:1)) para obtener el compuesto 5b (1,38 g; rendimiento: 44%), el compuesto 5a (675 mg; rendimiento: 21%), y el compuesto 5c (647 mg; rendimiento: 12%).

Ejemplo 1

Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

60 (Compuesto I-1)

1-etoximetil-3-m-hidroxicarbonilbenzoil-5-fluorouracilo (17 g) se disolvió en cloruro de metileno (200 ml). Después se le añadieron cloruro de tionilo (5,5 ml) y dimetilformamida (0,4 ml). El producto de reacción resultante se puso a reflujo durante 2,5 horas, y después se evaporaron los disolventes. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (60 ml) para obtener una disolución de cloruro de metileno de cloruro de ácido. Esta disolución se añadió gota a gota con enfriamiento con hielo a una disolución del compuesto 5a (21,27 g) obtenido en el ejemplo 4 de referencia, trietilamina (7,3 ml) y cloruro de metileno (180 ml). El producto de reacción resultante se agitó a temperatura

ambiente durante 1 hora, y después se evaporaron los disolventes. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con acetato de etilo/n-hexano (1:1)) para obtener el compuesto I-1 (25,5 g). Rendimiento: 71%

5 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,77 (1H, s), 8,67 (1H, t, J = 1,6 Hz), 8,54-8,50 (2H, m), 8,45 (1H, d, J = 6,6 Hz), 7,88 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,83 (1H, s), 7,50-7,30 (10H, m), 7,06 (2H, s), 5,43 (4H, s), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,11 (3H, t, J = 7,0 Hz)

10

Punto de fusión: 66-69°C

Ejemplo 2

15 Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-dihidroxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-2)

20 El compuesto I-1 (25,3 g) obtenido en el ejemplo 1 se disolvió en dioxano (800 ml), y se le añadió hidróxido de paladio al 20% (50% húmedo, 2,53 g), y se hizo reaccionar en una atmósfera de hidrógeno durante 1 hora. El hidróxido de paladio se filtró a través de Celite del producto de reacción resultante y se lavó con acetona (200 ml). El filtrado (es decir, la disolución de dioxano y acetona) se concentró, y el residuo resultante se cristalizó en acetona-n-hexano (1:1) para obtener el compuesto I-2 (13,14 g). Rendimiento: 68%

25 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

11,57 (2H, brs), 8,77 (1H, s), 8,67 (1H, t, J = 1,6 Hz), 8,55-8,49 (2H, m), 8,45 (1H, d, J = 6,6 Hz), 7,89 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,83 (1H, s), 6,47 (2H, brs), 5,12 (2H, s), 3,59 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,0 Hz)

30 Punto de fusión: 125-129°C

Ejemplo 3

35 Síntesis de 3-{3-[2-(2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-4-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-3)

40 El compuesto I-3 se sintetizó según el método del ejemplo 1, excepto que se usó el compuesto 5b obtenido en el ejemplo 4 de referencia en vez del compuesto 5a.

40 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,77 (1H, s), 8,71 (1H, t, J = 1,6 Hz), 8,58-8,53 (2H, m), 8,46 (1H, d, J = 6,6 Hz), 7,91 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,83 (1H, s), 7,50-7,30 (10H, m), 7,03 (2H, s), 5,43 (4H, s), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,0 Hz)

45

Ejemplo 4

50 Síntesis de 3-{3-[2-(2,6-dihidroxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-4-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-4)

El compuesto I-4 se sintetizó usando el compuesto I-3 obtenido en el ejemplo 3, según el método del ejemplo 2.

55 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

8,77 (1H, s), 8,71 (1H, brs), 8,57-8,53 (2H, m), 8,47 (1H, d, J = 6,4 Hz), 7,92 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,83 (1H, s), 6,41 (2H, brs), 5,12 (2H, s), 3,59 (2H, q, J = 6,3 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,1 Hz)

Ejemplo 5

60 Síntesis de 3-{3-[6-(2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi)-3-fluoro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-5)

65

El compuesto I-5 se sintetizó según el método del ejemplo 1, excepto que se usó el compuesto 5d obtenido en el

ejemplo 6 de referencia en vez del compuesto 5a.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

5 8,71 (1H, t, J = 1,5 Hz), 8,57-8,53 (m, 2H), 8,44 (1H, d, J = 6,6 Hz), 8,33 (1H, t, J = 8,6 Hz), 7,90 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,62 (1H, dd, J = 2,7 Hz, J = 8,7 Hz), 7,46-7,32 (10H, m), 5,42 (4H, s), 5,12 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 6

10 Síntesis de 3-{3-[6-(2,6-hidroxiisonicotinoiloxi)-3-fluoro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo
(Compuesto 1-6)

15 El compuesto I-6 se sintetizó usando el compuesto I-5 obtenido en el ejemplo 5, según el método del ejemplo 2.

RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

20 8,71 (1H, t, J = 1,6 Hz), 8,58-8,53 (2H, m), 8,44 (1H, d, J = 6,8 Hz), 8,32 (1H, t, J = 8,6 Hz), 7,91 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,60 (1H, dd, J = 2,8 Hz, J = 8,6 Hz), 6,41 (2H, brs), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,11 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 7

25 Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-dibenciloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo
(Compuesto I-1)

30 Se añadieron gota a gota cloruro de tionilo (0,23 ml) y dimetilformamida (0,01 ml) a una disolución del compuesto 2a (217 mg) obtenido en el ejemplo 1 de referencia y tolueno (4 ml), y la mezcla se agitó a 80°C durante 4,5 horas. Después de que la mezcla resultante se enfrió, los disolventes se evaporaron. Sin purificación, el cloruro de ácido residual se disolvió en dioxano (2 ml) para obtener una disolución dioxánica de cloruro de ácido a usar en la reacción siguiente. La disolución dioxánica de cloruro de ácido se añadió gota a gota con enfriamiento con hielo a una disolución del compuesto 8a (100 mg) obtenido en el ejemplo 7 de referencia o en el ejemplo 8 de referencia, trietilamina (0,01 ml) y dioxano (10 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas, y después se evaporaron los disolventes. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con acetato de etilo/n-hexano (1:1)) para obtener el compuesto I-1 (119 mg). Rendimiento: 92%.

Ejemplo 8

40 Síntesis de 3-{3-[2-(orotinoiloxi)-5-cloro-4-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo
(Compuesto I-7)

45 Se añadieron cloruro de tionilo (35 ml) y piridina (0,17 ml) a ácido orótico (6 g), y la mezcla se puso a reflujo durante 20 horas. Subsiguientemente, el cloruro de tionilo se evaporó del producto de reacción resultante, y el residuo se obtuvo como cloruro de ácido del ácido orótico sin purificación. El cloruro de ácido resultante (0,59 g) y el compuesto 8b (0,78 g) obtenido en el ejemplo 7 de referencia se disolvieron en dioxano (10 ml). Entonces se añadió una disolución de trietilamina (0,46 ml) y dioxano (5 ml) a la disolución anterior, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los materiales no deseados se eliminaron mediante filtración del producto de reacción resultante, y después se evaporaron los disolventes. La disolución se separó mediante acetato de etilo y agua purificada. El residuo resultante se secó con sulfato de magnesio, y después se evaporó el disolvente. Los cristales brutos resultantes se lavaron con un disolvente mixto (10 ml) de n-hexano y acetato de etilo (3:1) para obtener el compuesto I-7 (859 mg; rendimiento: 85%).

55 RMN ¹H (DMSO_{d6}, δ PPM):

60 11,53 (1H, s), 11,49 (1H, s), 8,78 (1H, s), 8,71 (1H, s), 8,55 (2H, d, J = 7,9 Hz), 8,47 (1H, d, J = 6,6 Hz), 7,92 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,82 (1H, s), 6,35 (1H, s), 5,11 (2H, s), 3,58 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,12 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 9

65 Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-diisobutiriloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo
(Compuesto I-8)

El compuesto I-2 (5,0 g) obtenido en el ejemplo 2 se disolvió en 1,2-dimetoxietano (75 ml). Se le añadieron cloruro de isobutirilo (3,07 ml) y piridina (1,99 ml) con enfriamiento con hielo, y se hizo reaccionar a la misma temperatura durante 30 minutos. Los disolventes se evaporaron del producto de reacción resultante. A continuación, se añadió agua al producto de reacción, y la mezcla se separó mediante acetato de etilo. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, y después se evaporó el disolvente. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluido con cloroformo) para obtener el compuesto I-8 (5,37 g; rendimiento: 87%).

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

8,64 (1H, t, J = 1,5 Hz), 8,56 (1H, s), 8,52 (1H, td, J = 7,9 Hz, J = 1,5 Hz), 8,29 (1H, td, J = 8,0 Hz, J = 1,5 Hz), 7,74 (2H, s), 7,73 (1H, t, J = 7,7 Hz), 7,52 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,34 (1H, s), 5,18 (2H, s), 3,64 (2H, q, J = 7,1 Hz), 2,89 (2H, hept, J = 6,9 Hz), 1,36 (12H, d, J = 7,1 Hz), 1,21 (3H, t, J = 6,3 Hz)

Ejemplo 10

Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-diciclopentanocarboniloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-9)

El compuesto I-9 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó cloruro de ciclopentanocarbonilo en vez de cloruro de isobutirilo.

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

8,64 (1H, t, J = 1,5 Hz), 8,55 (1H, s), 8,52 (1H, td, J = 1,5 Hz, J = 7,8 Hz), 8,29 (1H, td, J = 1,6 Hz, J = 8,4 Hz), 7,74 (2H, s), 7,73 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,51 (1H, d, J = 5,1 Hz), 7,33 (1H, s), 5,18 (2H, s), 3,65 (2H, q, J = 7,1 Hz), 3,06 (2H, qu, J = 8,1 Hz), 2,20-1,40 (16H, m), 1,24 (3H, t, J = 7,1 Hz)

Ejemplo 11

Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-diacetiloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-10)

El compuesto I-10 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó cloruro de acetilo en vez de cloruro de isobutirilo.

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

8,64 (1H, t, J = 1,5 Hz), 8,56 (1H, s), 8,52 (1H, td, J = 8,0 Hz, J = 1,4 Hz), 8,29 (1H, td, J = 8,0 Hz, J = 1,6 Hz), 7,78 (2H, s), 7,73 (1H, t, J = 7,7 Hz), 7,51 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,35 (1H, s), 5,18 (2H, s), 3,64 (2H, q, J = 7,0 Hz), 2,38 (6H, s), 1,24 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 12

Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-dipropioniloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-11)

El compuesto I-11 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó cloruro de propionilo en vez de cloruro de isobutirilo.

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

8,63 (1H, t, J = 1,8 Hz), 8,55 (1H, s), 8,52 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,29 (1H, d, J = 7,9 Hz), 7,77 (2H, s), 7,73 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,51 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,35 (1H, s), 5,18 (2H, s), 3,64 (2H, q, J = 7,0 Hz), 2,69 (4H, q, J = 7,5 Hz), 1,32-1,21 (9H, m)

Ejemplo 13

Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-dipivaloiloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-12)

El compuesto I-12 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó

cloruro de pivaloilo en vez de cloruro de isobutirilo.

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

5 8,64 (1H, t, J = 1,5 Hz), 8,56 (1H, s), 8,52 (1H, dt, J = 1,5 Hz, 7,7 Hz), 8,29 (1H, dt, J = 1,6 Hz, J = 7,9 Hz), 7,73 (1H, t, J = 7,9 Hz), 7,69 (2H, s), 7,51 (1H, d, J = 5,3 Hz), 7,33 (1H, s), 5,19 (2H, s), 3,65 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,41 (18H, s), 1,24 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 14

10

3-{3-[4-(2,6-dibenzoiloxinicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo

(Compuesto I-13)

15 El compuesto I-13 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó cloruro de benzoilo en vez de cloruro de isobutirilo.

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

20 8,64 (1H, s), 8,56 (1H, s), 8,53 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,30 (1H, d, J = 8,2 Hz), 8,24 (5H, d, J = 6,6 Hz), 7,91 (2H, s), 7,77-7,65 (3H, m), 7,56-7,39 (6H, m), 5,18 (2H, s), 3,64 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,24 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 15

25 Síntesis de 3-{3-[4-(2,6-di-p-clorobenzoiloxiisonicotinoiloxi)-5-cloro-2-piridiloxicarbonil]benzoil}-1-etoximetil-5-fluorouracilo (Compuesto I-14)

El compuesto I-14 se obtuvo mediante el mismo método que aquel usado en el ejemplo 9, excepto que se usó cloruro de p-clorobenzoilo en vez de cloruro de isobutirilo.

30

RMN ¹H (CDCl₃, δ PPM):

35 8,64 (1H, s), 8,57 (1H, s), 8,52 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,29 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,18 (4H, d, J = 8,6 Hz), 8,03 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,96 (2H, s), 7,74 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,65-7,50 (4H, m), 7,38 (1H, s), 5,18 (2H, s), 3,64 (2H, q, J = 7,0 Hz), 1,24 (3H, t, J = 7,0 Hz)

Ejemplo 1 de ensayo

Acción inhibitoria de DPD y acción inhibitoria de OPRT *in vitro*

40

(a) Preparación de líquidos de ensayo (1): el compuesto I-2 de la presente invención se disolvió hasta una concentración de 10 mM en acetonitrilo. El producto resultante se diluyó hasta concentraciones de 1 mM, 100 μM, 10 μM, y 1 μM con una disolución de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0), obteniendo de ese modo los líquidos 1 de ensayo. Los líquidos 1 de ensayo obtenidos se añadieron separadamente a la disolución de la reacción enzimática descrita a continuación para proporcionar concentraciones finales de 200 μM, 20 μM, 2 μM, y 0,2 μM.

45

(b) Preparación de líquidos de ensayo (2): como inhibidor de DPD, se disolvió 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina (CDHP; gimeracilo) hasta una concentración de 10 mM en una disolución de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0). El producto resultante se diluyó hasta concentraciones de 1 mM, 100 μM, 10 μM, y 1 μM, obteniendo de ese modo líquidos 2 de ensayo. Los líquidos 2 de ensayo obtenidos se añadieron separadamente a la disolución de la reacción enzimática para proporcionar concentraciones finales de 200 μM, 20 μM, 2 μM, y 0,2 μM.

50

(c) Preparación de líquidos de ensayo (3): Como inhibidor de OPRT, se disolvió ácido citracínico (Citra. A.) hasta una concentración de 10 mM en disolución de amortiguador de trishidroxiaminometano-ácido clorhídrico 20 mM (pH 8,0). Después, el producto resultante se diluyó hasta concentraciones de 1 mM, 100 μM, y 10 μM con una disolución amortiguadora de fosfato potásico 10 mM, obteniendo de ese modo los líquidos de ensayo (3). Los líquidos 3 de ensayo obtenidos se añadieron separadamente a la disolución de la reacción enzimática para proporcionar concentraciones finales de 200 μM, 20 μM, y 2 μM.

60

(d) Preparación de disolución enzimática: El hígado de una rata SD de 8 semanas se usó como una fuente de enzima DPD, mientras que las células tumorales humanas que se habían trasplantado en un ratón atímico y que habían proliferado en él se usaron como una fuente de enzima OPRT. Específicamente, inmediatamente después se extrajeron hígado de rata o células tumorales humanas trasplantadas sucesivamente, se les añadió

65

una disolución amortiguadora de tris-ácido clorhídrico 50 mM (pH 8,0) que contiene sacarosa 0,25 M, cloruro de magnesio 5 mM, y ditreitol 1 mM hasta una concentración de 25% (p/v), y se homogeneizó. Después, la ultracentrifugación se llevó a cabo a 105.000 g durante 60 minutos, y el sobrenadante obtenido se usó como una disolución de enzima DPD o una disolución de enzima OPRT.

(e) Reacción enzimática: Se llevó a cabo una reacción enzimática con DPD según el método de de Tatsumi et al. (Gann, 78: 748-755 (1987)) usando como sustrato 5-FU marcado con tritio. Se llevó a cabo una reacción enzimática con OPRT según el método de Shirasaka et al. (Cancer Res., 53: 4004-4009 (1993)) usando como sustrato 5-FU marcado con tritio. Después, se midió la actividad de un grupo de control (sin compuesto de ensayo) y de grupos de compuestos de ensayo. El porcentaje de inhibición del compuesto de ensayo con respecto a DPD u OPRT se calculó usando la siguiente fórmula: $[1 - (\text{la actividad enzimática con el compuesto de ensayo} / \text{la actividad enzimática del grupo de control})] \times 100 (\%)$. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados.

Tabla 1

| Actividad inhibidora de DPD | | | | Actividad inhibidora de OPRT | | | |
|-----------------------------|------------|-------------------------|----------------|------------------------------|------------|-------------------------|----------------|
| Fármaco | Conc. (µM) | Actividad (nmol/ml/min) | Inhibición (%) | Fármaco | Conc. (µM) | Actividad (nmol/ml/min) | Inhibición (%) |
| Control | - | 1,009 | - | Control | - | 0,376 | - |
| CDHP | 200 | 0,106 | 89,5 | Citra. A. | 200 | 0,075 | 80,0 |
| | 20 | 0,074 | 92,7 | | 20 | 0,173 | 54,0 |
| | 2 | 0,195 | 80,7 | | 2 | 0,301 | 20,0 |
| | 0,2 | 0,597 | 40,8 | | 0,2 | 0,379 | 0,0 |
| Compuesto I-2 | 200 | 0,100 | 90,0 | Compuesto I-2 | 200 | 0,069 | 81,6 |
| | 20 | 0,075 | 92,6 | | 20 | 0,168 | 55,3 |
| | 2 | 0,157 | 84,4 | | 2 | 0,280 | 25,5 |
| | 0,2 | 0,613 | 39,2 | | 0,2 | 0,375 | 0,0 |

Tabla 2

| Inhibición de DPD (%) | | | Inhibición de OPRT (%) | | |
|-----------------------|--------|------|------------------------|--------|------|
| Fármaco | 0,2 µM | 2 µM | Fármaco | 0,2 µM | 2 µM |
| CDHP | 44,8 | 85,1 | Citra. A. | 31,9 | 75,1 |
| Compuesto I-10 | 43,9 | 77,2 | Compuesto I-10 | 27,8 | 76,4 |
| Compuesto I-9 | 45,7 | 74,6 | Compuesto I-9 | 41,2 | 75,9 |

(f) Resultados del ensayo: Los compuestos I-2, I-9 y I-10 de la presente invención inhibieron la actividad de DPD y la actividad de OPRT inducida sobre 5-FU como sustrato en el sistema de reacción enzimática *in vitro*. La actividad inhibidora de los compuestos de la presente invención fue casi igual a la de gimeracilo o de ácido citracínico, que sirvió como el control. Aunque el gimeracilo y el ácido citracínico no tienen actividad antitumoral, sí tienen actividad inhibidora de DPD o actividad inhibidora de OPRT. Esto confirmó que los agentes antitumorales de la presente invención tienen actividad inhibidora de DPD elevada y actividad inhibidora de OPRT elevada.

Ejemplo 2 de ensayo

Efecto inhibidor del compuesto I-2 sobre la activación de 5-FU (fosforilación) en células cancerosas

(a) Preparación 1 de líquidos de ensayo: El compuesto I-2 o I-10 de la presente invención se disolvió hasta una concentración de 1 mM en disolución salina fisiológica fría. El producto resultante se diluyó adicionalmente 10 veces con disolución salina fisiológica, produciendo una disolución 100 µM.

(b) Preparación 2 de líquidos de ensayo: Como inhibidor de OPRT, que inhibe la fosforilación de 5-FU, se disolvió ácido citracínico (Citra. A.) hasta una concentración de 1 mM en disolución salina fisiológica fría, y se diluyó adicionalmente 10 veces con disolución salina fisiológica, produciendo una disolución 100 µM.

(c) Preparación de suspensión de células cancerosas: Células de sarcoma 180 de tipo ascítico se trasplantaron de forma preliminar intraperitonealmente en un ratón ICR, y proliferaron en él para uso en el ensayo como células brutas (intactas). Las células que proliferaron se aislaron y después se lavaron con disolución salina fisiológica. Los peletes celulares se recogieron, se suspendieron a $1,25 \times 10^7$ células/ml en medio de Hank, y se usaron inmediatamente en el ensayo.

(d) Experimento sobre la inhibición de la fosforilación intracelular de 5-FU: Se añadieron 0,1 ml de cada líquido

de ensayo y 0,1 ml de una disolución de 5-FU 10 μM a 0,8 ml de células de sarcoma 180 en hielo, y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Inmediatamente después de terminar la reacción, se añadieron 4 ml de una disolución de Hank fría a la disolución de la reacción, y las células se lavaron y se separaron mediante centrifugación. Después de que este procedimiento se repitió dos veces, se añadieron al pelete celular 2 ml de una disolución fría de ácido tricloroacético (TCA) al 5% para destruir las células, y se extrajo el 5-FU y sus metabolitos nucleotídicos. Subsiguientemente, una porción del extracto de ácido nucleico se aplicó a una placa de gel de sílice 60F₂₅₄ y se desarrolló con un líquido mixto que comprende cloroformo-metanol-ácido acético (17.3:1) para asilar el resto nucleotídico. Se midió su radioactividad, y se midió la concentración de la fosforilación de 5-FU. En las condiciones descritas anteriormente, se calculó el porcentaje de inhibición de los líquidos 1 y 2 de ensayo sobre la fosforilación de 5-FU con respecto a un grupo de control (sin ningún líquido de ensayo). La tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

| Fármaco | Conc. (μM) | F-nucleótidos (pmol/1 x 10 ⁷ células) | % de inhibición |
|----------------|-------------------------|--|-----------------|
| Control | 0 | 60,93 | - |
| Compuesto I-2 | 10 | 47,26 | 22,4 |
| | 100 | 28,88 | 52,6 |
| CTA | 10 | 55,78 | 8,5 |
| | 100 | 51,72 | 15,1 |
| Control | 0 | 63,32 | - |
| Compuesto I-10 | 10 | 40,71 | 35,7 |
| | 100 | 27,62 | 56,4 |
| CTA | 10 | 62,19 | 1,8 |
| | 100 | 60,13 | 5,1 |

CTA: Ácido citrazínico

(e) Resultados del ensayo: Los compuestos I-2 y I-10 de la presente invención inhibieron, de una manera dependiente de la concentración, la fosforilación intracelular de 5-FU durante la reacción durante 30 minutos; a una concentración de 10 μM , el porcentaje de inhibición fue alrededor de 20 a 30%, y a una concentración de 100 μM , el porcentaje de inhibición fue 50 a 60%. Por el contrario, el ácido citracínico, que sirvió como control, no mostró casi ninguna inhibición sobre la fosforilación intracelular de 5-FU a lo largo de la reacción durante 30 minutos; incluso a una concentración de 100 μM , el porcentaje de inhibición fue solamente 5 a 15%. Los resultados anteriores confirman que los compuestos de la presente invención, tras ser captados por las células, inhiben la fosforilación de 5-FU inducida por OPRT, de una manera dependiente de la dosis.

25 Ejemplo 3 de ensayo

Efectos antitumorales y efectos secundarios en ratón trasplantado con células tumorales humanas

(a) Preparación 1 de líquidos de ensayo: El compuesto I-2 de la presente invención se suspendió a una concentración de 1,5, 2,25 o 3,0 mg/ml en una disolución de hidroxipropilmetilcelulosa (en adelante denominada simplemente "HPMC") al 0,5% (p/v), y se agitó con un agitador a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Después, se llevó a cabo el tratamiento ultrasónico con enfriamiento con hielo durante alrededor de 5 minutos, obteniendo de ese modo un líquido farmacéutico del compuesto I-2 para ser usado a una dosis de 15 mg/kg/día, 22,5 mg/kg/día, o 30 mg/kg/día.

(b) Preparación 2 de líquidos de ensayo: El compuesto I-10 de la presente invención se suspendió a una concentración de 2,57, 3,42, o 42,8 mg/ml en una disolución de HPMC al 0,5% (p/v), y se agitó con un agitador a temperatura ambiente durante alrededor de 10 minutos. Después, se llevó a cabo el tratamiento ultrasónico con enfriamiento con hielo durante aproximadamente 5 minutos, obteniendo de ese modo un líquido farmacéutico del compuesto I-10 para ser usado a una dosis de 25,7 mg/kg/día, 34,2 mg/kg/día, o 42,8 mg/kg/día.

(c) Preparación 3 de líquidos de ensayo: Entre los compuestos de la presente invención, una sustancia de ensayo (Compuesto 8a) que no contiene un resto de ácido citracínico se suspendió a una concentración de 1,15, 1,73, o 2,3 mg/ml en una disolución de HPMC al 0,5% (p/v), y se agitó con un agitador a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Después, se llevó a cabo el tratamiento ultrasónico con enfriamiento con hielo durante aproximadamente 5 minutos, obteniendo de ese modo un líquido farmacéutico del compuesto 8a para ser usado a una dosis de 11,5 mg/kg/día, 17,3 mg/kg/día, o 23 mg/kg/día.

(d) Preparación 4 de líquidos de ensayo: S-1 (patente nº 2614164), que es un agente de combinación que comprende tegafur-gimeracilo-oteracilo potásico en una relación molar de 1:0,4:1, se suspendió en una disolución de HPMC al 0,5% (p/v) de manera que la cantidad de tegafur fue 0,5, 0,75, o 1,0 mg/ml. El producto resultante se agitó con un agitador a temperatura ambiente durante alrededor de 10 minutos. Después, se llevó a cabo el tratamiento ultrasónico con enfriamiento con hielo durante aproximadamente 5 minutos, obteniendo de ese modo un líquido farmacéutico de S-1 para ser usado a una dosis de 5,0 mg/kg/día, 7,5 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día.

(e) Preparación 5 de líquidos de ensayo: La sustancia de ensayo BOF-A2 se suspendió a una concentración de 1,4, 2,1, o 2,8 mg/ml en una disolución de HPMC al 0,5% (p/v), y se agitó con un agitador a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Después, se llevó a cabo el tratamiento ultrasónico con enfriamiento con hielo durante aproximadamente 5 minutos, obteniendo de ese modo un líquido farmacéutico de BOF-A2 para ser usado a una dosis de 14 mg/kg/día, 21 mg/kg/día, o 28 mg/kg/día.

(f) Experimento: La cepa de cáncer gástrico humano (SC-2) se trasplantó subcutáneamente en la espalda de un ratón BALB/cA-nu, y proliferó de forma preliminar en él. La cepa que proliferó se extrajo, se cortó en trozos cuadrados de alrededor de 2 mm con unas tijeras en disolución salina fisiológica, y se inoculó subcutáneamente en la región axilar derecha de ratones de la misma raza, de 5 a 6 semanas, usando una aguja de trasplante. Los ratones resultantes se criaron para la adaptación al menos durante 1 a 2 semanas, y se dividieron en un grupo de control y grupos de fármacos de ensayo a tres dosis diferentes (3 grupos para el compuesto I-2; 3 grupos para el compuesto I-10; 3 grupos para el compuesto 8a; 3 grupos para S-1; y 3 grupos para BOF-A3), de manera que el volumen tumoral medio y la desviación estándar media (S.D.) fueron tan iguales como fuera posible entre los grupos (5 a 6 ratones por grupo) (día 0). Después, a partir del siguiente día, se inició la administración de los fármacos. Cada uno de los líquidos de ensayo mostrados en (a) a (e) anteriores se administró oralmente a los ratones en cada uno de los grupos de fármacos de ensayo usando una sonda para administración oral a una dosis de 0,1 ml por 10 g de peso corporal una vez al día durante 14 días continuos. De la misma manera que antes, los ratones que poseen cáncer en el grupo de control se sometieron a administración oral de solamente líquido de HPMC al 0,5% durante 14 días continuos.

El volumen tumoral de cada ratón en cada grupo antes del inicio del tratamiento, en el día 3, día 5, día 8 (1 semana después), día 11, y día 15 (2 semanas después), es decir, después de terminar la administración, se calculó usando la ecuación 1 a continuación, y se calculó el volumen tumoral relativo (RTV) respectivo con respecto al volumen tumoral en el momento de inicio del tratamiento. En relación con el efecto antitumoral, el valor medio de la relación de la inhibición (IR; %) de la proliferación tumoral se calculó a partir del volumen tumoral medio de cada grupo de tratamiento en el día 15 (después de terminar el tratamiento) con respecto al del grupo de control en el día 15, usando la ecuación 2. Además, se observó la aparición de diarrea y muerte a lo largo del período de tratamiento de 15 días. El número de incidentes se muestra en las tablas. Junto con ello, se calculó una relación de cambio de peso a partir del peso corporal de los ratones en el momento de terminar la administración de los fármacos con respecto al peso corporal de los ratones en el momento de iniciar la administración, usando la ecuación 3. La Tabla 4 muestra los resultados.

Ecuación 1:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{eje mayor}) \times (\text{eje menor})^2 \times 1/2$$

Ecuación 2:

$$\text{Relación de inhibición de la proliferación tumoral (IR, \%)} = [1 - (\text{volumen tumoral medio del grupo de tratamiento})/(\text{volumen tumoral medio del grupo de control})] \times 100$$

Ecuación 3:

$$\text{Relación de cambio de peso medio (\%)} = [(\text{peso medio en el Día 15}) - (\text{peso medio en el Día 1})]/(\text{peso medio en el día 1}) \times 100$$

Tabla 4

| Fármaco de ensayo | Dosificación (mg/kg/día) | Número (N) | Relación de inhibición de la proliferación tumoral (%) | Cambio medio de peso (%) | Diarrea (N) | Muerte (N) |
|-------------------|--------------------------|------------|--|--------------------------|-------------|------------|
| Compuesto I-2 | 15,0 | 5 | 41,1 | -1,13 | 0 | 0 |
| | 22,5 | 5 | 56,0 | -4,18 | 0 | 0 |
| | 30,0 | 5 | 67,9 | 1,76 | 0 | 0 |
| | | | | | | |

| Fármaco de ensayo | Dosificación (mg/kg/día) | Número (N) | Relación de inhibición de la proliferación tumoral (%) | Cambio medio de peso (%) | Diarrea (N) | Muerte (N) |
|-------------------|--------------------------|------------|--|--------------------------|-------------|------------|
| Compuesto I-10 | 25,7 | 6 | 31,9 | 7,97 | 0 | 0 |
| | 34,2 | 6 | 51,0 | -0,05 | 0 | 0 |
| | 42,8 | 6 | 57,7 | -4,31 | 0 | 0 |
| Compuesto 8a | 11,5 | 5 | 52,8 | 0,34 | 0 | 0 |
| | 17,3 | 5 | 58,1 | 2,32 | 0 | 0 |
| | 23,0 | 5 | 77,7 | -18,11 | 4 | 1 |
| BOF-A2 | 14 | 6 | 51,0 | 3,16 | 0 | 0 |
| | 21 | 6 | 70,9 | -7,48 | 0 | 0 |
| | 28 | 6 | 72,4 | -20,58 | 3 | 1 |
| S-1 | 5 | 6 | 54,0 | -0,09 | 0 | 0 |
| | 7,5 | 6 | 60,0 | -4,08 | 0 | 0 |
| | 10 | 6 | 79,4 | -1,84 | 0 | 0 |

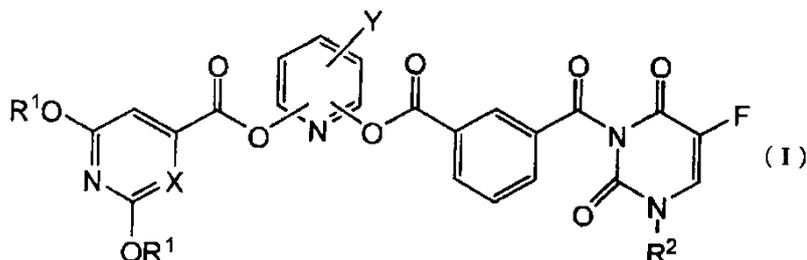
Resultados del ensayo: Los compuestos I-2 y I-10 de la presente invención mostraron fuertes efectos antitumorales de una manera dependiente de la dosis. Además, no se observó pérdida significativa de peso en los ratones, y tampoco se observó diarrea o muerte tóxica en los ratones. Esto confirma que los compuestos I-2 y I-10 de la presente invención muestran un fuerte efecto antitumoral con toxicidad reducida. Por el contrario, con respecto al compuesto 8a, que es igual a los compuestos de la presente invención pero no contiene ácido citracínico, el efecto antitumoral aumentó de una manera dependiente de la dosis en el intervalo de dosificación utilizado en este ensayo, pero se observó una pérdida de peso significativa, diarrea, y muerte en los ratones. BOF-A2 mostró un efecto antitumoral y una toxicidad similares a los del compuesto 8a, que es igual a los compuestos de la presente invención pero no contiene ácido citracínico. Específicamente, BOF-A2, a una dosis que muestra un fuerte efecto antitumoral, causó una pérdida de peso significativa, diarrea, y muerte tóxica en ratones. Similar a los compuestos de la presente invención, S-1, en el que se añaden gimeracilo (un inhibidor de DPD) y oteracilo potásico (un agente que reduce la toxicidad gastrointestinal) a tegafur (un derivado de 5-FU), mostró un efecto antitumoral de una manera dependiente de la dosis, y no provocó pérdida de peso significativa o diarrea en ratones, cuando se administró a dosis menores que 12,5 mg/kg/día, que se considera una sobredosis.

Como resulta evidente a partir de lo expuesto anteriormente, los compuestos de la presente invención presentan un excelente efecto antitumoral y un efecto reduciendo los efectos secundarios. Tales efectos son casi iguales a los de S-1, cuya utilidad es ampliamente reconocida en el campo de agentes antitumorales.

Contrariamente a S-1, que es un fármaco de combinación que comprende tres agentes, el compuesto de la presente invención esta en forma de un solo compuesto. Por lo tanto, se espera que las variaciones en la farmacocinética del metabolito sean pequeñas entre los pacientes. Específicamente, en el caso en el que se use una combinación de tres agentes, que pretende incrementar el efecto antitumoral de 5-FU a la vez que alivia los efectos secundarios, en particular la toxicidad gastrointestinal, cada componente es absorbido y distribuido generalmente de forma independiente, provocando variaciones en la farmacocinética entre pacientes. Estas variaciones provocan variaciones en la concentración de 5-FU, que dan posiblemente como resultado un caso en el que no se puede establecer un equilibrio favorable entre los efectos antitumorales y la toxicidad. Por el contrario, un fármaco en forma de un solo compuesto, que se diseña para lograr los objetos mencionados anteriormente, será absorbido a través del tejido gastrointestinal, después de lo cual se activará rápidamente en el cuerpo, y ejercerá sus funciones (liberación de 5-FU a partir de una forma enmascarada, inhibición de DPD, supresión de trastornos gastrointestinales). Por lo tanto, se supone que la diferencia entre la variación en la farmacocinética del metabolismo de los metabolitos activos *in vivo* entre pacientes es más pequeña que la de un fármaco de combinación.

REIVINDICACIONES

1. Derivado de 5-fluorouracilo representado por la fórmula (I) a continuación o sal del mismo:



5

en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo hidroxilo, R² representa un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆-alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆ o un grupo tetrahydrofurano, X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, e Y representa un átomo de halógeno o un grupo ciano;

10

en el que el grupo protector de un grupo hidroxilo se selecciona de entre el grupo que consiste en grupos acilo; grupos alcoxycarbonilo lineales o ramificados de C₂₋₇; grupos carbamoilo mono- o disustituídos mediante un grupo alquilo de C₁₋₆; grupos alquilo lineales o ramificados de C₁₋₆ sustituidos o no sustituidos; grupos alqueno lineales o ramificados de C₂₋₆; grupo bencilo, grupo benzhidrilo o grupo tritilo sustituidos o no sustituidos; grupos protectores de sililo; y restos de aminoácidos;

15

en el que los grupos acilo se seleccionan de entre el grupo que consiste en grupos acilo alifático de C₂₋₆ sustituidos o no sustituidos, grupo benzoilo, grupo α-naftoilo, o grupo β-naftoilo sustituidos o no sustituidos y grupos cicloalquilcarbonilo de C₃₋₆, en el que los sustituyentes de los grupos acilo alifático de C₂₋₆ sustituidos o el grupo benzoilo, grupo α-naftoilo, o grupo β-naftoilo sustituidos son 1 a 3 sustituyentes seleccionados de entre un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆, un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆, un átomo de halógeno, un grupo nitro, y un grupo carboxi;

20

en el que los sustituyentes del grupo alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆ sustituido son 1 a 3 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en un átomo de halógeno y un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆;

25

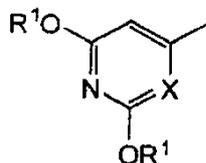
en el que los sustituyentes del grupo bencilo, grupo benzhidrilo o grupo tritilo sustituidos son 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆, un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆, un átomo de halógeno, un grupo nitro y un grupo ciano;

30

y en el que los grupos protectores de sililo se seleccionan de entre el grupo que consiste en un grupo trimetilsililo, un grupo terc-butildimetilsililo, un grupo metildiisopropilsililo, un grupo triisopropilsililo, un grupo tetraisopropildisiloxilo (TIPDS) y un grupo difenilmetsililo.

35

2. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según la reivindicación 1, en el que el grupo representado por la fórmula siguiente en la fórmula (I) es:



40

un grupo representado por:

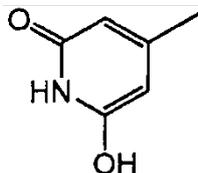


45

en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alilo, o un grupo bencilo que está no sustituido o que está sustituido con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆, un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆, un átomo de halógeno, un grupo nitro y un grupo

ciano;

un grupo representado por:



5

un grupo representado por:

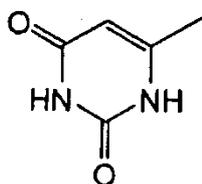


10

en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alilo, o un grupo bencilo que está no sustituido o que está sustituido con 1 a 5 sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁₋₆, un grupo alcoxi lineal o ramificado de C₁₋₆, un átomo de halógeno, un grupo nitro y un grupo ciano; o

15

un grupo representado por:



20

3. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alilo, un grupo bencilo, un grupo acilo alifático, un grupo acilo aromático, o un grupo acilo alicíclico, R² representa un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior presenta 1 a 6 átomos de carbono o un grupo tetrahidrofuranilo, X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, e Y representa un átomo de flúor o un átomo de cloro.

25

4. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo bencilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo isobutirilo, un grupo pivaloilo, un grupo benzoilo, un grupo p-clorobenzoilo, o ciclopentanocarbonilo, R² representa un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior presenta 1 a 6 átomos de carbono, X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, e Y representa un átomo de flúor o un átomo de cloro.

30

5. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, R² representa un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior presenta 1 a 6 átomos de carbono, X representa un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, e Y representa un átomo de cloro.

35

6. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, R² representa un grupo alcoximetilo inferior en el que el resto alcoxi inferior presenta 1 a 6 átomos de carbono, X representa un átomo de carbono, e Y representa un átomo de cloro.

40

7. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, R² representa un grupo etoximetilo, X representa un átomo de carbono, e Y representa un átomo de cloro.

45

8. Medicamento que comprende el derivado de 5-fluorouracilo o una sal del mismo según cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 7 como un principio activo.

9. Agente antitumoral que comprende el derivado de 5-fluorouracilo o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un principio activo.

5 10. Agente antitumoral según la reivindicación 9, en el que el agente antitumoral se utiliza para tratar por lo menos un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cánceres de cabeza y cuello, cánceres esofágicos, cánceres gástricos, cánceres colónicos, cánceres rectales, cánceres hepáticos, cánceres de la vesícula biliar y del conducto biliar, cánceres de las vías biliares, cánceres pancreáticos, cánceres pulmonares, cánceres de mama, 10 cánceres ováricos, cánceres de cuello uterino, cánceres endometriales, cánceres renales, cánceres de vejiga, cánceres prostáticos, tumores testiculares, sarcoma de hueso y de tejido blando, leucemia, linfomas malignos, mielomas múltiples, cánceres de piel, tumores de cerebro, y mesoteliomas.

15 11. Derivado de 5-fluorouracilo o sal del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento de un cáncer.

12. Utilización del derivado de 5-fluorouracilo o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la fabricación de un agente antitumoral.