

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 932**

51 Int. Cl.:

**C07D 403/12** (2006.01)

**A61K 31/53** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/AU2011/001376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12054978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11835350 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2632916**

54 Título: **Agentes antineoplásicos novedosos**

30 Prioridad:

**27.10.2010 US 407265 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2017**

73 Titular/es:

**The Walter and Eliza Hall Institute of Medical  
Research (100.0%)  
1G Royal Parade  
Parkville, VIC 3050 AU**

72 Inventor/es:

**BURGESS, ANTONY WILKS;  
WALKER, FRANCESCA;  
WATSON, KEITH GEOFFREY;  
WITCHARD, HELEN y  
LESSENE, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 621 932 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

Agentes antineoplásicos novedosos

5 **Campo de la invención**

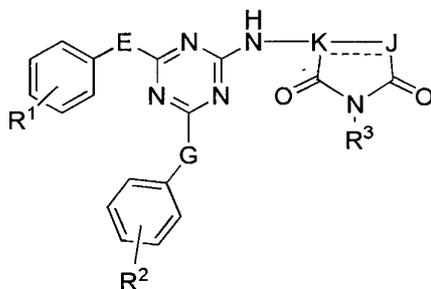
La presente invención se refiere a una clase de compuestos útiles en el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de cerebro y el cáncer de mama.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer es una enfermedad de gran importancia que es una de las principales causas de muerte en el mundo. Un aspecto importante del tratamiento del cáncer es la quimioterapia con agentes antineoplásicos. Sin embargo, el tratamiento del cáncer utilizando quimioterapia rara vez es sencillo y existe una necesidad generalizada de desarrollar nuevos y mejores agentes antineoplásicos que actúen mediante diferentes mecanismos y vías.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I (compuesto de la presente invención) o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:



Fórmula I

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

— es un enlace sencillo; K se selecciona independientemente entre CH y N, y J se selecciona independientemente entre NH y CH<sub>2</sub>; o

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en los que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -NO<sub>2</sub>, halógeno y CF<sub>3</sub>;

cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)R<sup>5</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; o

-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo;

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y -fenilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, arilo y alquilarilo;

y en el que dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en el que el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal, hidrato y/o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

- 5 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

#### Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1:** Determinación de tubulina estabilizada frente a soluble en células tratadas con bloqueantes de G2/M. Se solubilizaron células LIM1215 tratadas con vehículo, Taxol o compuesto 3 (198-02) en NP-40. Se analizaron volúmenes iguales de sobrenadante y material insoluble resuspendido mediante SDS/PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos para  $\beta$ -tubulina. Tubulina S = soluble y P = polimerizada. Se obtuvieron resultados similares en la estirpe celular BaF/3.

15 **Figura 2: Efecto de compuestos de la presente invención sobre la polimerización de la tubulina "in vitro".** Se pre-equilibró tubulina (1 mg/ml en tampón PIPES/MgCl<sub>2</sub>/GTP) en la cubeta de un espectrofotómetro Cary 50 antes de la adición de tampón (A), Taxol (B), triazina 0,5 mM (C) o triazina 2 mM (D), (flecha). Se tomaron lecturas de DO[340] a intervalos de 5 s durante 30 min.

20 **Figura 3:** Cromatogramas representativos de plasma de ratón extraído. A: Plasma de ratón normal con HC. B: Plasma de ratón normal con adiciones de Compuesto 2 (156-01) y HC para la curva patrón. C: El plasma obtenido 2 horas después de la inyección del Compuesto 2 (156-01) muestra el pico de Compuesto 2 (156-01) recuperado, así como otros 3 picos de posibles metabolitos.

25 **Figura 4: Análisis espectral de picos de posibles metabolitos.** A. Cromatogramas superpuestos de compuesto 2 convencional (156-01) en plasma (línea de puntos) y el plasma de un ratón inyectado (línea continua). B. Espectros UV de los picos purificados.

30 **Figura 5: Efectos antimitóticos de metabolitos recuperados de plasma de ratón después de la inyección de compuesto 2.** Se incubaron células BaF/3 durante 24 horas con cantidades crecientes de cada pico reconstituido. La distribución del ciclo celular se evaluó mediante análisis por FACS utilizando yoduro de propidio. El porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular se determinó utilizando ModFi.

35 **Figura 6: Representaciones de concentraciones plasmáticas de compuesto 2 en ratones después de una única dosis subcutánea de 50 mg/kg.** Cada punto corresponde a un ratón individual. A: Representación semilogarítmica de concentraciones calculadas de valores del Pico 1. B: Representación semilogarítmica de valores incluyendo todos los picos de metabolitos. C: Valores medios y de ET que comparan solamente el Pico 1 con todos los picos.

40 **Figura 7: Crecimiento del tumor de LIM2537 en ratones desnudos.** Se midieron los diámetros de los tumores con calibres externos cada tres días y el volumen del tumor se calculó con la fórmula:  $\pi/6 \times (L \times W^2)$ . Había una clara diferencia entre animales tratados con el control de vehículo (curva negra) y los tratados con el compuesto 2 a 15 mg/kg (curva roja), tres días a la semana comenzando el día 3 del experimento.

45 **Figura 8: Crecimiento del tumor de U87MG ( $\Delta$ 2-7) en ratones desnudos.** Se midieron los diámetros de los tumores con calibres externos cada tres días y el volumen del tumor se calculó con la fórmula:  $\pi/6 \times (L \times W^2)$ . Había una clara diferencia entre animales tratados con el control de vehículo (curva negra) y los tratados con el compuesto 2 a 20 mg/kg, tres días a la semana comenzando el día 5 del experimento.

50 **Figura 9:** Los animales tratados con el compuesto 2 (marcado "156-01") (barras verdes) no mostraron ninguna diferencia significativa en los pesos de su hígado o su bazo con respecto a los animales tratados con el control de vehículo (rojo), mientras que el peso del tumor se redujo en gran medida.

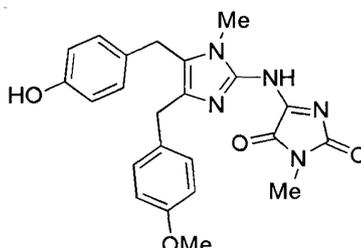
55 **Figura 10: Crecimiento del tumor de H1437 en ratones desnudos.** Se midieron los diámetros de los tumores con calibres externos cada tres días y el volumen del tumor se calculó con la fórmula:  $\pi/6 \times (L \times W^2)$ . Había una clara diferencia entre animales tratados con el control de vehículo (curva negra) y los tratados con el compuesto 2 a 20 mg/kg, tres días a la semana comenzando el día 5 del experimento.

60 **Figura 11:** Fotografía de los tumores de xenoinjerto de H1437 extirpados del animal tratado con control de vehículo (tres filas superiores) y tratado con compuesto 2 (20 mg/kg, tres veces por semana) fila inferior. Puede observarse una clara diferencia de tamaño.

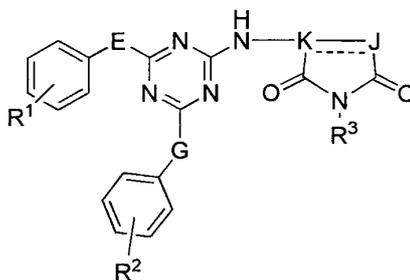
65

**Descripción detallada de la invención**

- 5 Se ha notificado que la naamidina A, un alcaloide de imidazol extraído de esponjas *Leucetta*, inhibe selectivamente la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) e inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto en ratón utilizando una estirpe celular de cáncer humano que sobreexpresa enormemente el receptor de EGF (Copp *et al.*, *J. Med. Chem.* 1998, 41:3909).

**Naamidina A**

- 10 Zheng *et al.* (*Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 1815-1827) desvelan una serie de derivados de triaminotriazina que se han evaluado para las actividades de inhibición de las estirpes celulares de cáncer colorrectal. La mayoría de los compuestos sintetizados demuestran efectos antiproliferativos moderados en ambas estirpes celulares HCT-116 y HT-29 a la concentración de 10  $\mu$ M.
- 15 El documento US 5.574.057 A desvela naamidina A aislada de esponjas marinas que se encontró que era selectiva en la inhibición del crecimiento de células tumorales que dependen del factor de crecimiento epidérmico para su crecimiento, mientras que muestra una citotoxicidad general aceptablemente baja.
- El documento WO 2004/026844 A1 desvela métodos y composiciones de compuestos de triazina novedosos y su  
20 utilidad en el tratamiento de diversas divulgaciones.
- En la búsqueda de inhibidores de molécula pequeña específicos para el receptor de EGF, los presentes inventores sintetizaron varios análogos de Naamidina A y evaluaron su actividad biológica.
- 25 Sorprendentemente, los presentes inventores identificaron una clase de moléculas relacionadas con la Naamidina A que muestran una actividad citostática y/o citotóxica y que no actúan a través de la vía de señalización de EGF. Esta clase de compuestos de triazina son prometedores como agentes antineoplásicos con actividad antineoplásica en el intervalo nanomolar.
- 30 En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal, hidrato y/o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

**Fórmula I**

- 35 E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y — es un enlace sencillo;
- K se selecciona independientemente entre CH y N, y J se selecciona independientemente entre NH y CH<sub>2</sub>;
- 40 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes (que significa 0, 1 o 2 sustituyentes o un intervalo que comprende dos cualquiera de los números enteros) en los que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -NO<sub>2</sub>, halógeno y CF<sub>3</sub>;
- cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -C(O)R<sup>5</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH;  $\bullet$
- N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo;

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y -fenilo;  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, -alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y alquilarilo; y en el que dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, carbamato, amida o éster de alquilo está unido covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en el que el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

En una realización,  $\text{---}$  es un enlace sencillo y (i) K es CH y J es NH o (ii) K es N y J es CH<sub>2</sub>.

Preferentemente, R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, metilo, propilo, butilo y fenilo.

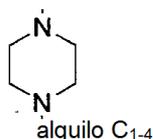
En una realización, E se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de E está unido al anillo de triazina.

En una realización, G se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de G está unido al anillo de triazina.

Preferentemente, E es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>, más preferentemente E es -NH-CH<sub>2</sub>-.

Preferentemente, G es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>, más preferentemente G es -NH-CH<sub>2</sub>-.

En una realización desvelada pero no reivindicada R<sup>1</sup> es -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> que forma un grupo piperazinilo sustituido con -alquilo C<sub>1-4</sub>, de fórmula:



Preferentemente, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno independientemente 1-2 sustituyentes, más preferentemente R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 1 sustituyente.

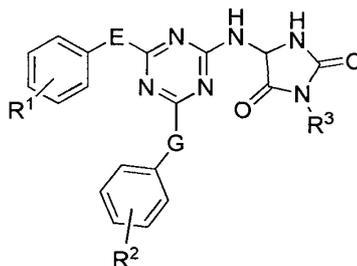
En una realización, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es al menos un sustituyente para.

Preferentemente, cada sustituyente R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquilo C<sub>1-4</sub>, más preferentemente, cada sustituyente R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, -OMe y -CH<sub>3</sub>.

Preferentemente, cada sustituyente R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>.

Más preferentemente, cada sustituyente R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, -OMe, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)O(*t*-Bu).

En una realización preferida, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula II o una sal, hidrato y/o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:



**Fórmula II**

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

5 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en los que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -NO<sub>2</sub>-, halógeno y CF<sub>3</sub>;

cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)R<sup>5</sup>-, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; o

10 -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo;

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>- y -fenilo;

15 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>- y -arilo;

y en el que dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, carbamato, amida o éster de alquilo está unido covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en el que el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

25 En una realización, E se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N-(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de E está unido al anillo de triazina.

En una realización, G se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N-(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de G está unido al anillo de triazina.

30 Preferentemente, E es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente, E es -NH-CH<sub>2</sub>-.

Preferentemente G es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente, G es -NH-CH<sub>2</sub>-.

35 En una realización la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II en la que R<sup>1</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -alquilo C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>-; y R<sup>2</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -alquilo C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>- en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-.

40 Preferentemente, cada sustituyente R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH-, -OMe-, -CH<sub>3</sub>- y cada sustituyente R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -alquilo C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>-; en el que R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-.

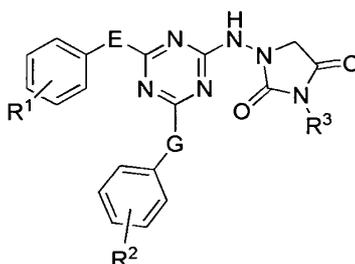
45 Más preferentemente, R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -OH-, -OMe-, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>- y -CHNH-C(O)O(*t*-Bu)-.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II en la que R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, metilo, propilo, butilo y fenilo.

50 En una realización, R<sup>3</sup> es una cadena de alquilo lineal.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula III o una sal, hidrato y/o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

55



Fórmula III

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en los que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>-, -NO<sub>2</sub>-, halógeno y CF<sub>3</sub>-;

cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)R<sup>5</sup>-, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; o

-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo;

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>- y -fenilo-;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>- y -arilo-;

y en el que dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, carbamato, amida o éster de alquilo está unido covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en el que el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

En una realización, E se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N-(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de E está unido al anillo de triazina.

En una realización, G se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N-(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de G está unido al anillo de triazina.

Preferentemente, E es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente E es -NH-CH<sub>2</sub>-.

Preferentemente G es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente G es -NH-CH<sub>2</sub>-.

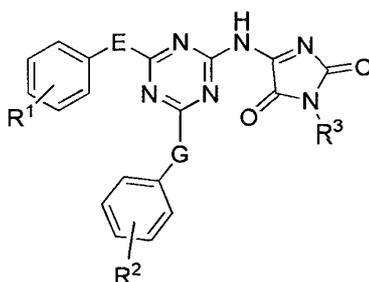
En una realización la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II en la que R<sup>1</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-; y R<sup>2</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-; en el que cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-;

Preferentemente, R<sup>1</sup> es -OMe y R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-; en el que cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-.

Más preferentemente, R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -OMe-, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>- y -CHNH-C(O)O(t-Bu)-.

Preferentemente, R<sup>3</sup> es hidrógeno.

Adicionalmente se desvela un compuesto de Fórmula IV o un derivado farmacéutico, sal o profármaco del mismo, no incluido en la invención en la que:



Fórmula IV

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-;

5 R<sup>1</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>-, -O-alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -O-alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -cicloalquil C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -O-fenilo-, -O-bencilo-, -NO<sub>2</sub>-, halógeno y -CF<sub>3</sub>;

en el que cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, alquilo C<sub>1-4</sub>-, C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>5</sup>; ○

10 -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>; R<sup>2</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>-, -O-alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>-, -alquilo C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>-, -O-fenilo-, -O-bencilo-, -NO<sub>2</sub>-, halógeno y -CF<sub>3</sub>;

15 cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>8</sup>, a condición de que si un R<sup>6</sup> es -OH entonces el otro R<sup>6</sup> no puede ser -OH; ○

-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>; en la que cada uno de R<sup>5</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y -fenilo;

20 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub> y -arilo; y en la que R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C<sub>1-4</sub>.

En una realización, E se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de E está unido al anillo de triazina.

25 En una realización, G se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; en el que el heteroátomo de G está unido al anillo de triazina.

Preferentemente E es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente E es -NH-CH<sub>2</sub>-.

30 Preferentemente G es -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, más preferentemente G es -NH-CH<sub>2</sub>-.

35 Se desvela un compuesto de fórmula IV en la que R<sup>1</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>; y R<sup>2</sup> es 1-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>;

en el que cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>;

40 en el que cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>;

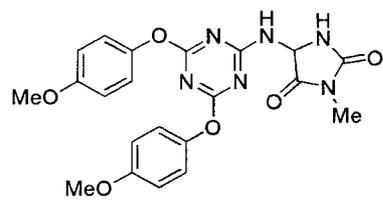
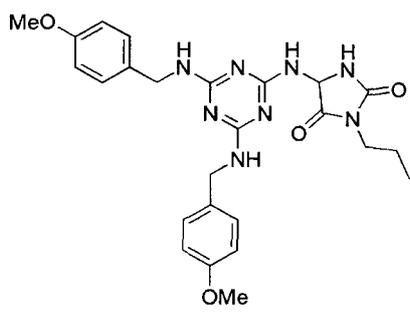
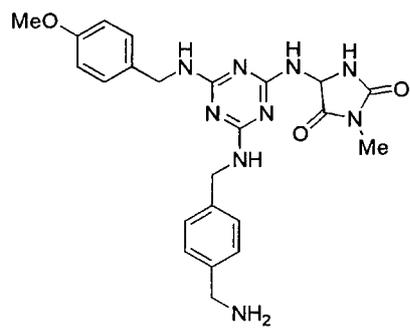
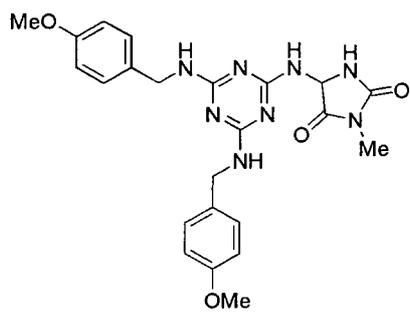
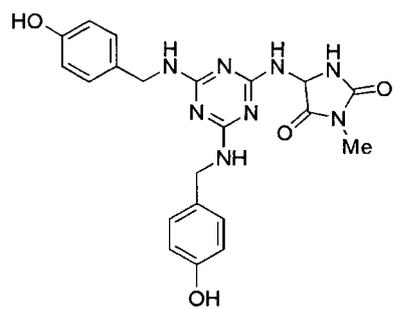
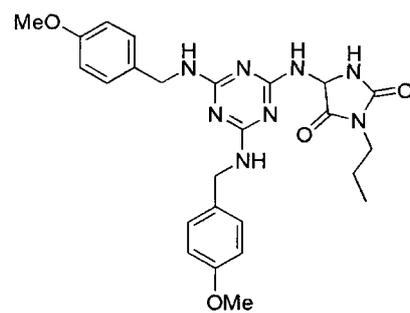
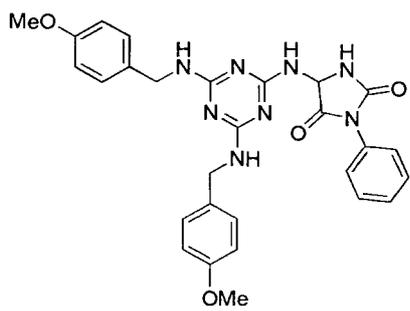
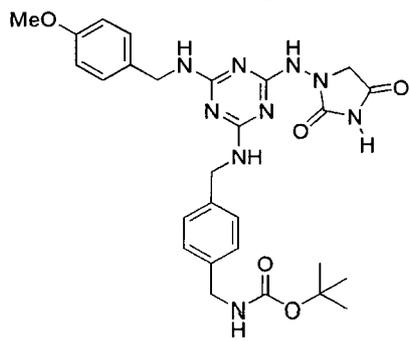
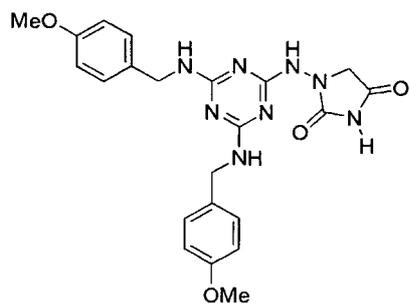
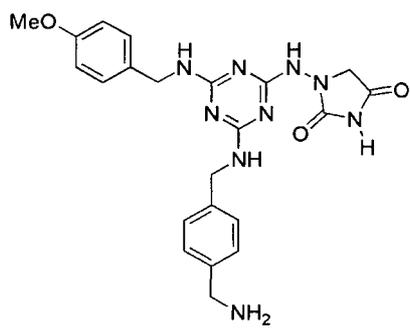
Preferentemente, R<sup>1</sup> es -OMe y R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>;

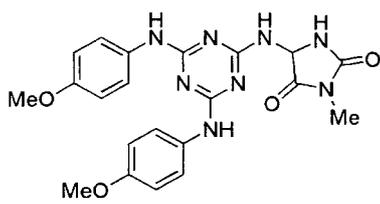
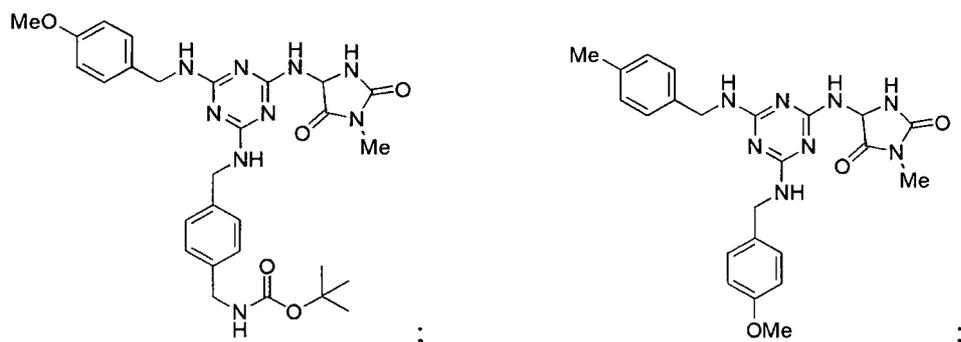
45 en el que cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -alquilo C<sub>1-4</sub> y -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>.

Más preferentemente, R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -OMe-, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> y -CHNH-C(O)O(*t*-Bu).

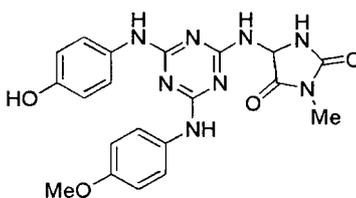
50 En otra realización se desvela un compuesto de fórmula IV en la que R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H-, metilo, propilo, butilo y fenilo. Preferentemente, R<sup>3</sup> es hidrógeno.

En una realización la presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:



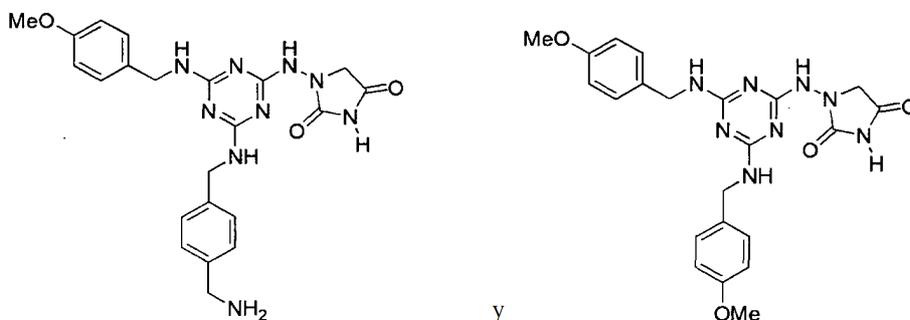


5 y



Preferentemente, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:

10



15

20

Chang *et al.* (documento US 2004/0122009) han sintetizado compuestos de triazina que tienen efectos antiproliferativos similares a los de la mioseverina. Los compuestos Chang son estructuralmente distintos de los compuestos de la presente invención y son menos activos frente a estirpes celulares de cáncer en órdenes de magnitud. Además, los compuestos desvelados en Chang *et al.* tienen una actividad biológica sorprendentemente diferente de los compuestos de la presente invención. En sus estudios, Chang *et al.* han descubierto que sus compuestos muestran una estrecha correlación entre los valores de  $CI_{50}$  necesarios para la polimerización de la tubulina y para la inhibición del crecimiento de células de leucemia humana U937 (véase la Tabla 1, página 25). Por el contrario, los presentes inventores han descubierto que, para los compuestos de la presente invención, la concentración necesaria para la polimerización de la tubulina era más de 1000 veces mayor que la  $CI_{50}$  en ensayos de proliferación celular.

25

Como se utiliza en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor (fluoro), cloro (cloro), bromo (bromo) o yodo (yodo).

30

Como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" ya sea utilizado solo o en términos compuestos tales como NH(alquilo) o N(alquilo)<sub>2</sub>, se refiere a grupos hidrocarbonados monovalentes de cadena lineal o ramificados. Por ejemplo, los grupos alquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo y terc-butilo.

Como se entiende por un experto en la materia, la expresión "alquilo C<sub>1-4</sub>" significa una cadena lineal o ramificada con 1, 2, 3 o 4 átomos de carbono o un intervalo que comprenda dos cualquiera de esos números enteros.

5 El término "arilo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo hidrocarburo aromático C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, por ejemplo fenilo o naftilo.

El término "cicloalquilo" como se utiliza en el presente documento, se refiere a grupos hidrocarbonados cíclicos. Los grupos cicloalquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

10 Como se entiende por un experto en la materia, la expresión "cicloalquilo C<sub>3-6</sub>" significa un grupo cicloalquilo con 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono o un intervalo que comprenda dos cualquiera de esos números enteros.

El término "alquilarilo" incluye, por ejemplo, bencilo.

15 Los nitrógenos de amina pueden estar protegidos por grupos protectores de nitrógeno adecuados (véase "*Protective Groups in Organic Synthesis*" Theodora Greene y Peter Wuts, tercera edición, Wiley Interscience, 1999).

20 Las sales del compuesto de fórmula I son preferentemente farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también pertenecen al alcance de la presente invención, puesto que éstas son útiles como intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

25 La expresión "derivado farmacéuticamente aceptable" puede incluir cualquier sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptables o cualquier otro compuesto que tras la administración a un sujeto, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula I o un metabolito activo o resto del mismo.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, málico, cítrico, láctico, múxico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

35 Las sales de bases incluyen, pero no se limitan a, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, cinc, amonio; alquilamonio (tales como las sales formadas a partir de trietilamina) y alcoxiamonio (tales como las formadas con etanolamina). Las sales de bases también incluyen las sales formadas a partir de etilendiamina, colina; y aminoácidos (tales como arginina, lisina o histidina). La información general sobre los tipos de sales farmacéuticamente aceptables y su formación es conocida por los expertos en la materia y es como se describe en los textos generales tales como "*Handbook of Pharmaceutical Salts*" P. H. Stahl, C. G. Wermuth, primera edición, 2002, Wiley-VCH.

40 Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluro de alquilo inferior, tal como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo y dietilo; y otros.

45 Los grupos hidroxilo pueden esterificarse con grupos que incluyen ácidos carboxílicos de alquilo inferior, tales como ácido acético y ácido 2,2-dimetilpropiónico, pueden sulfonarse con grupos que incluyen ácidos alquil sulfónicos, tales como el ácido metil sulfónico o pueden glucosilarse para formar derivados de glucurónidos.

50 La presente invención también abarca composiciones farmacéuticas que contienen profármacos de compuestos de fórmula I. La presente invención también abarca los profármacos de compuestos de fórmula I como se reivindica para su uso en métodos de tratamiento o de prevención del cáncer en un sujeto mediante la administración de profármacos de compuestos de fórmula I. Los compuestos de fórmula I que tienen grupos amino, amido, hidroxilo o carboxílico pueden convertirse en profármacos.

55 Los profármacos incluyen compuestos en los que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) restos de aminoácidos están unidos covalentemente a grupos amino, hidroxilo y ácido carboxílico libres de compuestos de fórmula I. Los residuos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos de origen natural habitualmente designados por símbolos de tres letras y también incluyen, 4-hidroxi prolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metilhistidina, norvlina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y sulfona de metionina. Los profármacos también incluyen compuestos en los que carbonatos, carbamatos, amidas y ésteres de alquilo están unidos covalentemente a los sustituyentes anteriores de fórmula I a través de la cadena lateral de profármaco de carbono carbonílico. Los profármacos también incluyen derivados de fosfato de compuestos de fórmula I (tales como ácidos, sales de ácidos o ésteres) unidos a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I.

65 También se reconocerá que los compuestos de fórmula I pueden poseer centros asimétricos y son por tanto

capaces de existir en más de una forma estereoisomérica. La invención por tanto se refiere también a compuestos en forma isomérica sustancialmente pura en uno o más centros asimétricos, por ejemplo, más de aproximadamente el 90 % de ee, tal como aproximadamente el 95 % o el 97 % de ee o más del 99 % de ee, así como mezclas, incluyendo mezclas racémicas, de los mismos.

5 Dichos isómeros pueden prepararse mediante síntesis asimétrica, por ejemplo utilizando intermedios quirales o mediante resolución quirál.

10 En una realización la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o una sal, hidrato y/o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

15 En otra realización la presente invención proporciona un compuesto como se reivindica para su uso en el tratamiento del cáncer.

Preferentemente, el cáncer es el cáncer de colon, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer de cerebro o el cáncer de mama.

20 Los presentes inventores descubrieron que las triazinas de la presente invención son al menos tan eficaces como el Taxol en la inducción del bloqueo de G2/M a sus concentraciones óptimas. Sin embargo, aunque el Taxol actúa mediante la estabilización de la polimerización de la tubulina, experimentos adicionales mostraron que la polimerización de la tubulina inducida por triazina fue mínima y se produjo a dosis muy superiores a su potencia como bloqueantes mitóticos.

25 Por tanto, en una realización, el cáncer es resistente a los taxanos, por ejemplo paclitaxel, docetaxel y carbazitaxel.

En una realización, el cáncer es resistente a los inhibidores de la mitosis, en el que los inhibidores de la mitosis interfieren directamente con el ensamblaje y desensamblaje de la tubulina.

30 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos como se describe a continuación y pueden formularse, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado al modo de administración deseada (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, sabores, etc.) de acuerdo con técnicas tales como las bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica.

40 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía parenteral, tal como mediante técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intracisternal (por ejemplo, como soluciones o suspensiones estériles inyectables acuosas o no acuosas).

45 Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo la bucal y la sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo la intramuscular, la subcutánea y la intravenosa) o en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación. Los compuestos de la invención, junto con un adyuvante, vehículo o diluyente convencional, por tanto, pueden ponerse en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de las mismas y en dicha forma pueden emplearse como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, o líquidos como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todos para su uso oral, en forma de supositorios para la administración rectal; o en forma de soluciones inyectables estériles para su uso parenteral (incluyendo el subcutáneo).

50 Además de los primates, tales como los seres humanos, otros diversos mamíferos puede hacer uso del compuesto de la invención. Por ejemplo, mamíferos incluyendo, pero no limitados a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas pueden hacer uso del mismo. Sin embargo, el compuesto puede utilizarse en otras especies, tales como especies aviares (por ejemplo, pollos).

60 Los sujetos que pueden hacer uso del compuesto de la invención son mamíferos, incluyendo, pero no limitados a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas y preferentemente un ser humano, hombre o mujer.

65 La expresión "cantidad eficaz" significa la cantidad de la composición de la invención que desencadenará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

Como se entenderá por los expertos en la materia del tratamiento del cáncer, el término "tratamiento" no significa

necesariamente que el cáncer esté completamente curado. El término "tratamiento" abarca cualquier inhibición de la replicación de las células cancerosas y/o reducción en el tamaño del tumor en el sujeto que se trata.

5 El término "composición", como se utiliza en el presente documento pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor del mismo.

10 Debería entenderse que las expresiones "administración de" y/o "administrar un" compuesto significan proporcionar un compuesto de la invención al individuo que necesita tratamiento.

15 Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de la presente invención pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido o ambos y después, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el compuesto activo objeto se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o estado de las enfermedades. Como se utiliza en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes y los agentes suspensores adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean aceites no volátiles estériles convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran un uso en la preparación de inyectables.

35 La composición farmacéutica y el uso de la presente invención pueden comprender adicionalmente otros compuestos terapéuticamente activos que por lo general se aplican en el tratamiento de los procesos patológicos mencionados anteriormente. La selección de los agentes apropiados para su uso en terapia de combinación puede ser realizada por un experto habitual en la materia, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Utilizando este enfoque, es posible conseguir una eficacia terapéutica con dosificaciones menores de cada agente, reduciendo de este modo la posibilidad de efectos secundarios adversos.

45 Cuando se emplean otros agentes terapéuticos en combinación con los compuestos de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, en cantidades como se indica en la *Physician Desk Reference* (PDR) o como se determine de otro modo por un experto habitual en la materia.

50 En el tratamiento o la prevención de afecciones que requieren la inhibición de la replicación de las células cancerosas y/o la reducción del tamaño del tumor, un nivel de dosificación apropiado será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que puede administrarse en una sola o múltiples dosis. Preferentemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, de 0,5 a 5 o de 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se trata. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces por día, preferentemente una o dos veces por día.

65 Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular puede variarse y dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el hospedador sometido a terapia.

En toda la presente memoria descriptiva se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas.

No debe tomarse ningún análisis de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva, como una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos formen parte de la base de la técnica anterior o fueran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención como existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente se describirán ahora formas preferidas de la misma por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

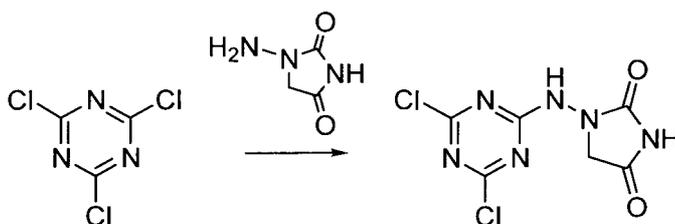
## Ejemplos

### Ejemplo 1. Química de síntesis

Se desarrolló un protocolo de síntesis rápido, de alto rendimiento, que permitió la modificación del armazón de 1,3,5-triazina para producir una gama de derivados sustituidos de triazina.

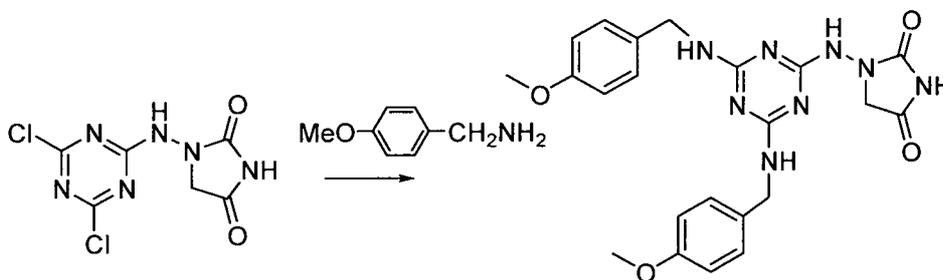
**Ejemplo 1.1 - Método de síntesis para la preparación de 1-[4,6-bis-(4-metoxibencilamino)-(1,3,5)-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 1**)**

Parte A Preparación de 1-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-il-amino)-imidazolidina-2,4-diona



Un suspensión enfriada con hielo de clorhidrato de 1-aminohidantoína (457 mg, 3,0 mmol), cloruro cianúrico (500 mg, 2,73 mmol) y bicarbonato de sodio (505 mg, 6 mmol) en acetonitrilo (5 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 2 h y después se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se extrajo con acetato de etilo y el acetato de etilo se separó y se secó ( $\text{MgSO}_4$ ). El producto en bruto (770 mg) proporcionó una única mancha en la cromatografía en capa fina [sílice;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (10:1)] y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  = 4,11 (s, 2H); 8,71 (s, 1H); 8,85 (s, 1H).

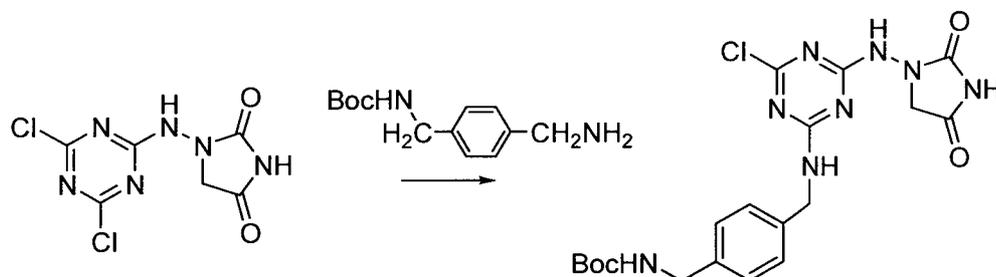
Parte B Preparación de 1-[4,6-bis-(4-metoxibencilamino)-(1,3,5)-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 1**)



A una suspensión agitada de 1-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-il-amino)-imidazolidina-2,4-diona (770 mg, 2,93 mmol) y carbonato de potasio (2,42 g, 17,6 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a temperatura ambiente se le añadió 4-metoxibencilamina (0,96 ml, 7,32 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y después el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo y el acetato de etilo se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó para proporcionar el producto en bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (50:1  $\rightarrow$  10:1) como eluyente. El producto puro se aisló en forma de un sólido incoloro (587 mg, 43 %). RMN  $^1\text{H}$  ( $d_6$  DMSO):  $\delta$  = 3,67 (s, 6H); 3,96 y 4,05 (2s, 2H total); 4,20 y 4,32 (2s, 4H total); 6,80 (s a, 4H); 7,13-7,39 (m, 6H); 8,67, 8,85 y 8,99 (2s, 1H total); 11,0 (s a, 1H). Espectro de masas (EN +) 465 (M+H).

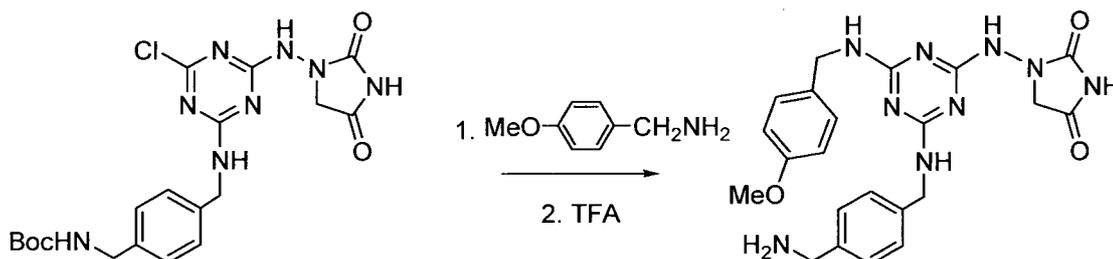
**Ejemplo 1.2 - Método de síntesis para la preparación de 1-[4-(4-aminometil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona, sal de HCl (**compuesto 2**)**

Parte A Preparación de 1-[4-cloro-6-(4-N-Boc-aminometil)-bencilamino]-{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona



A una suspensión agitada de 1-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-il-amino)-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.1, Parte A) (590 mg, 2,24 mmol) y carbonato de potasio (681 mg, 4,94 mmol) en dimetilformamida seca (DMF, 10 ml) se le añadió 4-(N-Boc-aminometil)-bencilamina (582 mg, 2,47 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y después se vertió en una mezcla de agua y acetato de etilo. La emulsión resultante se filtró y después la capa orgánica se separó, se secó y se evaporó para proporcionar el producto en bruto (576 mg, 55 %) en forma de un sólido de color amarillo. Espectro de masas (IEN+): 946 (2M+Na), 924 (2M+H).

Parte B Preparación de 1-[4-(4-aminometil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona, sal de HCl (**compuesto 2**)

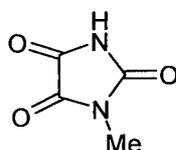


A una suspensión agitada de 1-[4-cloro-6-(4-N-Boc-aminometil)-bencilamino]-{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.2, Parte A) (200 mg, 0,43 mmol) y carbonato de potasio (131 mg, 0,95 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió 4-metoxibencilamina (0,06 ml, 0,48 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 35 ° durante 18 h y después se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. La emulsión resultante se filtró y la capa de acetato de etilo se separó y se evaporó para proporcionar el producto de N-Boc en forma de un residuo oleoso (90 mg, 37 %). Espectro de masas (IEN+): 1127 (2M+H), 564 (M+H). El material de N-Boc (90 mg) se disolvió en diclorometano/ácido trifluoroacético (1:1, 3 ml) y se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 2 h. El disolvente y el exceso de TFA se retiraron a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol (5 ml) y se trató con una solución de cloruro de hidrógeno en éter dietílico (0,08 ml de una solución 2 M). El metanol se retiró a presión reducida y el residuo se recristalizó en metanol/acetonitrilo para proporcionar la sal de clorhidrato en bruto en forma de un sólido de color blanquecino (49 mg, 62 %). RMN <sup>1</sup>H (d<sub>6</sub> DMSO): δ = 3,72 (s, 3H); 3,96-4,12 (m, 6H); 4,32-4,52 (m, 4H); 6,84 (s a, 2H); 7,16-7,51 (m, 6H); 8,4 y 8,5 (d a, 6H); 11,3 (s, 1H). Espectro de masas (EN+): 464 (M+H).

**Ejemplo 1.3 - Métodos de síntesis para la preparación de triazin-imidazolidina-dionas**

Preparación de 5-[4,6-Bis-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-il-amino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 3**)

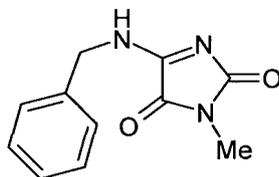
Parte A Preparación de 1-metil-imidazolidina-2,4,5-triona



A una solución enfriada con hielo de 1-metilurea (200 mg, 2,70 mmol) en tetrahidrofurano seco (6 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (0,26 ml, 2,97 mmol) gota a gota, en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a

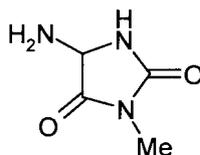
0-5 ° durante 2 h y después se dejó calentar a temperatura ambiente durante 1 h antes de diluirse con agua. El producto se extrajo con acetato de etilo y los extractos se lavaron con agua, se secaron y se evaporaron para proporcionar el producto en forma de un sólido de color blancuzco (326 mg, 94 %), pf 146-149 °C (lit. 145-148 °C).

5 Parte B Preparación de 5-bencilamino-3-metil-imidazol-2,4-diona



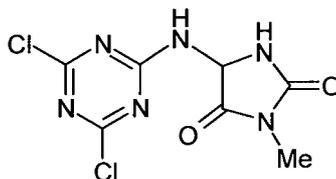
10 A una solución de 1-metil-imidazolidina-2,4,5-triona (Ejemplo 1.3, Parte A) (800 mg, 6,25 mmol), imidazol (467 mg, 6,87 mmol), *N,N*-dimetilaminopiridina (cat.) y trietilamina (1,82 ml, 13,1 mmol) en cloroformo (13 ml) se le añadió clorotrimetilsilano (1,67 ml, 13,1 mmol) gota a gota a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. Se añadió bencilamina (0,75 ml, 6,87 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 22,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo y agua y los extractos de cloroformo se secaron y se evaporaron. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (PS con elución en gradiente a DCM:EtOAc 3:1) para proporcionar el producto en forma de un sólido incoloro (838 mg, 62 %), pf 152-154 °C.  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ) 7,95 (v s a, 1H, NH), 7,41-7,27 (m, 5H, PhH), 4,64 (s, 2H,  $CH_2$ ), 2,95 (s, 3H,  $CH_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  218 (M+H).

20 Parte C Preparación de 5-amino-3-metil-imidazol-2,4-diona



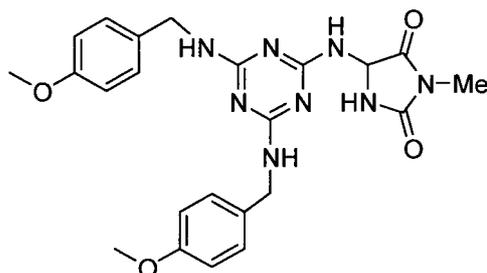
25 A una solución de 5-bencilamino-3-metil-imidazol-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte B) (400 mg, 1,84 mmol) en etanol/acetato de etilo (50 ml, 1:1) se le añadió catalizador de Pd al 10 %/C (195 mg, 0,18 mmol). El matraz se evacuó y se llenó con hidrógeno tres veces y después se agitó a temperatura ambiente durante 23 h. Después de este período, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el filtrado se evaporó para proporcionar el producto en forma de un sólido incoloro (214 mg, 90 %), pf 122-125 °C.  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ) 6,31 (s a, 1H, NH), 4,68 (d,  $J$  1,5 Hz, 1H, CH), 2,87 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $\delta_H$  (300 MHz,  $D_2O$ ) 4,95 (s, 1H, CH), 2,96 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $\delta_C$  (75 MHz,  $D_2O$ ) 175,6, 158,5, 64,0 (CH), 24,3 ( $CH_3$ ).

30 Parte D Preparación de 5-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-ilamino)-3-metil-imidazol-2,4-diona



35 Una suspensión enfriada con hielo de 5-amino-3-metil-imidazol-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte C) (266 mg, 2,06 mmol), cloruro cianúrico (415 mg, 2,27 mmol) y bicarbonato de sodio (191 mg, 2,27 mmol) en acetonitrilo (15 ml) se agitó sobre un baño de hielo en una atmósfera de nitrógeno durante 1 h y después se dejó agitar a temperatura ambiente durante 22 h. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (PS con elución en gradiente de DCM:EtOAc 1:1) para proporcionar el producto en forma de un sólido de color crema (448 mg, 78 %).  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ) 7,50 (s a, 1H, NH), 6,56 (s a, 1H, NH), 5,60 (dd,  $J$  7,8, 1,8 Hz, 1H, CH), 2,97 (s, 3H,  $CH_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  259 [M+H (OH por ion intercambiado de Cl)].

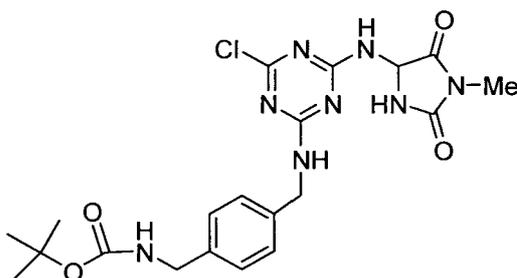
45 Parte E Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazol-2,4-diona (**compuesto 3**)



A una suspensión agitada de 5-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-ilamino)-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte D) (193 mg, 0,70 mmol) y carbonato de potasio (212 mg, 1,53 mmol) en acetonitrilo (15 ml) a 5 ° se le añadió 4-metoxibencilamina (0,10 ml, 0,77 mmol) gota a gota. La suspensión se agitó a temperatura de hielo durante 1 h y después a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió agua a la mezcla de reacción que después se extrajo con acetato de etilo. El producto en bruto se aplicó a una columna de sílice y se eluyó, comenzando con una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (10:1), después, 5:1 y, con el tiempo, diclorometano:metanol (20:1). Las primeras fracciones proporcionaron el intermedio mono-sustituido 5-[4-cloro-6-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (133 mg, 51 %) y las fracciones posteriores proporcionaron el producto de di-bencilamino (112 mg, 34 %) (encontrado: C, 55,46; H, 4,66; N, 18,39 % C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> requiere C, 55,75; H, 4,46; N, 18,58). δ<sub>H</sub> (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN): 7,19 (d a, 4H, Ar), 6,84 (d a, 4H, Ar), 6,35 (s a, 1H, NH), 5,9-5,8 (a, 3H, NH), 5,46 (d a, 1H, CH), 4,36 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,74 (s, 6H, OMe), 2,9-2,8 (a, 3H, NMe). Espectro de masas (IEN) m/z 479 [M+H].

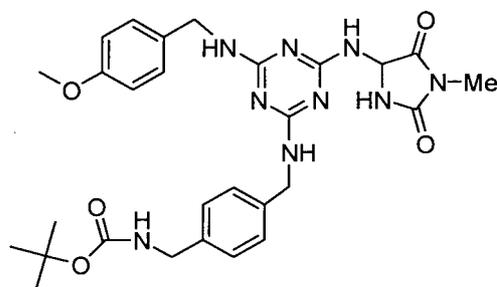
15 **Ejemplo 1.4 - Preparación de 5-[4-(4-aminometil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 4)**

Parte A 5-[4-cloro-6-(N-Boc-(4-aminometil)-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-il-amino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona



A una suspensión agitada de 5-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-ilamino)-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte D) (300 mg, 1,08 mmol) y carbonato de potasio (329 mg, 2,38 mmol) en dimetilformamida (5 ml) a temperatura ambiente se le añadió N-Boc-(4-aminometil)-bencilamina (281 mg, 1,19 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y después se diluyó con agua y acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se separó, se secó y se evaporó para proporcionar el producto en bruto que se usó directamente en la siguiente etapa.

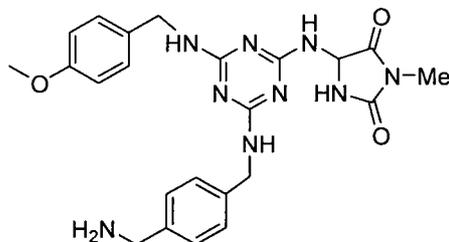
30 Parte B Preparación de 5-[4-((N-Boc-4-aminometil)-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 4 (B))



A una suspensión agitada de 5-[4-cloro-6-(N-Boc-(4-aminometil)-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-il-amino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.4, Parte a) (377 mg, 0,79 mmol) y carbonato de potasio (240 mg, 1,74 mmol) en dimetilformamida (5 ml) a 30 ° se le añadió 4-metoxibencilamina (0,12 ml, 0,95 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 30 ° durante 18 h y después se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con ácido clorhídrico diluido y después separó, se secó y se concentró para proporcionar el producto en bruto que se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando diclorometano como eluyente inicial y aumentando

gradualmente la polaridad a diclorometano:metanol (20:1). El producto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (71 mg, 16 %). Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ): 7,16 (s a, 6H, Ar), 6,82 (d a, 2H, Ar), 6,5 (s a, 1H, NH), 6,1-5,7 (m a, 4H, NH), 5,47 (d a, 1H, CH), 4,5-4,3 (a, 4H,  $CH_2$ ), 4,15 (d, 2H,  $CH_2$ ) 3,73 (s, 3H, OMe), 2,9-2,7 (a, 3H, NMe), 1,39 (s, 9H, Boc).

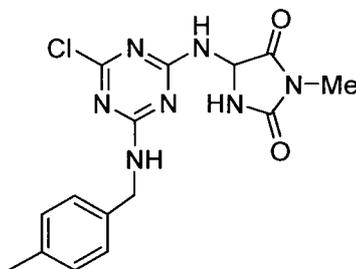
5 Parte C Preparación de 5-[4-(4-aminometil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-diona (**compuesto 4**)



10 Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) a una solución agitada de 5-[4-((N-Boc-4-aminometil)-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.4, Parte B) (63 mg, 0,11 mol) en diclorometano (2 ml) a temperatura ambiente. Después de 3 h el TFA y el disolvente se retiraron por evaporación a presión reducida, se añadió diclorometano adicional y se volvió a retirar para ayudar a expulsar cualquier TFA en exceso restante. El producto en bruto se disolvió en metanol seco y se añadió una solución de cloruro de hidrógeno en éter (2 M, 0,05 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se concentró y el residuo se cristalizó por trituración con metanol/acetonitrilo con enfriamiento con hielo. El sólido de color rosa pálido resultante se recogió por filtración para proporcionar el producto en forma de la sal de HCl (48 mg, 86 %). Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO): 8,9-8,2 (m a, 6H, NH), 7,4-7,1 (m a, 6H, Ar), 6,85 (d, 2H, Ar), 5,6 (a, 1H, CH), 4,5-4,2 (a, 4H,  $CH_2$ ), 3,95 (s a, 2H,  $CH_2$ ) 3,70 (s, 3H, OMe), 2,8-2,6 (a, 3H, NMe); Espectro de masas (IEN)  $m/z$  478 [M+H].

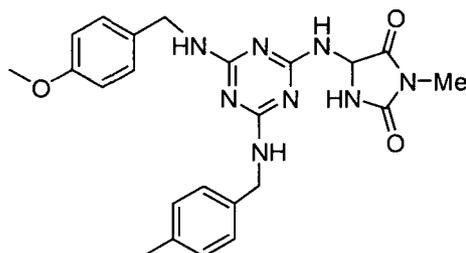
25 **Ejemplo 1.5 - Preparación de 5-[4-(4-metil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-diona (**compuesto 5**)**

Parte A Preparación de 5-[4-cloro-6-(bencilamino-4-metil)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-diona



30 A una suspensión agitada de 5-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-ilamino)-3-metilimidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte D) (200 mg, 0,72 mmol) y carbonato de potasio (219 mg, 1,59 mmol) en dimetilformamida (5 ml) a temperatura ambiente se le añadió 4-metil-bencilamina (0,1 ml, 0,79 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 35 ° durante 24 h y después se diluyó con agua y acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se separó, se secó y se evaporó para proporcionar el producto en bruto que se usó directamente en la siguiente etapa.

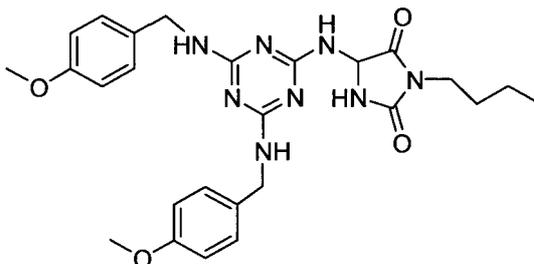
35 Parte B Preparación de 5-[4-(4-metil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-diona (**compuesto 5**)



40 A una suspensión agitada de 5-[4-cloro-6-(bencilamino-4-metil)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metilimidazolidina-2,4-

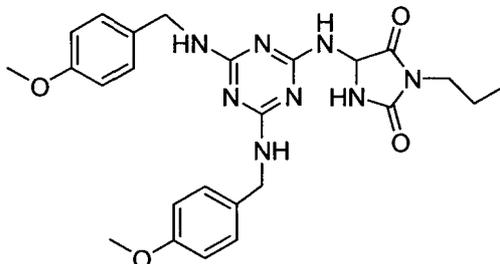
diona (Ejemplo 1.5, Parte A) (80 mg, 0,22 mmol) y carbonato de potasio (67 mg, 0,49 mmol) en dimetilformamida (5 ml) a 35 ° se le añadió 4-metoxibencilamina (0,03 ml, 0,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 35 ° durante 20 h y después se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se secó y se concentró para proporcionar el producto en bruto en forma de una espuma (79 mg, 77 %). Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ): 7,2-7,0 (m a, 7H, Ar + NH), 6,8 (d a, 2H, Ar), 6,5 (a, 1H, NH), 6,1-5,8 (m a, 2H, NH), 5,45 (d a, 1H, CH), 4,5-4,3 (a, 4H,  $CH_2$ ), 4,15 (d, 2H,  $CH_2$ ), 3,74 (s, 3H, OMe), 2,9-2,7 (a, 3H, NMe), 2,3 (s, 3H, Me). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  463 [M+H].

**Ejemplo 1.6 - Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino-3-n-butil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 6)**



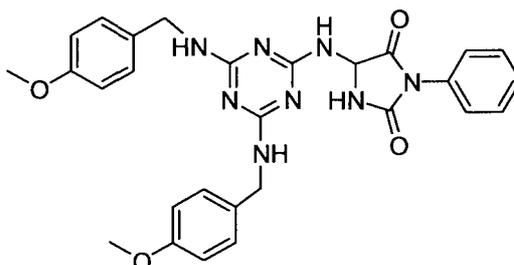
El compuesto del título se preparó utilizando esencialmente la misma secuencia y condiciones de reacción que se describen en el Ejemplo 1.3, Partes B a E, pero utilizando 1-(n-butil)-imidazolidin-2,4,5-triona en lugar de la 1-metil-imidazolidin-2,4,5-triona. El producto de la etapa final se purificó por cromatografía y se caracterizó por espectroscopía de RMN y masas. Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ): 7,19 (d a, 4H, Ar), 6,84 (d a, 4H, Ar), 6,38 (s a, 1H, NH), 6,0-5,7 (a, 3H, NH), 5,5 (d a, 1H, CH), 4,36 (s, 4H,  $CH_2$ ), 3,74 (s, 6H, OMe), 3,38 (t, 2H,  $NCH_2$ ), 1,52 (m, 2H,  $CH_2$ ); 1,28 (m, 2H,  $CH_2$ ); 0,89 (d, 3H, Me). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  521 [M+H].

**Ejemplo 1.7 - Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino-3-n-propil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 7)**



El compuesto del título se preparó utilizando esencialmente la misma secuencia y condiciones de reacción que se describen en el Ejemplo 1.3, Partes B a E, pero utilizando 1-(n-propil)-imidazolidina-2,4,5-triona en lugar de la 1-metil-imidazolidina-2,4,5-triona. El producto de la etapa final se purificó por cromatografía y se caracterizó por espectroscopía de RMN y masas. Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO): 8,31 (s, 1H, NH); 7,5 (a, 1H, NH); 7,1-7,3 (a, 6H, Ar+NH), 6,83 (d a, 4H, Ar), 5,5 (d a, 1H, CH), 4,32 (s, 4H,  $CH_2$ ), 3,78 (s, 6H, OMe), 3,34 (a, 2H,  $NCH_2$ ); 1,46 (m, 2H,  $CH_2$ ); 0,79 (a, 3H, Me). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  507 [M+H].

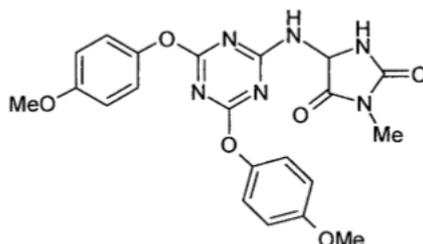
**Ejemplo 1.8 - Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-bencilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-fenil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 8)**



El compuesto del título se preparó utilizando esencialmente la misma secuencia y condiciones de reacción que se describen en el Ejemplo 1.3, Partes B a E, pero utilizando 1-fenil-imidazolidin-2,4,5-triona en lugar de la 1-metil-imidazolidin-2,4,5-triona. El producto de la etapa final se purificó por cromatografía y se caracterizó por

espectroscopía de RMN y masas. Espectro de RMN  $\delta_H$  (300 MHz,  $CD_3CN$ ): 8,07 (s, 1H, NH); 7,4-7,0 (a, 9H, Ar+NH); 6,9-6,6 (a, 5H, Ar+NH), 6,2-5,5 (a, 3H, NH+CH), 5,5 (d a, 1H, CH), 4,38 (s, 4H,  $CH_2$ ), 3,73 (s, 6H, OMe). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  541 [M+H].

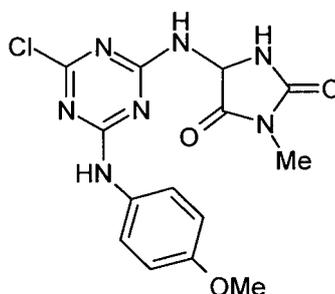
5 **Ejemplo 1.9** - Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-fenoxi)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 9**)



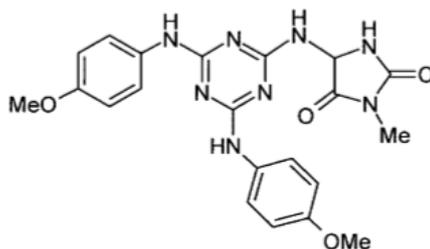
- 10 Una suspensión de 5-amino-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte C) (80 mg, 0,29 mmol), *p*-metoxifenol (39 mg, 0,32 mmol) y carbonato de potasio (88 mg, 0,64 mmol) en acetonitrilo (5 ml) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (sílice; diclorometano:acetato de etilo, con la relación de disolvente aumentando de 10:1 a 1:2) y después se recristalizó en acetonitrilo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido incoloro (17 mg, 13 %). (Encontrado: C, 55,5; H, 4,7; N, 18,4 %  $C_{21}H_{20}N_6O_6$  requiere C, 55,8; H, 4,5; N, 18,6 %).  $\delta_H$  (300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ) 7,81 (d,  $J$  8,1 Hz, 1H, NH), 7,40 (s, 1H, NH), 7,08 (d,  $J$  9,0 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a OPh)), 7,07 (d,  $J$  9,0 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a OPh)), 6,92 (d,  $J$  9,0 Hz, 4H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a OPh)), 5,73 (d,  $J$  8,4 Hz, 1H, CH), 3,81 (s, 6H,  $OCH_3$ ), 2,77 (s, 3H,  $NCH_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  453 (72 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.10** - Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 10**)

- 25 Parte A Preparación de 5-[4-cloro-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona

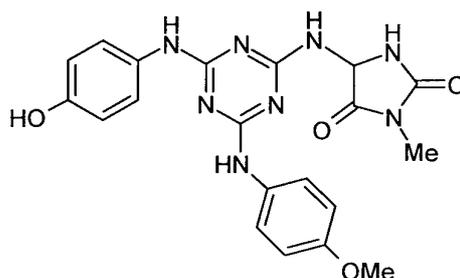


- 30 Una suspensión de 5-amino-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.3, Parte C) (228 mg, 0,82 mmol), *p*-metoxianilina (111 mg, 0,90 mmol) y bicarbonato de sodio (76 mg, 0,90 mmol) en acetonitrilo (7 ml) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 25 h. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (sílice; diclorometano:acetato de etilo comenzando con una relación de disolvente de 10:1 y aumentando la polaridad a diclorometano:metanol, 10:1) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color crema (288 mg, 96 %).  $\delta_H$  (300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ) 8,88 (s a, 0,5H, NH), 8,84 (s a, 0,5H, NH), 7,87 y 7,70 (2 s a, 1H, NH), 7,61 (s a, 1H, NH), 7,51 (d,  $J$  9,0 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a NH)), 6,91 y 6,89 (2 d,  $J$  8,7, 6,6 Hz, 2H ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 5,82 (d a,  $J$  7,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 2,95 (s, 1,4H,  $NCH_3$ ), 2,73 (s, 1,6H,  $NCH_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  364 (100 %,  $MH^+$ ).
- 40 Parte B Preparación de 5-[4,6-bis-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (**Compuesto 10**)



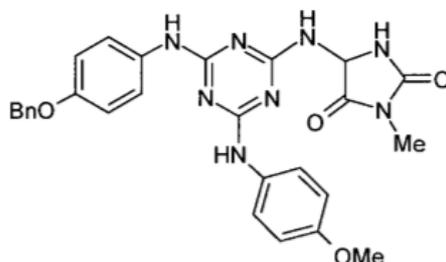
Una suspensión de 5-[4-cloro-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidin-2,4-diona (Ejemplo 1.10, Parte A) (50 mg, 0,14 mmol), *p*-metoxianilina (25 mg, 0,21 mmol) y carbonato de potasio (48 mg, 0,34 mmol) en DMF anhidro (5 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 18,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo, la capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (sílice; diclorometano:acetato de etilo comenzando con una relación de disolvente de 10:1 y aumentando la polaridad a diclorometano:metanol, 10:1) para proporcionar el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido (36 mg, 58 %).  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) 8,14 (s a, 2H, NH), 7,60 (s a, 4H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a NH)), 7,43 (s a, 1H, NH), 6,91 (d, *J* 8,7 Hz, 1H, NH), 6,85 (d, *J* 9,0 Hz, 4H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 5,91 (d, *J* 7,8 Hz, 1H, CH), 3,77 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,86 (s a, 2,0H,  $\text{NCH}_3$ ), 2,73 s a, 1,0 H,  $\text{NCH}_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  451 (37 %,  $\text{MH}^+$ ).

**Ejemplo 1.11 - Preparación de 5-[4-(4-hidroxi-fenilamino)-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 11)**



Una suspensión de 5-[4-cloro-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.10, Parte A) (76 mg, 0,05 mmol), *p*-aminofenol (50 mg, 0,46 mol) y acetato de potasio (25 mg, 0,25 mmol) en DMF anhidra (3 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno sobre un baño de aceite a 35 ° durante 22 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (sílice; diclorometano:acetato de etilo comenzando con una relación de disolvente de 10:1 y aumentando la polaridad a diclorometano:metanol, 10:1) para proporcionar el producto en forma de un sólido de color pardo claro (24 mg, 33 %). (Encontrado: C, 54,1; H, 4,9; N, 24,3 %  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4 \cdot \text{MeOH}$  requiere C, 53,8; H, 5,2; N, 23,9 %).  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) 7,49 (d a, *J* 8,7 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a NH)), 7,37 (s a, 4H, NH y ArH (en *orto* con respecto a la unión a NH)), 6,87 (d, *J* 9,0 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 6,75 (d, *J* 9,0 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 6,70 (s a, 1H, OH), 6,48 (s, 1H, NH), 6,10 (d a, *J* 7,8 Hz, 1H, NH), 5,67 (d, *J* 7,8 Hz, 1H, CH), 3,78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,88 (s a, 3H,  $\text{NCH}_3$ ). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  437 (36 %,  $\text{MH}^+$ ).

**Ejemplo de referencia 1.12 - Preparación de 5-[4-(4-benciloxi-fenilamino)-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]-triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 12)**



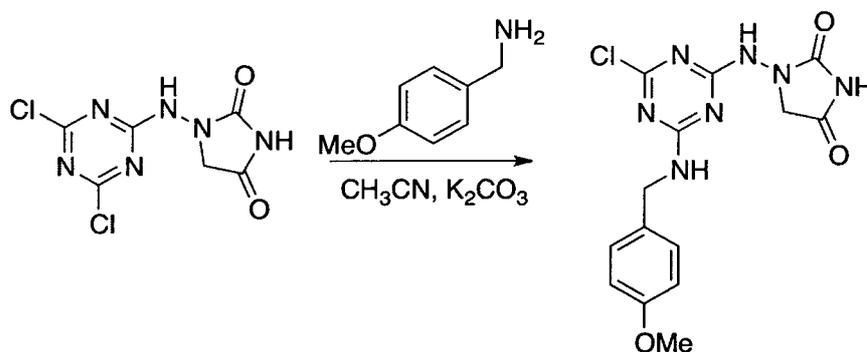
35

Una suspensión de 5-[4-cloro-6-(4-metoxi-fenilamino)-[1,3,5]triazin-2-ilamino]-3-metil-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.10, Parte A) (93 mg, 0,26 mmol), clorhidrato de *p*-benciloxianilina (132 mg, 0,56 mmol) y carbonato de

cesio (184 mg, 0,56 mmol) en DMF anhidra (5 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno sobre un baño de aceite a 30 ° durante 19 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y el producto en bruto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó y se evaporó y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (sílice; diclorometano:acetato de etilo comenzando con una relación de disolvente de 10:1 y aumentando la polaridad a diclorometano:metanol, 20:1). La recristalización en PS/DCM/EtOAc proporcionó el producto en forma de un sólido de color crema (90 mg, 62 %). (Encontrado: C, 61,5; H, 5,1; N, 21,2 % C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub> requiere C, 61,6; H, 5,0; N, 21,3 %).  $\delta_H$  (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) 7,58-7,30 (m, 11H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a NH), PhH y 2 NH), 6,94 (d, *J* 8,7 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 6,87 (d, *J* 8,7 Hz, 2H, ArH (en *orto* con respecto a la unión a O)), 6,49 (s a, 1H, NH), 6,14 (m, 1H, NH), 5,67 (d, *J* 7,2 Hz, 1H, CH), 5,09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2,88 (s a, 3H, NCH<sub>3</sub>). Espectro de masas (IEN) *m/z* 527 (100 %, MH<sup>+</sup>).

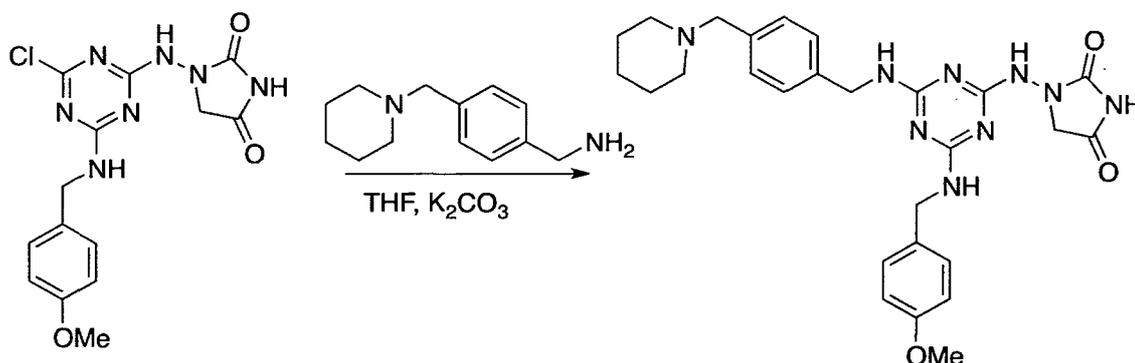
**Ejemplo 1.13 - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(piperidin-1-ilmetil)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 13)**

15 Parte A Preparación de 1-[4-cloro-6-(4-metoxibencil)amino{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona



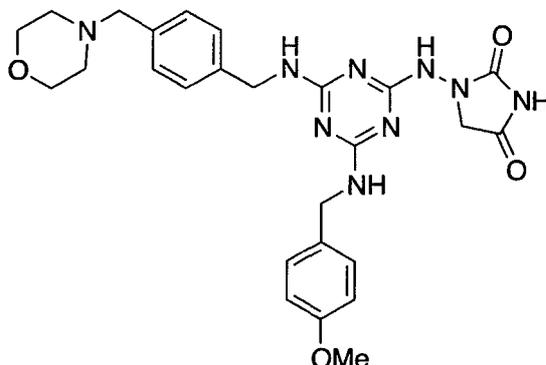
A una mezcla de 1-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-il-amino)-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.1, Parte A) (3,84 g, 14,6 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,4 g, 31,8 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (50 ml) se le añadió (4-metoxifenil)-metanamina (2,0 g, 14,6 mmol) gota a gota a 0 °C. La mezcla se agitó a t.a. durante la noche. El análisis por TLC mostró que la reacción era completa. La mezcla se filtró y la torta se repartió entre agua y EtOAc. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto esperado (3,50 g, rendimiento: 66 %) en forma de un sólido de color blanco. Se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11,30-11,23 (m, 1H), 10,06-9,83 (m, 1H), 8,67-8,60 (m, 1H), 7,24-7,13 (m, 2H), 6,90-6,83 (m, 2H), 4,40-4,35 (m, 2H), 4,26-4,5 (m, 2H), 3,73 (s, 3H). Espectro de masas (IEN) *m/z* 364 (100 %, MH<sup>+</sup>).

30 Parte B Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(piperidin-1-ilmetil)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (compuesto 13)



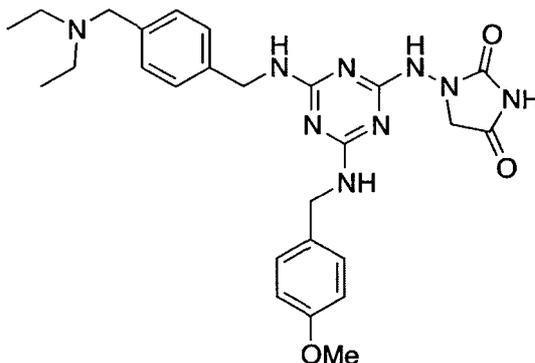
Una mezcla de 1-[4-cloro-6-(4-metoxibencil)amino]-{1,3,5}-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.13, Parte A) (150 mg, 0,41 mmol), 4-piperidinilmetileno-bencilamina (101 mg, 0,49 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (171 mg, 1,24 mmol) en THF (8,0 ml) se calentó a reflujo durante la noche. El análisis por TLC mostró que la reacción era completa. La mezcla se enfrió a t.a. y se vertió en agua, se extrajo con EtOAc de forma repetida. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El residuo sólido se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH = 20:1, v/v) para proporcionar el compuesto 13 (65 mg, rendimiento: 30 %) en forma de un sólido de color blanquecino.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11,13 (a, 1H), 9,03-8,74 (m, 1H), 7,66-6,77 (m, 10H), 3,91 (s, 1H), 3,72-3,45 (m, 4H), 2,38 (s, 2H), 1,53-1,24 (m, 6H). Espectro de masas (IEN) *m/z* 532,3 (100 %, MH<sup>+</sup>).

**Ejemplo 1.14** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(morfolinometil)encil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 14**)



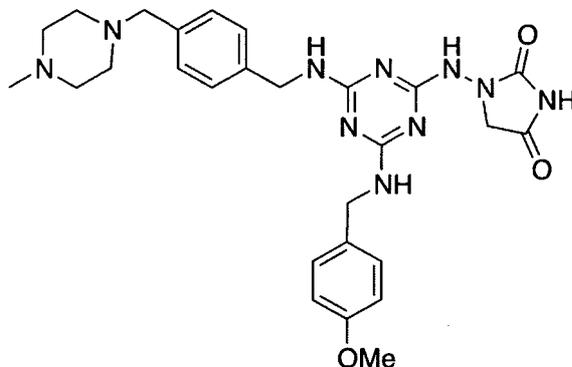
5 El **compuesto 14** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11, 14-11,04 (m, 1H), 7,50-5,50 (m, 10H), 4,41-3,80 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 3,41 (s, 4H), 2,33 (s, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  534,2 (100 %,  $MH^+$ ).

10 **Ejemplo 1.15** - Preparación de 1-((4-((4-((dietilamino)metil)encil)amino)-6-((4-metoxibencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 15**)



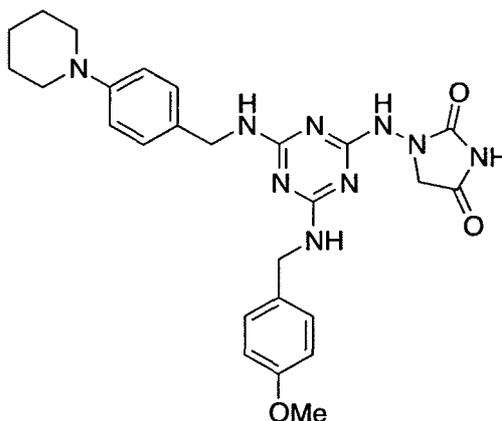
15 El **compuesto 15** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,12-11,04 (m, 1H), 9,02-8,92 (m, 1H), 7,62-6,77 (m, 10H), 4,42-4,23 (m, 4H), 4,09, 3,92 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,53 (s, 2H), 3,55-3,52 (m, 4H), 0,99 (s a, 6 H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  520,3 (100 %,  $MH^+$ ).

20 **Ejemplo 1.16** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-((4-metilpiperazin-1-il)metil)encil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 16**)



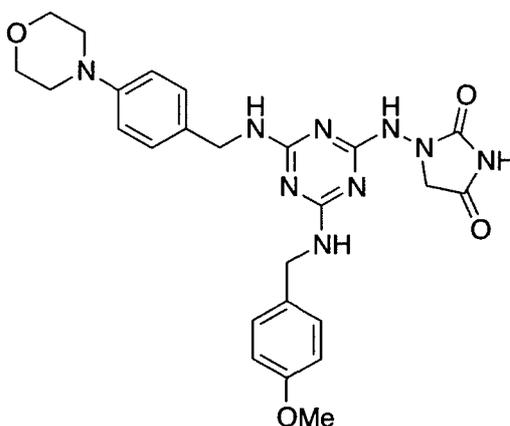
25 El **compuesto 16** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,07 (s a, 1H), 9,04-8,89 (m, 1H), 7,49-6,72 (m, 10H), 4,42-4,21 (m, 4H), 4,09-3,94 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,40 (s, 2H), 2,34 (s a, 8H), 1,92 (s, 3H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  547,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.17** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(piperidin-1-il)encil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 17**)



5 El **compuesto 17** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,14-11,03 (m, 1H), 8,90-8,70 (m, 1H), 7,56-6,84 (m, 10H), 4,35-4,02 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,07 (s, 4H), 1,60-1,51 (m, 6H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  518,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.18** - Preparación de 1-((4-(4-metoxibencil)amino)-6-((bencil)amino-4-morfolino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 18**)

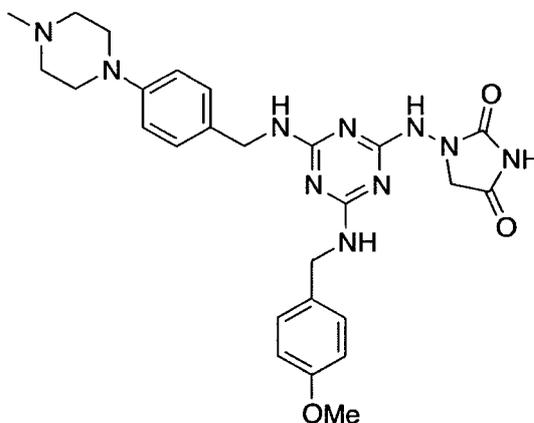


10

El **compuesto 18** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10,94 (s a, 1H), 8,89-8,70 (m, 1H), 7,75-6,77 (m, 10H), 4,34-4,06 (m, 6H), 3,74-3,72 (m, 7H), 3,04 (s, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  520,2 (100 %,  $MH^+$ ).

15

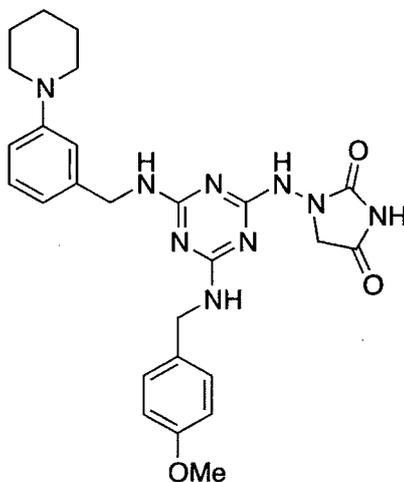
**Ejemplo 1.19** - Preparación de 1-((4-(4-metoxibencil)amino)-6-((4-(4-metilpiperazin-1-il)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 19**)



20

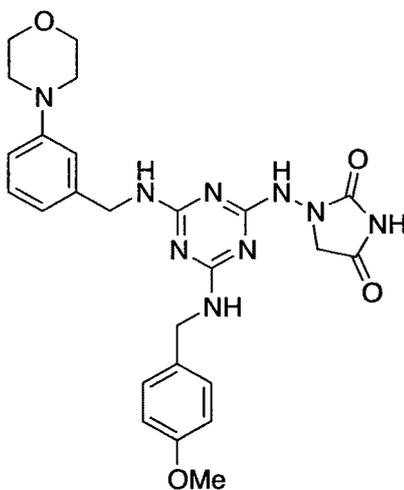
El **compuesto 19** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 8,89-8,70 (m, 1H), 7,40-6,81 (m, 10H), 4,35-4,01 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,39 (s a, 4H), 3,10 (s, 4H), 2,27 (s, 3H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  533,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.20** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((3-(piperidin-1-il)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 20**)



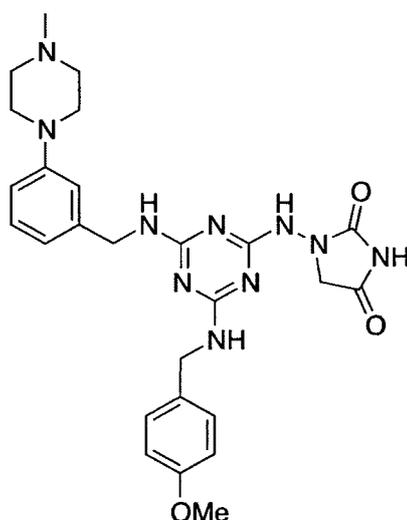
5 El **compuesto 20** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,12-11,04 (m, 1H), 9,03-8,71 (m, 1H), 7,59-6,60 (m, 10H), 4,37-3,98 (m, 6H), 3,71 (s, 3H), 3,09 (s, 4H), 1,59-1,51 (m, 6H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  518,3 (100 %,  $MH^+$ ).

10 **Ejemplo 1.21** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((3-morfolinobencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 21**)



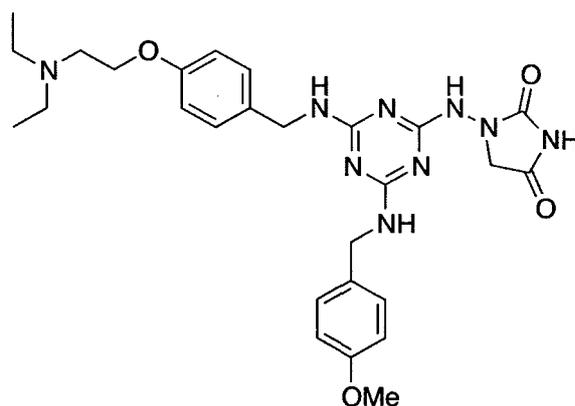
15 El **compuesto 21** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,13-11,03 (m, 1H), 9,04-8,72 (m, 1H), 7,58-6,66 (m, 10H), 4,37-3,98 (m, 6H), 3,72 (s, 7H), 3,07 (s, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  520,2 (100 %,  $MH^+$ ).

20 **Ejemplo 1.22** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((3-(4-metilpiperazin-1-il)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 22**)



5 El **compuesto 22** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,07 (s a, 1H), 9,03-8,71 (m, 1H), 7,56-6,61 (m, 10H), 4,36-3,98 (m, 6H), 3,72 (s a, 7H), 3,12 (s, 4H), 2,27 (s, 3H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  533,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo de Referencia 1.23** - Preparación de 1-((4-((4-(2-(diethylamino)etoxi)encil)amino)-6-((4-metoxibencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 23**)

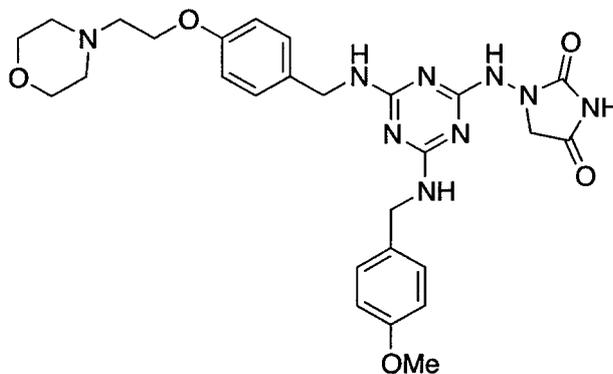


10

El **compuesto 23** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,07 (s a, 1H), 9,03-8,71 (m, 1H), 7,57-6,77 (m, 10H), 4,35-3,98 (m, 8H), 3,72 (s, 3H), 2,81 (s, 2H), 2,60-2,51 (m, 4H), 0,99 (t,  $J = 7,2$  Hz, 6H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  550,3 (100 %,  $MH^+$ ).

15

**Ejemplo de Referencia 1.24** - Preparación de 1-((4-((4-(2-(morfolino)etoxi)encil)amino)-6-((4-metoxibencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 24**)



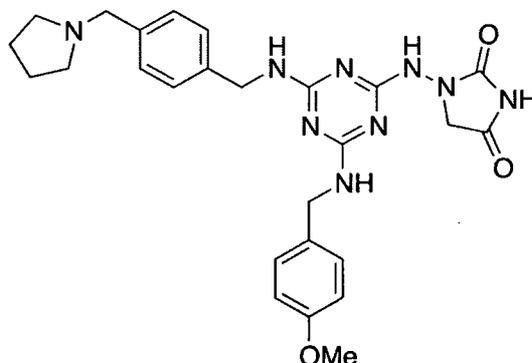
20

El **compuesto 24** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11,16-11,06 (m, 1H), 9,03-8,72 (m, 1H), 7,57-6,81 (m, 10H), 4,35-3,99 (m, 8H), 3,72 (s, 3H),

3,58 (s, 4H), 2,67 (s, 2H), 2,52-2,46 (m, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  564,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.25** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(2-(pirrolidin-1-il)etoxi)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 25**)

5

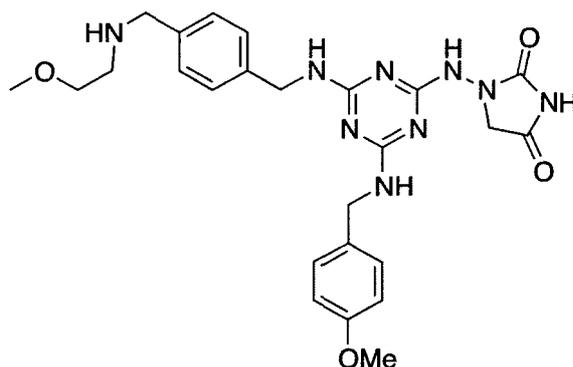


10

El **compuesto 25** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 10,78 (s a, 1H), 9,03-8,73 (m, 1H), 7,65-6,77 (m, 10H), 4,41-3,95 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,60 (s, 2H), 2,55 (s a, 4H), 1,71 (s, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  518,3 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo de Referencia 1.26** - Preparación de 1-((4-((4-metoxibencil)amino)-6-(((2-metoxietil)amino)metil)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 26**)

15

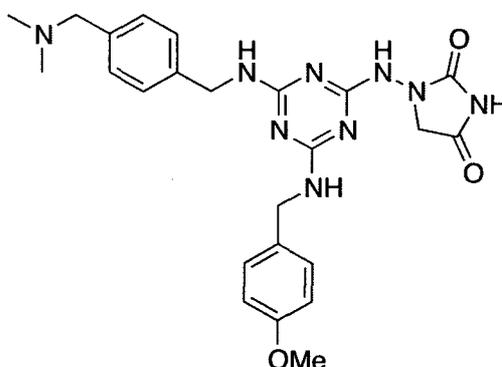


20

El **compuesto 26** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 9,03-8,73 (m, 1H), 7,52-6,77 (m, 10H), 4,40-4,09 (m, 6H), 3,72 (s, 3H), 3,67 (s, 2H), 3,39 (m, 2H), 3,23 (s, 3H), 2,63 (s, 2H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  522,2 (100 %,  $MH^+$ ).

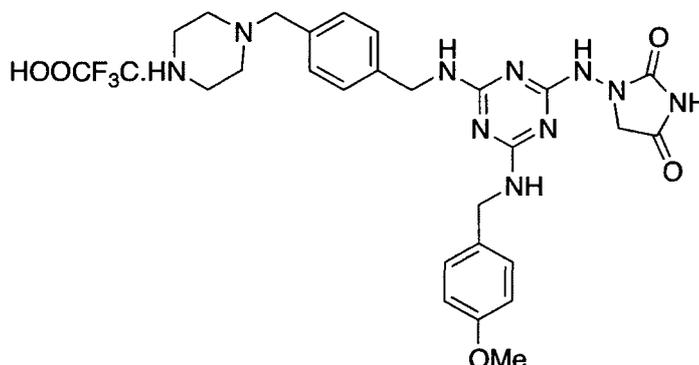
**Ejemplo 1.27** - Preparación de 1-((4-((4-((dimetilamino)metil)bencil)amino)-6-((4-metoxibencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**Compuesto 27**)

25



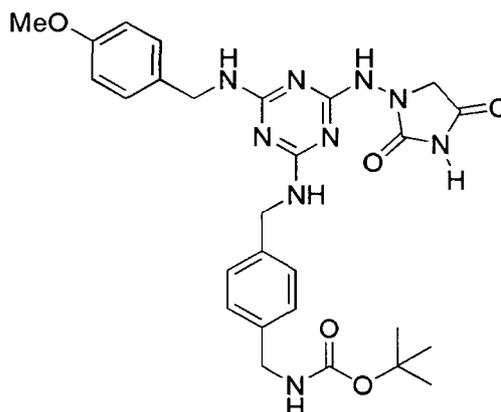
El **compuesto 27** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 11,07 (s a, 1H), 9,04-8,75 (m, 1H), 7,66-6,74 (m, 10H), 4,44-3,91 (m, 6H), 3,72 (s, 5H), 2,34 (s, 6H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  492,2 (100 %,  $MH^+$ ).

**Ejemplo 1.28** - Preparación de 2,2,2-trifluoroacetato de 1-(((4-((4-metoxibencil)amino)-6-((4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-imidazolidina-2,4-diona (**compuesto 28**)



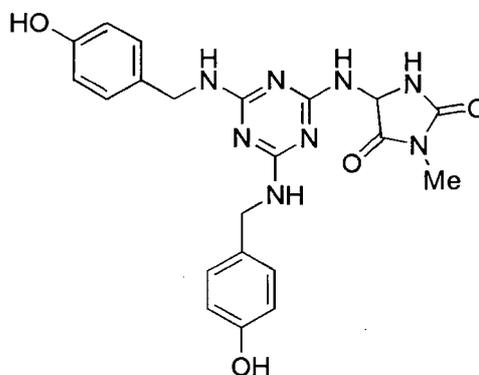
5 El **compuesto 28** se obtuvo por desprotección del correspondiente derivado de 4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)amino protegido con Boc que se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.13, Partes A y B.  $\delta_H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ): 7,42-6,83 (m, 8H), 4,64-4,47 (m, 4H), 4,20-3,93 (m, 4H), 3,79 (s, 3H), 3,34-3,32 (m, 4H), 3,12-3,01 (m, 4H). Espectro de masas (IEN)  $m/z$  533,3 (100 %,  $MH^+$ ).

10 **Ejemplo 1.29** - Preparación 4-(((4-((2,4-dioximidazolidin-1-il)amino)-6-((4-metoxibencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)metil)bencilcarbamato de terc-butilo (**compuesto 29**)



15 El **compuesto 29** se produjo utilizando el procedimiento de síntesis expuesto en el Ejemplo 1.4, partes A y B utilizando 1-(4,6-dicloro-[1,3,5]-triazin-2-il-amino)-imidazolidina-2,4-diona (Ejemplo 1.1, Parte A) como material de partida.

20 **Ejemplo 1.30** - Preparación de 5-((4,6-bis((4-hidroxbencil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)-3-metilimidazolidin-2,4-diona (**compuesto 30**)



25 El **compuesto 30** se produjo adaptando los procedimientos de síntesis descritos anteriormente.

## Ejemplo 2 - Ensayo biológico

**Ejemplo 2.1 - Inhibición de la proliferación y la duración de la inhibición en las estirpes celulares de cáncer**

Se ha demostrado que los compuestos de triazina de la presente invención bloquean el ciclo celular en G2/M. Las triazinas se sometieron a ensayo para determinar su actividad inhibitoria sobre el crecimiento "in vitro" de estirpes celulares tumorales. Para los estudios iniciales se utilizaron dos estirpes celulares de carcinoma de colon (LIM1215 y SW480) y dos estirpes celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7). Se utilizó Taxol como comparador en estos experimentos (Tabla 1).

Todas las triazinas sometidas a ensayo fueron al menos tan eficaces como el Taxol en la inducción del bloqueo de G2/M a las concentraciones óptimas (Tabla 1).

**Tabla 1: Efectos antimetabólicos de las triazinas sobre estirpes celulares de carcinoma.** Los inhibidores se añadieron a las células en crecimiento logarítmico durante un período de 24 horas. La distribución de fases del ciclo celular se controló mediante tinción del ADN y análisis en ModFit. Se utilizó (a) la  $CI_{50}$  para la progresión a través del ciclo celular y (b) la proporción de células en G2/M después de la exposición a Taxol 1  $\mu$ M como patrón; la potencia de la triazina se expresa como la proporción de células en G2M (ensayo)/proporción de células en G2M (Taxol). El número máximo de células en G2/M en estos experimentos fue: LIM1215 = 78,5 %; SW480 = 72 %; MDA-MB-231 = 55 %; MCF-7 = 62 %. NT = no ensayado.

Inhibidor	LIM1215		SW480		MDA-MB-231		MCF-7	
	$CI_{50}^{(a)}$ ( $\mu$ M)	% de Taxol <sup>(b)</sup>						
Taxol	0,01	100	0,008	100	0,008	100	0,008	100
Compuesto 3	3	108	1,45	106	3	93	0,45	102
Compuesto 1	0,07	105	0,05	120	0,013	94	0,009	108
Compuesto 2	NT	NT	0,25	113	0,009	103	0,009	102

**Ejemplo 2.2 - Efectos de las triazinas sobre el crecimiento "in vitro" de células cancerosas**

La inhibición de la proliferación se midió también en un panel de líneas de células tumorales mediante el ensayo de MTT (Protocolo General véase el Ejemplo 2.6). La  $CI_{50}$  determinada mediante este ensayo que mide la proliferación celular se equiparó estrechamente a los valores calculados a partir del análisis FACS del bloqueo de G2/M, indicando que la detención en G2/M en efecto previene la proliferación celular. Los experimentos de reposo farmacológico después de la incubación de las células con el fármaco dieron como resultado la reanudación de la proliferación en estirpes celulares de cáncer de mama y la detención completa en una estirpe celular de carcinoma colorrectal, lo que sugiere que el fármaco es citotóxico en al menos algunas estirpes celulares.

**Ejemplo 2.3.1 - Efectos biológicos de las triazinas sobre el crecimiento de células tumorales.**

El compuesto 2 se sometió a ensayo en una serie de estirpes celulares para determinar su actividad y selectividad (Tabla 2). La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de MTT (para el protocolo véase el Ejemplo 2.6) después de 3 días de incubación con el inhibidor.

**Tabla 2: Inhibición de la proliferación de estirpes celulares tumorales mediante el compuesto 2: (a) estirpe progenitora de células B murinas; (b) carcinoma colorrectal humano; y (c) carcinoma de mama humano.**

Estirpe celular	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
BaF/3 <sup>(a)</sup>	0,03
LIM 1215 <sup>(b)</sup>	0,09
LIM 2537 <sup>(b)</sup>	0,07
LIM 2405 <sup>(b)</sup>	0,03
SW 480 <sup>(b)</sup>	0,03
MDA-MB-231 <sup>(c)</sup>	0,01
MCF-7 <sup>(c)</sup>	0,01

Las  $CI_{50}$  para las diferentes estirpes celulares fueron muy similares, lo que sugiere que el compuesto 2 se dirige a una vía común necesaria para la finalización de G2/M.

**Ejemplo 2.3.2 - Efectos de las triazinas sobre la polimerización de la tubulina, tanto 'in vitro' como 'in vivo'**

Los efectos de las triazinas sobre la polimerización de la tubulina, tanto 'in vitro' como 'in vivo' se sometieron a ensayo. Estos experimentos mostraron que la polimerización de la tubulina inducida por triazina fue mínima y se produjo a dosis muy superiores a la potencia del fármaco como bloqueante mitótico.

Para controlar los efectos de las triazinas sobre la tubulina, los presentes inventores sometieron a ensayo la polimerización de la tubulina en células intactas después de la exposición al fármaco.

Las células tratadas con Taxol o con el compuesto 3 se lisaron en tampón hipotónico que contenía NP-40 al 0,5 % y los extractos celulares se centrifugaron a alta velocidad. La tubulina polimerizada es insoluble en detergente: por tanto después de este tratamiento se recupera tubulina soluble en los sobrenadantes (S) y tubulina polimerizada en los sedimentos celulares (P). La proporción relativa de las dos formas se controló por SDS/PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos específicos para tubulina.

En este ensayo, el Taxol estabilizó fuertemente la tubulina de una manera dependiente de la dosis, mientras que las triazinas mostraron efectos insignificantes incluso a altas concentraciones (Fig. 1).

En un intento de examinar las interacciones directas de las triazinas con la tubulina, se utilizaron ensayos de polimerización de la tubulina 'in vitro' (Fig. 2). En estos ensayos las triazinas provocaron un aumento pequeño pero significativo en la polimerización de la tubulina. Sin embargo, la concentración de triazina requerida para la polimerización de la tubulina era más de 1.000 veces mayor que la  $CI_{50}$  en ensayos de proliferación celular.

#### 15 **Ejemplo 2.3.4 - Aumento progresivo de la dosis en ratones**

El compuesto 1 se sometió a ensayo inicialmente para determinar la tolerabilidad y la toxicidad en ratones. Se inyectaron ratones C57B1/6 (de 8-12 semanas de edad) por vía subcutánea con aumento progresivo de la dosis de Compuesto 1 en un volumen constante de DMSO. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección. No hubo efectos adversos de dosis de hasta 80 mg/kg dentro de este marco temporal. Por tanto, el compuesto se tolera bien en dosis que exceden con mucho la  $CI_{50}$  observada "in vitro".

El Compuesto 2 no mostró efectos adversos en la salud o el comportamiento externos de dosis de hasta 64,5 mg/kg durante 4 días. A 21,5 y 64,5 mg/kg hubo indicios de adelgazamiento de la piel en el sitio de inyección en algunos ratones. En ratones BALB/c desnudos el Compuesto 2 provocó algunas lesiones cutáneas a 20 mg/kg. Estas lesiones cutáneas menores se cicatrizaron fácilmente a los 2-3 días.

#### **Ejemplo 2.4 - Farmacocinética**

Los parámetros farmacocinéticos para el Compuesto 2 se determinaron después de la inyección en ratones.

Cuando se administra a una dosis de 50 mg/kg en solución acuosa, el fármaco alcanza concentraciones meseta en el torrente sanguíneo de 60  $\mu$ M y se mantiene en niveles de hasta 6  $\mu$ M durante 6-10 horas. La vida media de eliminación es de aproximadamente 1,5 horas. También se han detectado al menos dos metabolitos activos, que inducen el bloqueo del ciclo celular G2/M 'in vitro', en el plasma y sus estructuras se confirmaron por espectrometría de masas. Cuando los metabolitos activos se incluyen en los cálculos farmacocinéticos, la concentración total del fármaco activo es, en promedio, de 30  $\mu$ M durante hasta 6 horas antes de que comience a eliminarse del plasma.

#### 40 **Ejemplo 2.4.1 - Extracción y cuantificación de triazinas a partir de sangre de ratón**

El protocolo desarrollado para la extracción de triazinas activas a partir de plasma de ratón y la cuantificación por RP-HPLC del fármaco extraído, así como la caracterización de los metabolitos y las propiedades farmacocinéticas de los compuestos, se describen a continuación.

#### 45 **Ejemplo 2.4.1.1 - Extracción de triazinas a partir de plasma de ratón.**

Se recogió sangre de ratón mediante punción cardíaca después de la anestesia por gas de  $CO_2$ . Los ratones posteriormente se sacrificaron. La sangre se transfirió a un tubo con EDTA para prevenir la coagulación y el plasma se recogió después de la separación por centrifugación. Para cada muestra se añadieron 25  $\mu$ l de plasma a 75  $\mu$ l de TFA frío al 0,1 % (v/v) con hidrocortisona (HC) 5  $\mu$ M como patrón interno. Estas muestras procesadas se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Tras la descongelación se aclararon por centrifugación y los extractos se analizaron en RP-HPLC.

#### 55 **Ejemplo 2.4.1.2 - Cuantificación de triazinas en plasma de ratón.**

Cada extracto de plasma de 100  $\mu$ l se separó en una columna Zorbax SB-C18, 2,1 x 150 mm, de 5  $\mu$  utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo de 50 min en TFA al 0,1 % (v/v) a un caudal de 0,1 ml por minuto y a una temperatura de columna de 45 °C. La detección se realizó a 250 nm. Se muestran cromatogramas representativos en la Fig. 3.

#### 60 **Ejemplo 2.4.1.3 - Análisis de metabolitos del Compuesto 2**

Los cromatogramas de plasma de ratones inyectados con Compuesto 2, pero no de ratones control, contenían picos menores. Estos picos aparecieron en un momento posterior después de la inyección del compuesto 2 y son presumiblemente metabolitos. Con el fin de confirmar la identidad de estos picos, sus espectros de absorción se compararon con el del patrón del compuesto 2.

Como puede verse en la Figura 4, todos los picos tenían la absorbancia a 250 nm característica y parecen ser compuestos relacionados. El plasma de ratón se fraccionó en RP-HPLC y los picos indicados anteriormente se recogieron. Las muestras de pico agrupadas se concentraron por liofilización. Una porción de cada muestra de pico se reconstituyó en medios de cultivo para bioensayo (Fig. 5). El resto se analizó por CL-EM para confirmar la masa e identificar las estructuras.

La  $CI_{50}$  para el compuesto recuperado 2 (Pico 1), Pico 2 y Pico 3 fue de 0,1  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M y >1  $\mu$ M, respectivamente. Aunque es difícil de cuantificar con exactitud la concentración de los picos recuperados debido a las cantidades muy pequeñas, el ensayo no indicó que todos los picos recuperados tuvieran alguna actividad biológica.

Los resultados del análisis por CL-EM de los compuestos recuperados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3** Resultados del análisis por CL-EM de los metabolitos recuperados de plasma de ratón después de la inyección del compuesto 2.

Muestra	Masa (Da)
Compuesto 2	464,2 (M+1)
Pico 1	464,1 (M+1)
Pico 2	655,0 (M+1)
Pico 3	479,1 (M+1)

El análisis del material de partida Compuesto 2 confirmó el peso molecular del compuesto base libre que era de 464 Da. El Pico 1 tenía la misma masa, lo que confirmó que es el mismo compuesto recuperado del plasma. El Pico 3 tenía una masa de 479 Da lo que indica un derivado de hidroxilo. El Pico 2 era un compuesto mucho más grande con una masa de 655 Da. La masa adicional indica que es un derivado de glucurónido del derivado de hidroxilo.

Estos resultados confirman que los compuestos recuperados son metabolitos activos del compuesto 2 y deberían incluirse en los cálculos de niveles activos de fármaco en plasma y de semivida de eliminación del compuesto.

#### **Ejemplo 2.4.1.4 - Análisis farmacocinético del compuesto 2**

La concentración de fármaco en plasma se determinó por el método de calibración del patrón interno mediante la comparación de las relaciones de fármaco a áreas de los picos de HC con respecto a los patrones conocidos. Las concentraciones plasmáticas de compuesto 2 en los ratones de un experimento farmacocinético se representan en la Fig. 6

Estos resultados indican que pueden conseguirse concentraciones terapéuticamente significativas de compuesto 2 en el suero y mantenerse durante hasta 10 h.

#### **Ejemplo 2.5 - Eficacia como fármaco antitumoral en experimentos de xenoinjerto**

Se han utilizado experimentos de xenoinjerto para determinar la eficacia del compuesto 2 en la reducción del crecimiento tumoral. En los experimentos iniciales, utilizando el modelo de tumor establecido con la estirpe celular de carcinoma colorrectal LIM 2537, el compuesto 2 ha reducido significativamente la tasa de crecimiento de los tumores.

##### **Ejemplo 2.5.1 - Estudios de xenoinjertos de tumores con células LIM 2537 (estirpe celular de carcinoma de colon).**

###### **Método:**

Se eligió la estirpe celular de carcinoma de colon LIM 2537 para estudios de xenoinjerto de tumores en ratones BALB/c desnudos, ya que se demostró que su crecimiento es inhibido por el compuesto 2 (véase "Efectos biológicos de las triazinas en el crecimiento de células tumorales").

Los ratones se inocularon con  $3 \times 10^6$  células por tumor en 100  $\mu$ l de PBS, un tumor en cada flanco por vía subcutánea (SC). Los tratamientos se iniciaron el tercer día después de la inoculación, ya sea con el control de vehículo (CV) o 100  $\mu$ l de fármaco a 3 mg/ml en solución acuosa proporcionando una dosis de 15 mg/kg. Los ratones fueron inyectados por vía SC en el abdomen, tres veces por semana durante la duración del experimento. Los ratones se controlaron para determinar el peso corporal, el volumen tumoral y el aspecto y para detectar cualquier reacción adversa al fármaco. El experimento terminó después de 33 días y el grupo de control se sacrificó, ya que la carga tumoral en ese grupo había alcanzado el máximo permitido. Los ratones restantes se dejaron sin tratamiento durante 9 días adicionales para controlar la reanudación del crecimiento tumoral.

###### **Resultados:**

Los pesos corporales del ratón no se vieron afectados por el tratamiento con fármacos. Las diferencias en el tamaño

tumoral entre los grupos de control y los de fármaco fueron evidentes después de 12 días y, hacia el día 33, cuando se sacrificó el grupo de control, esta diferencia era clara. Dentro de los grupos, hubo un tumor de crecimiento lento en los controles y un tumor de crecimiento rápido en la cohorte tratada. Estos tumores anómalos son responsables de las grandes desviaciones típicas (Fig. 7).

5 A partir de este experimento puede concluirse que la pauta de tratamiento (3 inyecciones por semana de compuesto 2 a una dosis de 15 mg/kg) fue satisfactorio en la ralentización del crecimiento de las células LIM 2537. No hubo reacción adversa al fármaco a largo plazo con esta dosis y formulación.

10 **Ejemplo 2.5.2** - Estudios de xenoinjertos de tumores con U87MG( $\Delta$ 2-7) - (estirpe celular de cáncer de cerebro).

**Método:**

15 Ratones: Balb/c nu/nu macho; 8 controles y 8 tratadas.

Células inoculadas: U87MG( $\Delta$ 2-7) en  $2,13 \times 10^6$  células/tumor; dos tumores por ratón.

20 Dosis: Compuesto 2 a 20 mg/kg = 100  $\mu$ l de 4 mg/ml en agua para inyección por ratón de 20 g. Los ratones de control fueron inyectados con 100  $\mu$ l de agua para inyección.

20 Tratamiento y control: El tratamiento comenzó el día 5 después de la inoculación. Los ratones fueron inyectados en el abdomen por vía SC tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes), en lados alternos. Los ratones se pesaron, se midieron los diámetros de los tumores en dos dimensiones y la salud de los ratones se controló.

25 Después de que se sacrificaran los ratones: los tumores se disecaron y se pesaron; también se pesaron los bazo e hígados.

**Resultados:**

30 Los tumores crecieron rápida y uniformemente entre los animales. El experimento terminó a los 14 días después de la inoculación porque la mayoría de los ratones de control habían alcanzado la máxima carga tumoral y algunos tumores comenzaban a ulcerarse. Al final del experimento había una diferencia significativa en volumen entre el los tumores de control y los tratados (Figura 8).

35 Los hígados y bazo también se pesaron post mortem. En la Figura 9 se comparan los pesos medios de estos órganos, junto con los pesos medios de los tumores.

El tratamiento de tumores de U87MG( $\Delta$ 2-7) con compuesto 2 a 20 mg/kg tres veces por semana ha reducido el crecimiento de los tumores en comparación con tumores en ratones inyectados con control de vehículo.

40 **Ejemplo 2.5.3** - Estudios de xenoinjertos de tumores con H1437 (estirpe celular de cáncer de pulmón no microcítico).

**Método:**

45 Ratones: Balb/c nu/nu macho; 8 controles y 8 tratados; 5 semanas de edad.

Células inoculadas: H1437 (estirpe celular de cáncer de pulmón no microcítico) a  $2 \times 10^6$  células/tumorales; dos tumores por ratón.

50 Dosis: Compuesto 2 a 20 mg/kg = 100  $\mu$ l de 4 mg/ml en agua para inyección por ratón de 20 g. Los ratones de control fueron inyectados con 100  $\mu$ l de agua para inyección.

55 Tratamiento y seguimiento: El tratamiento comenzó el día 5 después de la inoculación. Los ratones fueron inyectados en el abdomen por vía SC tres veces por semana, en lados alternos. Los ratones se pesaron; se midieron los diámetros de los tumores en dos dimensiones y la salud de los ratones se controló. Las inyecciones corresponden a puntos de datos en las representaciones, con un tratamiento adicional el Día 14 cuando no se hicieron mediciones.

60 **Resultados:**

65 Los tumores en el grupo de control crecieron rápidamente, pero con alguna variación entre los animales. El volumen medido de los tumores se estabilizó después de 21 días y la tasa de crecimiento no aumentó como lo había hecho con estirpes celulares de los experimentos anteriores. Estos tumores generalmente crecieron como bolas redondas en lugar de dispersarse a lo largo del flanco del animal. El experimento terminó a los 26 días después de la inoculación porque la mayoría de los ratones de control habían alcanzado la carga tumoral máxima. No hubo

ulceración de los tumores, que se mantuvieron bajo la piel, y no parecían estar particularmente vascularizados. Por el contrario, los tumores en el grupo tratado se mantuvieron muy pequeños y duros a lo largo de los 26 días. Al final del experimento había una diferencia significativa en volumen entre los tumores de control y los tratados (Figura 10).

- 5 Después de que se sacrificaran los ratones los tumores se disecaron y se pesaron. Después de la disección se compararon los tumores de los dos grupos. Hay una notable diferencia en el tamaño observado de los tumores entre los dos grupos (Figura 11).

10 Se apreciará por expertos en la materia que pueden hacerse numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del alcance de la invención como se describe ampliamente. Las presentes realizaciones, por tanto, han de considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

### 15 **Ejemplo 2.6**

#### **Protocolo para el ensayo de MTT y MTS para todas las células y los inhibidores**

##### **Ejemplo 2.6.1 - Resumen General**

- 20
- Sembrar células a 10<sup>4</sup>/pocillo en 100 µl de medio + FCS al 5 % (+ Aditivos <sup>1</sup>):
  - Incubar las células durante la noche:
  - Valorar los inhibidores en una placa nueva en 150 µl de medio
  - Transferir 100 µl de los compuestos valorados a pocillos emparejados de la placa de células.
  - Incubar 4 días adicionales:
- 25
- Añadir 10 µl de MTS<sup>2</sup> o MTT<sup>3</sup> durante 1,5 a 2 horas y leer en Multiscanner (longitudes de onda 492/690)

<sup>1</sup> Aditivos para el cultivo de estirpes celulares LIM: tioglicerol 10 µM, insulina 0,025 U/ml, hidrocortisona 1 µg/ml. <sup>2</sup> 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. <sup>3</sup> bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

30

##### **Ejemplo 2.6.2 - Estirpes celulares utilizadas en el ensayo de MTS**

- Estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537, cultivada en RPMI + Aditivos <sup>1</sup> + FCS al 5 %

##### **Ejemplo 2.6.3 – Siembra en placas de células: Una estirpe celular por placa**

Se tripsinizan las células y se lavan 2 veces en medio + FCS al 5 % y se depositan a 10<sup>4</sup> células por pocillo en 100 µl.

- 40 Incubar las placas a 37 °C + incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %-10 %.

##### **Ejemplo 2.6.4 - Inhibidores**

45 Los inhibidores se disuelven en DMSO para hacer soluciones madre 10 mM y se valoran en una placa de 96 pocillos por duplicado para utilizarse como la solución madre para la placa de ensayo. Intervalo de valoración de 40 µM hasta 0,01 µM en diluciones a la mitad y se transfieren 100 µl de cada dilución a los pocillos apropiados de la placa de ensayo que contiene las células (también en 100 µl) dando como resultado que la concentración final de los inhibidores sea de 20 µM hasta 0,01 µM a lo largo de las filas por duplicado. Se someten a ensayo tres inhibidores por placa (Filas A-F).

50

Cada placa tiene lo siguiente:

Filas A, B: diluciones de Inhibidor 1, 200 µl por pocillo

Filas C, D: diluciones de Inhibidor 2, 200 µl por pocillo

55 Filas E, F: diluciones de Inhibidor 3, 200 µl por pocillo

Fila de control G1-6: Medio + FCS al 5 % (para el crecimiento máximo)

Fila de control G7-12: Taxol (250 nM para la inhibición máxima)

Fila de control H: Retirar el medio de las células y reemplazar por 200 µl de medio sin suero para la tasa de crecimiento sin suero.

60

##### **Ejemplo 2.6.5 - Incubación**

Incubar las placas durante 4 días en incubadora. Procesar con MTS o MTT como se esboza a continuación.

65

**Ejemplo 2.6.6 – Ensayo de MTS**

Añadir a cada pocillo 10 µl de solución de MTS (Sigma). Incubar el MTS durante 1,5 a 2 horas y el MTT durante 4 horas. Detener la reacción mediante la adición de 10 µl de SDS al 10 % a cada pocillo. Leer en lector de placas Multiscan (492/690), representar el cambio de color frente a la concentración de inhibidor para establecer la CI<sub>50</sub>.

**Ejemplo 2.6.7 – Ensayo de MTT**

**Solución de MTT**

Se disolvieron 5 g de MTT (Sigma M-2128) en PBS, a 5 mg/ml, se estabilizó por filtración y se almacenó a -20 °C. Descongelar cuando sea necesario.

**Disolvente de MTT (isopropanol acidificado)**

a. HCl 1 M:

Mezclar 44,6 ml de HCl concentrado (11,2 M) en 500 ml de DDW

b. Isopropanol acidificado (isopropanol con HCl 0,04 N):

Mezclar 20 ml de HCl 1 M con 480 ml de isopropanol (Propan-2-ol, alcohol iso-propílico)

**Adición de MTT**

Añadir 10 µl de solución de MTT a cada pocillo e incubar durante 4 horas en incubadora a 37 °C.

Centrifugar las placas, 5 min a 1500 rpm y retirar el medio sacudiendo cuidadosamente, sin alterar los cristales resultantes. Añadir 200 µl de isopropanol acidificado (Disolvente de MTT) por pocillo.

Colocar en agitador de placas, TA, velocidad de 6,5, durante 10 min-30 min.

Leer la DO de las placas en Thermo Multiskan Ex, a 560/690 nm.

**Ejemplo 2.6.8 - Resultados de Ensayo de MTS sobre compuestos seleccionados de la presente invención utilizando estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537**

**Tabla 4** Resultados de Ensayo de MTS sobre compuestos seleccionados de la presente invención utilizando estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537

Número de compuesto	Intervalo de CI <sub>50</sub> (µM)
13	> 0,1-1
14	> 10
15	1-10
16	≤ 0,1
17	≤ 0,1
18	> 0,1-1
19	> 0,1-1
20	> 0,1-1
21	1-10
22	> 10
23	1-10
24	> 0,1-1

**Ejemplo 2.6**

**Protocolo para el ensayo de MTT y MTS para todas las células y los inhibidores**

**Ejemplo 2.6.1 - Resumen General**

- Sembrar células a 104/pocillo en 100 µl de medio + FCS al 5 % (+ Aditivos <sup>1</sup>):
- Incubar las células durante la noche:
- Valorar los inhibidores en una placa nueva en 150 µl de medio
- Transferir 100 µl de los compuestos valorados a pocillos emparejados de la placa de células.
- Incubar 4 días adicionales:

- Añadir 10 µl de MTS<sup>2</sup> o MTT<sup>3</sup> durante 1,5 a 2 horas y leer en Multiscanner (longitudes de onda 492/690)

<sup>1</sup> Aditivos para el cultivo de estirpes celulares LIM: tioglicerol 10 µM, insulina 0,025 U/ml, hidrocortisona 1 µg/ml. <sup>2</sup> 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. <sup>3</sup> bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

#### **Ejemplo 2.6.2 - Estirpes celulares utilizadas en el ensayo de MTS**

- Estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537, cultivada en RPMI + Aditivos <sup>1</sup> + FCS al 5 %

#### **Ejemplo 2.6.3 – Siembra en placas de células: Una estirpe celular por placa**

Se tripsinizan las células y se lavan 2 veces en medio + FCS al 5 % y se depositan a 10<sup>4</sup> células por pocillo en 100 µl.

Incubar las placas a 37 °C + incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %-10 %.

#### **Ejemplo 2.6.4 - Inhibidores**

Los inhibidores se disuelven en DMSO para hacer soluciones madre 10 mM y se valoran en una placa de 96 pocillos por duplicado para utilizarse como la solución madre para la placa de ensayo. Intervalo de valoración de 40 µM hasta 0,01 µM en diluciones a la mitad y se transfieren 100 µl de cada dilución a los pocillos apropiados de la placa de ensayo que contiene las células (también en 100 µl) dando como resultado que la concentración final de los inhibidores sea de 20 µM hasta 0,01 µM a lo largo de las filas por duplicado. Se someten a ensayo tres inhibidores por placa (Filas A-F).

Cada placa tiene lo siguiente:

Filas A, B: diluciones de Inhibidor 1, 200 µl por pocillo

Filas C, D: diluciones de Inhibidor 2, 200 µl por pocillo

Filas E, F: diluciones de Inhibidor 3, 200 µl por pocillo

Fila de control G1-6: Medio + FCS al 5 % (para el crecimiento máximo)

Fila de control G7-12: Taxol (250 nM para la inhibición máxima)

Fila de control H: Retirar el medio de las células y reemplazar por 200 µl de medio sin suero para la tasa de crecimiento sin suero.

#### **Ejemplo 2.6.5 - Incubación**

Incubar las placas durante 4 días en incubadora. Procesar con MTS o MTT como se esboza a continuación.

#### **Ejemplo 2.6.6 – Ensayo de MTS**

Añadir a cada pocillo 10 µl de solución de MTS (Sigma). Incubar el MTS durante 1,5 a 2 horas y el MTT durante 4 horas. Detener la reacción mediante la adición de 10 µl de SDS al 10 % a cada pocillo. Leer en lector de placas Multiscan (492/690), representar el cambio de color frente a la concentración de inhibidor para establecer la CI<sub>50</sub>.

#### **Ejemplo 2.6.7 – Ensayo de MTT**

##### **Solución de MTT**

Se disolvieron 5 g de MTT (Sigma M-2128) en PBS, a 5 mg/ml, se estabilizó por filtración y se almacenó a -20 °C. Descongelar cuando sea necesario.

##### **Disolvente de MTT (isopropanol acidificado)**

a. HCl 1 M:

Mezclar 44,6 ml de HCl concentrado (11,2 M) en 500 ml de DDW

b. Isopropanol acidificado (isopropanol con HCl 0,04 N):

Mezclar 20 ml de HCl 1 M con 480 ml de isopropanol (Propan-2-ol, alcohol iso-propílico)

##### **Adición de MTT**

Añadir 10 µl de solución de MTT a cada pocillo e incubar durante 4 horas en incubadora a 37 °C.

Centrifugar las placas, 5 min a 1500 rpm y retirar el medio sacudiendo cuidadosamente, sin alterar los cristales resultantes. Añadir 200 µl de isopropanol acidificado (Disolvente de MTT) por pocillo.

Colocar en agitador de placas, TA, velocidad de 6,5, durante 10 min-30 min.

Leer la DO de las placas en Thermo Multiskan Ex, a 560/690 nm.

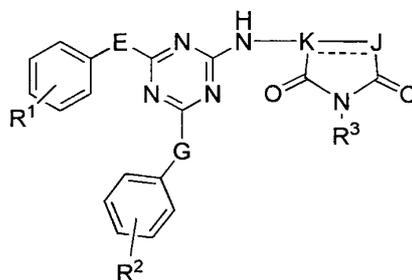
**Ejemplo 2.6.8** - Resultados de Ensayo de MTS sobre compuestos seleccionados de la presente invención utilizando estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537

**Tabla 4** Resultados de Ensayo de MTS sobre compuestos seleccionados de la presente invención utilizando estirpe celular de carcinoma de colon humano LIM2537

Número de compuesto	Intervalo de CI <sub>50</sub> (µM)
13	> 0,1-1
14	> 10
15	1-10
16	≤ 0,1
17	≤ 0,1
18	> 0,1-1
19	> 0,1-1
20	> 0,1-1
21	1-10
22	> 10
23	1-10
24	> 0,1-1

En las siguientes cláusulas se describen realizaciones preferidas de la invención:

1. Un compuesto de Fórmula I, o un derivado aceptable farmacéutico, sal o profármaco del mismo, en la que:



**Fórmula I**

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-4</sub>, -NH-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

— es un enlace sencillo o doble;

cuando — es un enlace sencillo, K se selecciona independientemente entre CH y N, y J se selecciona independientemente entre NH y CH<sub>2</sub>; o

cuando — es un doble enlace, K es C y J se selecciona independientemente entre N y CH;

R<sup>1</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -O-alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -cicloalquil C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -O-fenilo-, -O-bencilo-, -NO<sub>2</sub> halógeno y CF<sub>3</sub>;

cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>5</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser OH; o

-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>;

R<sup>2</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, -OH, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -O-alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -cicloalquil C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -O-fenilo, -O-bencilo, -NO<sub>2</sub> halógeno y CF<sub>3</sub>;

5 cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>8</sup>, a condición de que si un R<sup>6</sup> es OH entonces el otro R<sup>6</sup> no puede ser OH; o

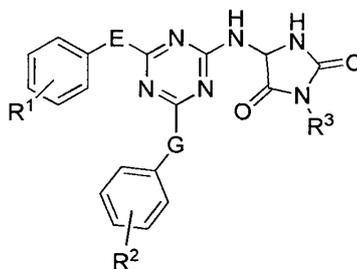
10 -N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>;

en el que cada uno de R<sup>5</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y fenilo;

15 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, -alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo y alquilarilo; y

en el que R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C<sub>1-4</sub>.

20 2. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 1 de Fórmula II o un derivado farmacéutico, sal o profármaco del mismo, en la que:



**Fórmula II**

25 E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-4</sub>, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

30 R<sup>1</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, -OH, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>, N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, -O-alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, -cicloalquil C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, -O-fenilo, -O-bencilo, -NO<sub>2</sub> halógeno y CF<sub>3</sub>;

35 cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>5</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser OH; o

-N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>;

40 R<sup>2</sup> es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>, -cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, -OH, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -O-alquil C<sub>1-4</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -cicloalquil C<sub>3-6</sub>-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, -O-fenilo, -O-bencilo, -NO<sub>2</sub> halógeno y CF<sub>3</sub>;

45 cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -alquil C<sub>1-4</sub>-OR<sup>7</sup> y -C(O)R<sup>8</sup>, a condición de que si un R<sup>6</sup> es OH entonces el otro R<sup>6</sup> no puede ser OH; o

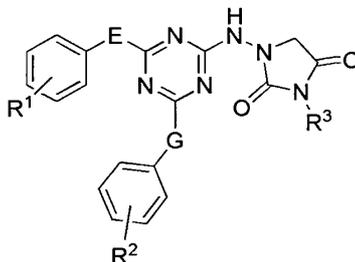
-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>;

50 en el que cada uno de R<sup>5</sup> y R<sup>8</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y fenilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-4</sub> y arilo; y

en el que  $R^7$  se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo  $C_{1-4}$ .

3. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 1 de Fórmula III o un derivado farmacéutico, sal o profármaco del mismo, en la que:



**Fórmula III**

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $C_{1-4}$ , -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo  $C_{1-4}$  y -O-alquilo  $C_{1-4}$ ; y

$R^1$  es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo  $C_{1-4}$ , -cicloalquilo  $C_{3-6}$ , -OH, -O-alquilo  $C_{1-4}$ , - $N(R^4)_2$ , -alquil  $C_{1-4}N(R^4)_2$ , -O-alquil  $C_{1-4}N(R^4)_2$ , -cicloalquil  $C_{3-6}N(R^4)_2$ , -O-fenilo, -O-bencilo, - $NO_2$  halógeno y  $CF_3$ ;

en el que cada  $R^4$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo  $C_{1-4}$ , -C(O)O-alquilo  $C_{1-4}$ , -alquil  $C_{1-4}OR^7$  y -C(O) $R^5$ , a condición de que si un  $R^4$  es OH entonces el otro  $R^4$  no puede ser OH; o

- $N(R^4)_2$  forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo  $C_{1-4}$ ;

$R^2$  es 0-2 sustituyentes en el que cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo  $C_{1-4}$ , -cicloalquilo  $C_{3-6}$ , -OH, -O-alquilo  $C_{1-4}$ , - $N(R^6)_2$ , -alquil  $C_{1-4}N(R^6)_2$ , -O-alquil  $C_{1-4}N(R^6)_2$ , -cicloalquil  $C_{3-6}N(R^6)_2$ , -O-fenilo, -O-bencilo, - $NO_2$  halógeno y  $CF_3$ ;

cada  $R^6$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -alquilo  $C_{1-4}$ , -C(O)O-alquilo  $C_{1-4}$ , -alquil  $C_{1-4}OR^7$  y -C(O) $R^8$ , a condición de que si un  $R^6$  es OH entonces el otro  $R^6$  no puede ser OH; o

- $N(R^6)_2$  forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con alquilo  $C_{1-4}$ ;

en el que cada uno de  $R^5$  y  $R^8$  se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo  $C_{1-4}$  y fenilo;

$R^3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_{1-4}$  y arilo; y

en el que  $R^7$  se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo  $C_{1-4}$ .

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 3 en el que cada uno de E y G se seleccionan los dos independientemente entre -NH-alquilo  $C_{1-4}$ .

5. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 4 en el que los heteroátomos de E y G están los dos unidos al anillo de triazina.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 5 en el que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno independientemente 1-2 sustituyentes.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 6, en el que cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es al menos un sustituyente para.

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en el que cada sustituyente  $R^1$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, -O-alquilo  $C_{1-4}$  y -alquilo  $C_{1-4}$ .

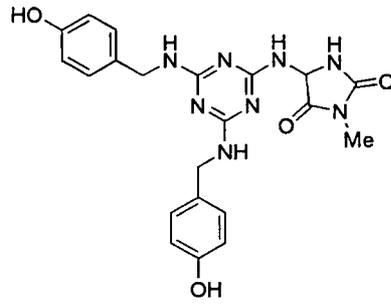
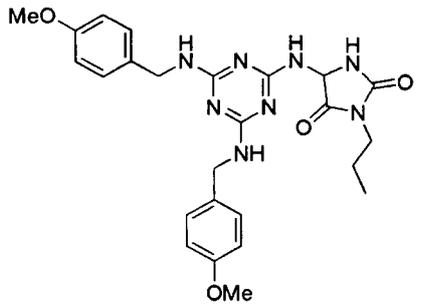
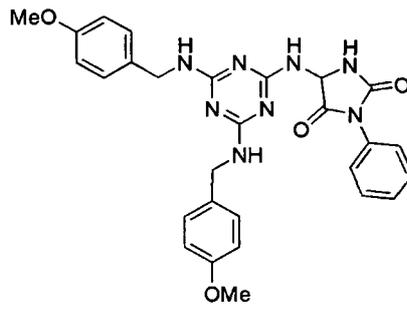
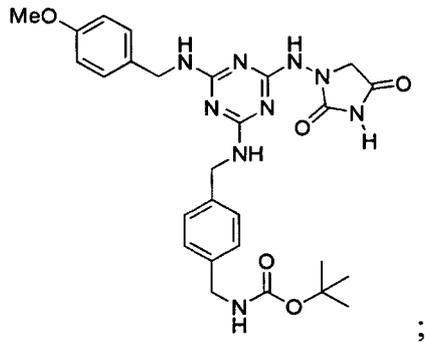
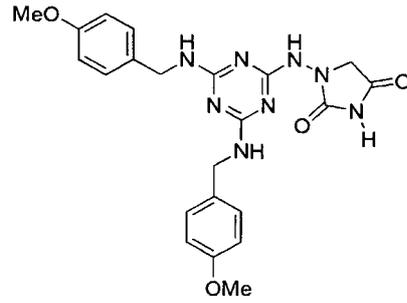
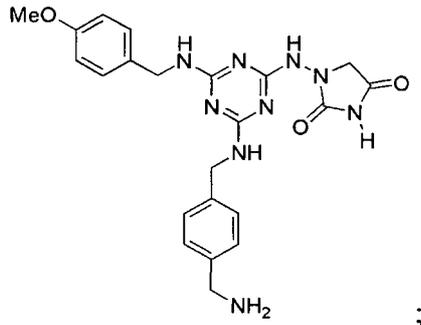
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que cada sustituyente R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH, O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>.

5 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en el que R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, propilo, butilo y fenilo.

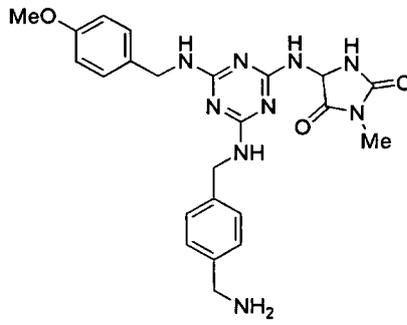
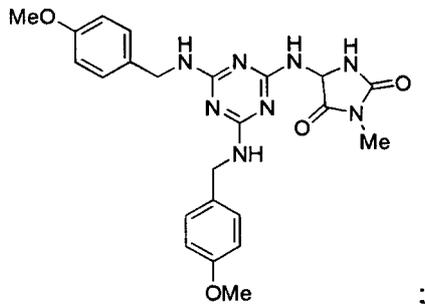
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en el que R<sup>3</sup> es hidrógeno.

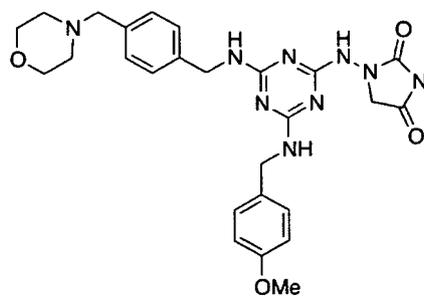
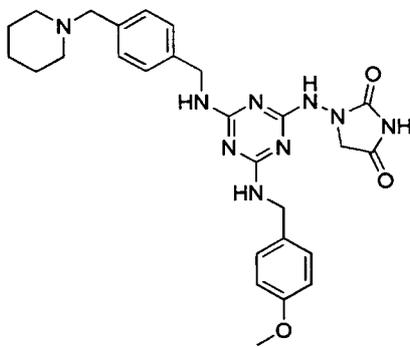
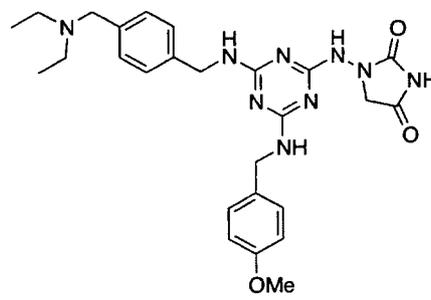
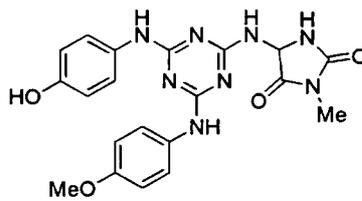
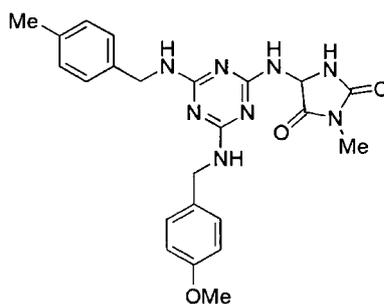
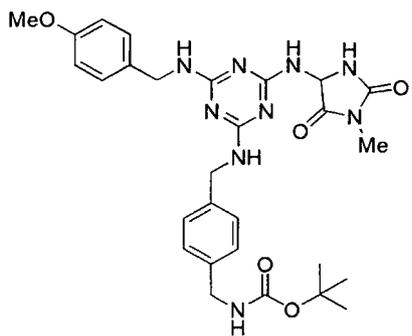
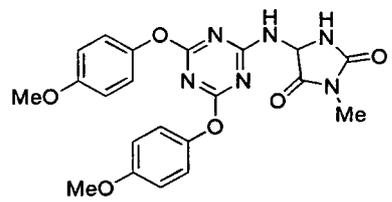
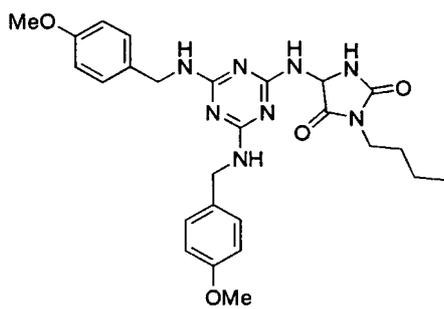
12. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:

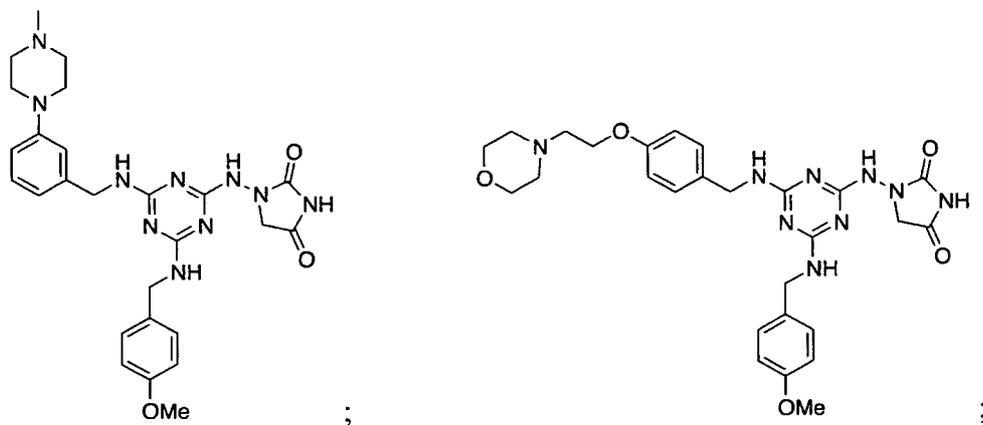
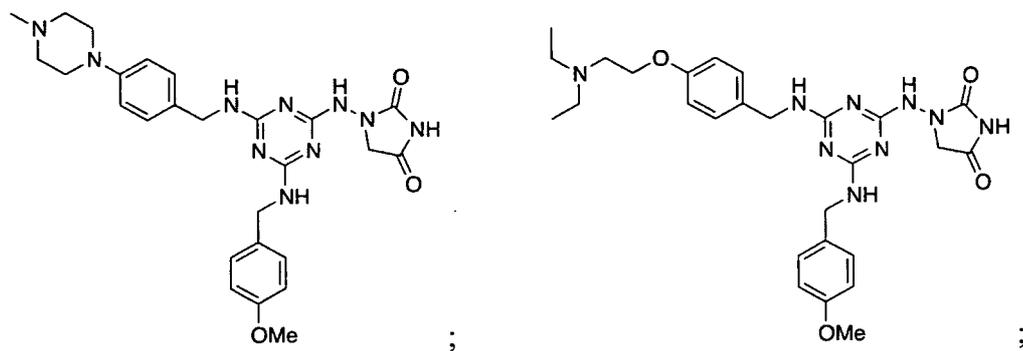
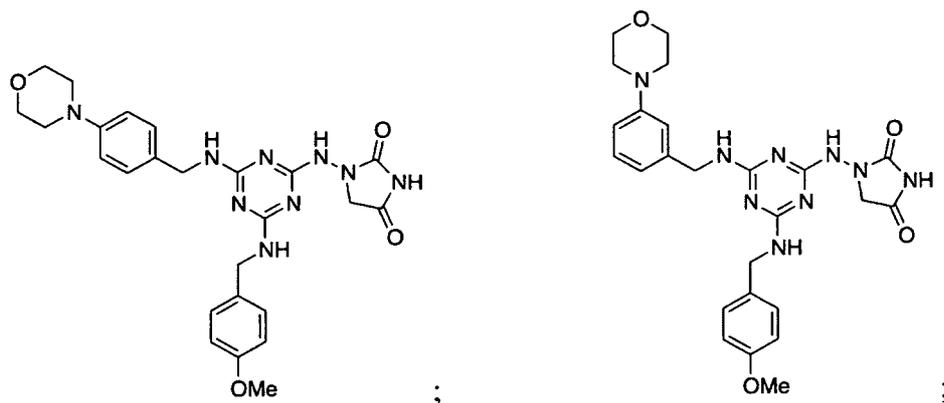
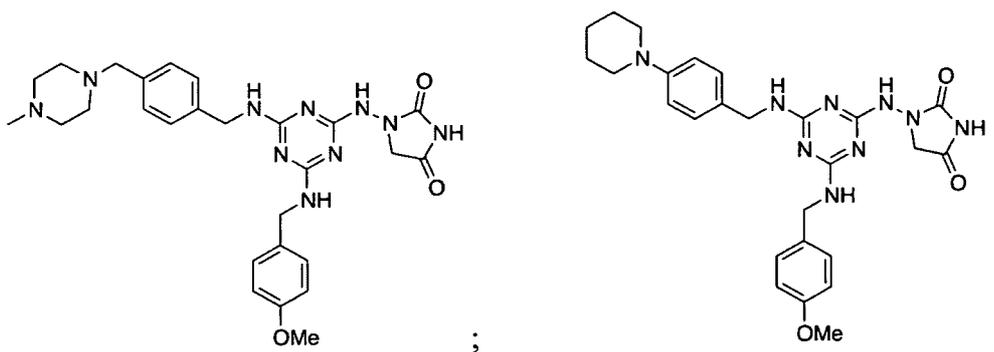
10

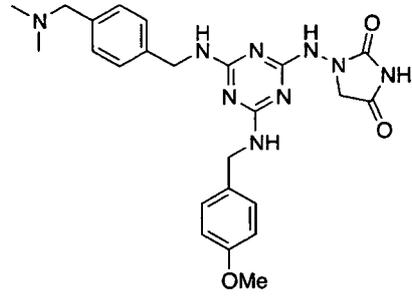
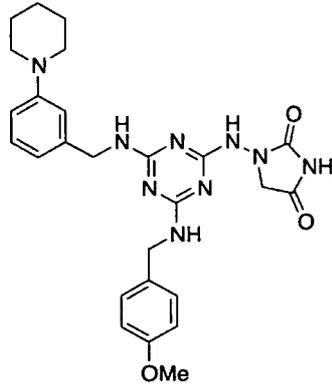


15



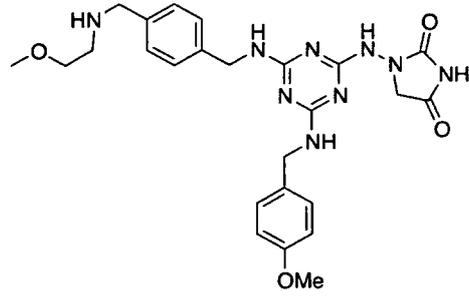
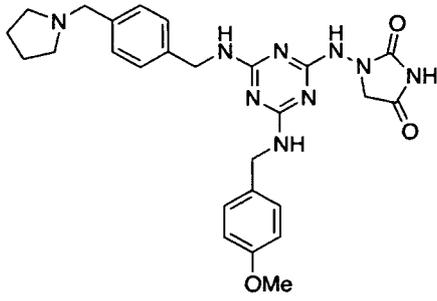






;

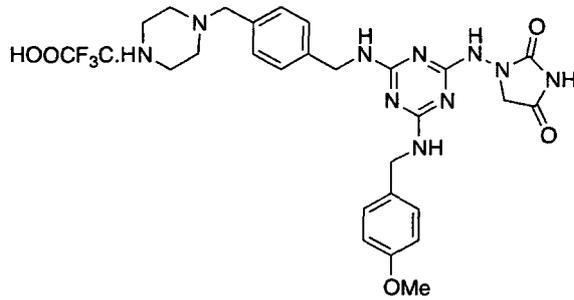
;



;

;

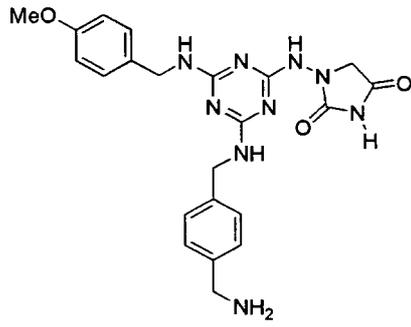
5 y



.

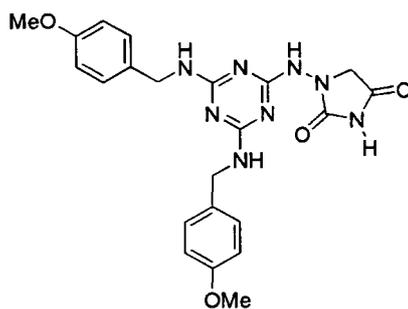
13. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 12 seleccionado entre el grupo que consiste en:

10



;

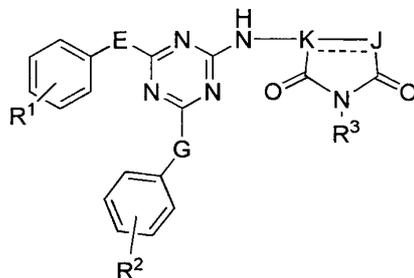
y



- 5 14. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13 o un derivado, una sal o un profármaco farmacéuticamente aceptablea del mismo.
15. Un método de acuerdo con la cláusula 14 en el que el cáncer es el cáncer de colon, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer de cerebro o el cáncer de mama.
- 10 16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13 o un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I, o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:



Fórmula I

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y --- es un enlace sencillo;

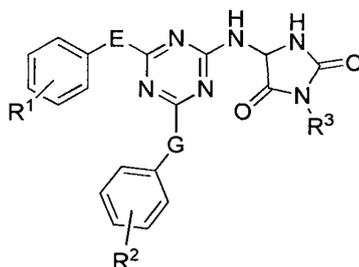
K se selecciona independientemente entre CH y N, y J se selecciona independientemente entre NH y CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en donde cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -NO<sub>2</sub>, halógeno y CF<sub>3</sub>;

cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)R<sup>8</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; • -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo; R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>- y fenilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, arilo y alquilarilo; y en donde dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en donde el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula II o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:



Fórmula II

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en donde cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -NO<sub>2</sub>, halógeno y CF<sub>3</sub>;

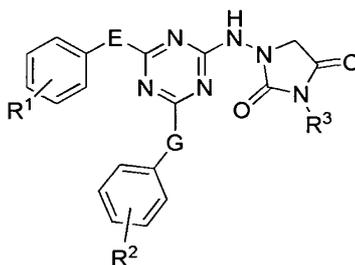
cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -C(O)R<sup>8</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; • -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo;

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y fenilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-4</sub> y arilo;

y en donde dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en donde el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de Fórmula III o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:



**Fórmula III**

E y G se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -NH-, -O- y, en cualquier orientación, -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>- y -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-; y

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno 0-2 sustituyentes en donde cada sustituyente se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>-, -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-4</sub>NHR<sup>4</sup>-, -NO<sub>2</sub>-, halógeno y CF<sub>3</sub>;

en donde cada R<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H-, -OH-, -alquilo C<sub>1-4</sub>-, -C(O)O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -C(O)R<sup>5</sup>, a condición de que si un R<sup>4</sup> es -OH entonces el otro R<sup>4</sup> no puede ser -OH; o -N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub> forma un grupo pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolino opcionalmente sustituido con metilo; R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en -alquilo C<sub>1-4</sub> y fenilo;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1-4</sub> y arilo;

y en donde dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en donde el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que cada uno de E y G se seleccionan los dos independientemente de -NH-alquilo C<sub>1-4</sub>.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 en el que los heteroátomos de E y G están unidos los dos al anillo de triazina.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno independientemente 1-2 sustituyentes.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es al menos un sustituyente para.

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cada sustituyente R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH-, -O-alquilo C<sub>1-4</sub> y alquilo C<sub>1-4</sub>.

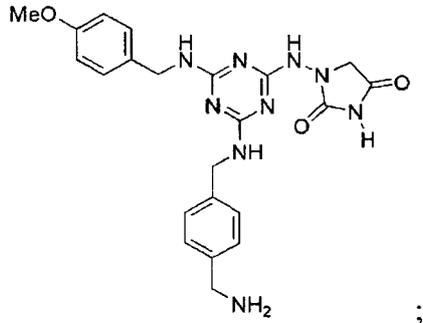
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que cada sustituyente R<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -OH-, O-alquilo C<sub>1-4</sub> y -alquil C<sub>1-4</sub>N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, propilo, butilo y fenilo.

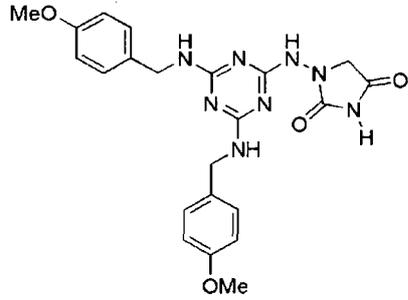
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R<sup>3</sup> es hidrógeno.

5

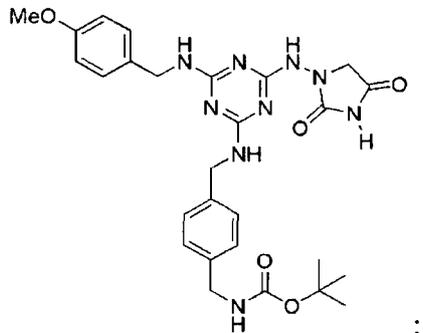
12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:



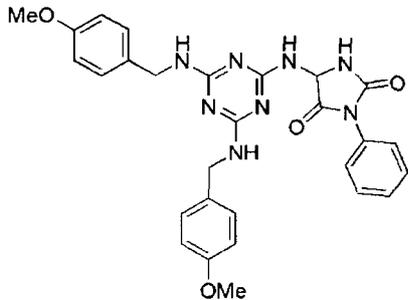
;



;

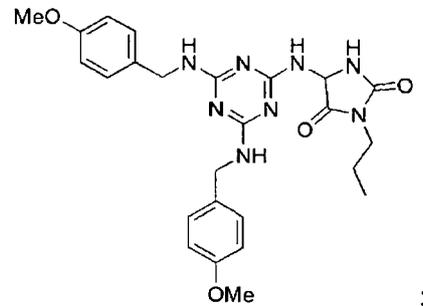


;

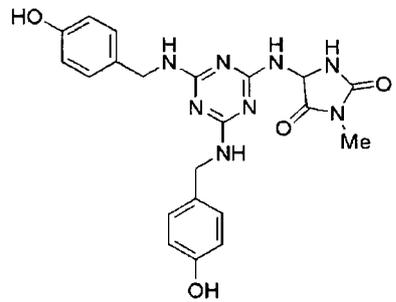


;

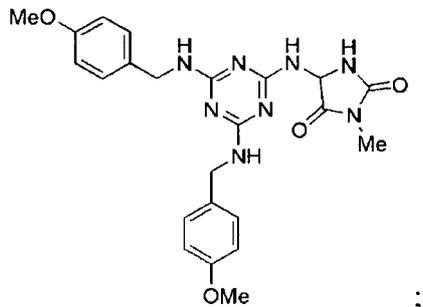
10



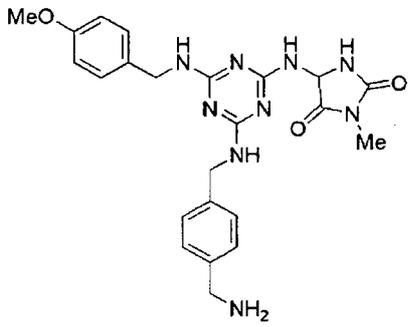
;



;

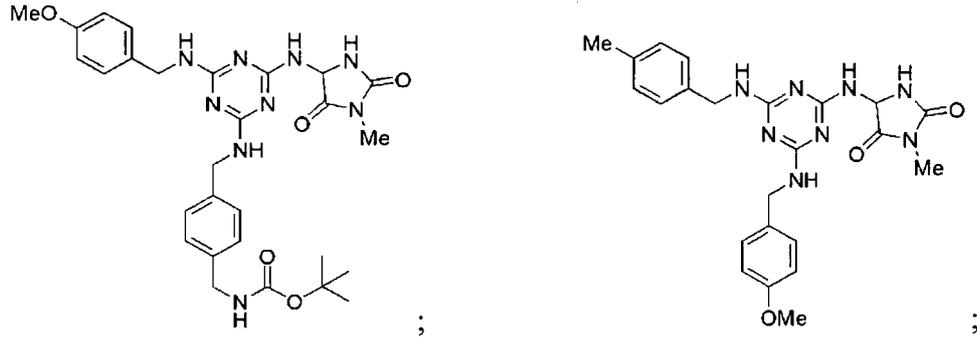
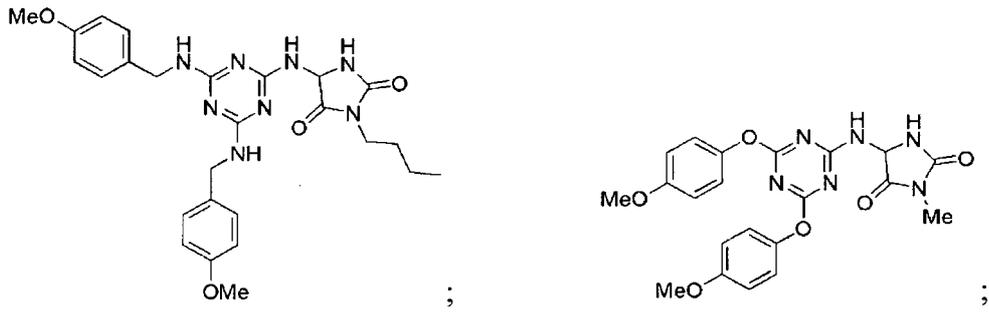


;



;

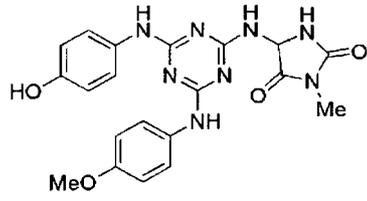
15



5

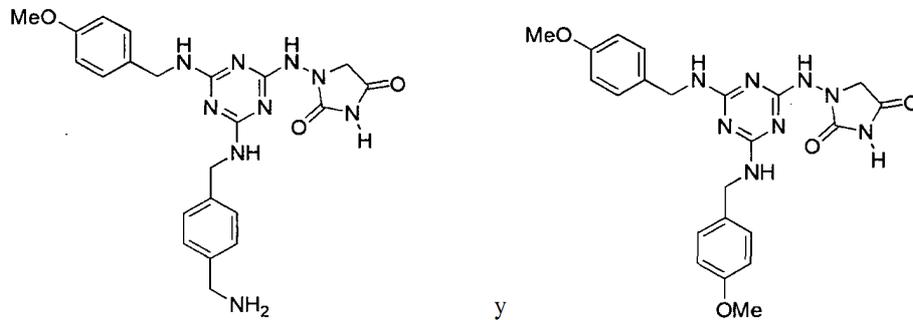


y

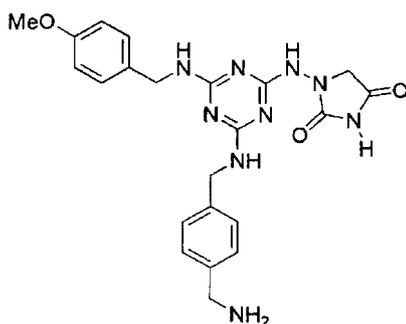


10

13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 seleccionado entre el grupo que consiste en:



15 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de fórmula:



1-[4-(4-aminometil-bencilamino)-6-(4-metoxibencilamino)-(1,3,5)-triazin-2-il-amino]-imidazolidina-2,4-diona.

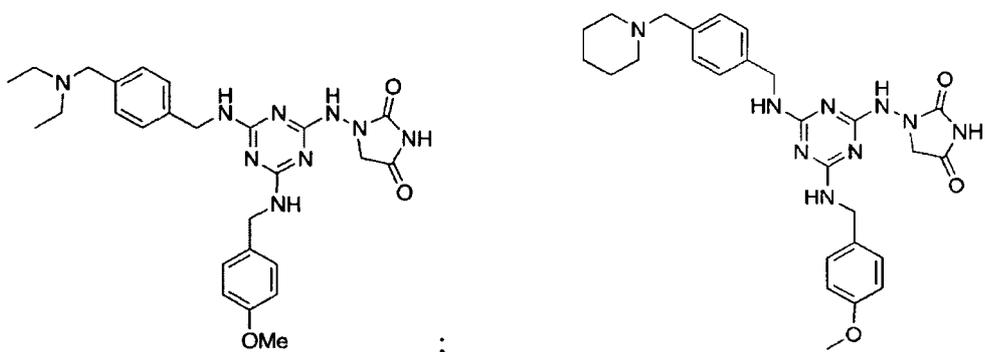
5 15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato.

10 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto;

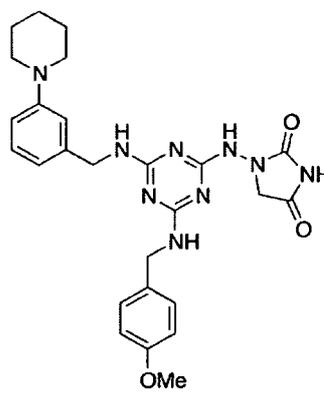
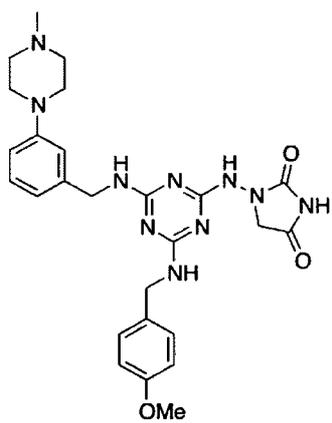
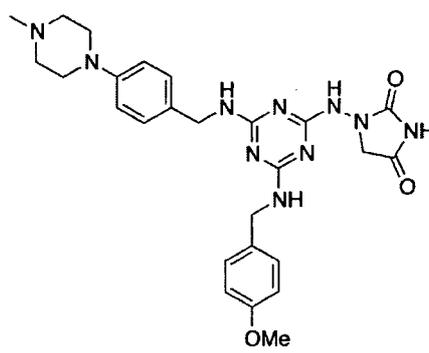
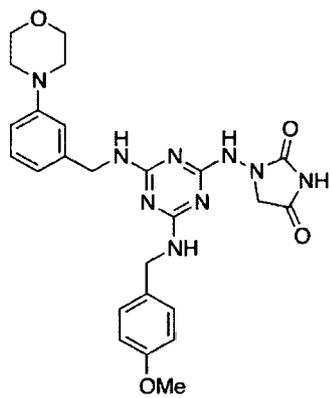
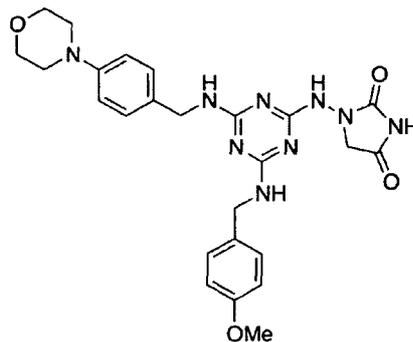
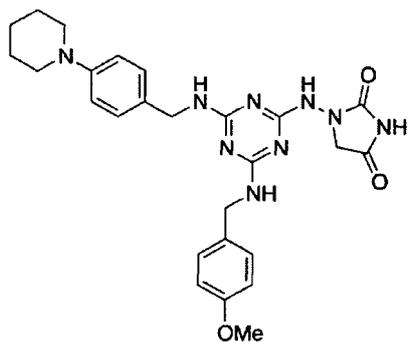
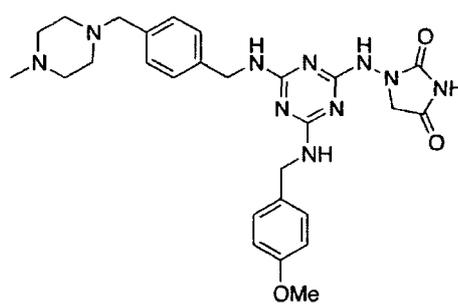
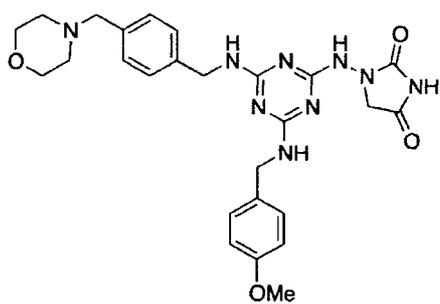
15 en donde dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en donde el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

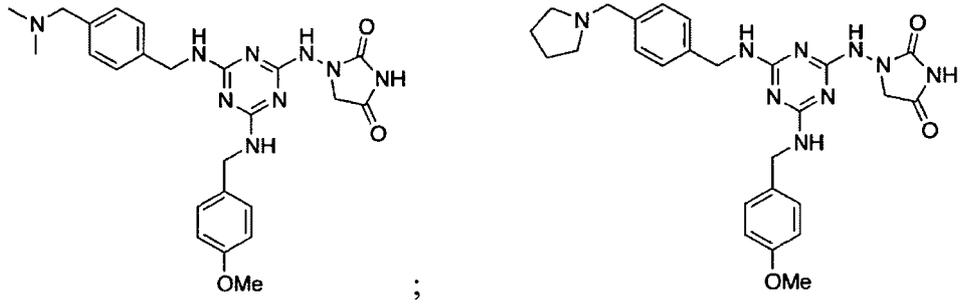
20 17. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables en donde dicho profármaco se selecciona entre (i) un compuesto en el que un resto de aminoácido o una cadena polipeptídica de dos o más restos de aminoácidos están unidos covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I, (ii) un compuesto en el que un carbonato, un carbamato, una amida o un éster de alquilo están unido covalentemente a un grupo amino, hidroxilo o ácido carboxílico libre del compuesto de fórmula I a través de la cadena lateral del profármaco de carbono carbonílico o (iii) un compuesto que comprende un derivado de fosfato de un compuesto de fórmula I unido a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I; en donde el derivado de fosfato es un ácido de fosfato, una sal de un ácido de fosfato o un éster de fosfato.

30 18. Un compuesto o una sal, un hidrato y/o un profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionados entre el grupo que consiste en:

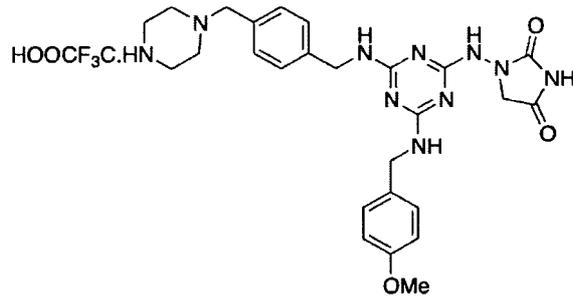


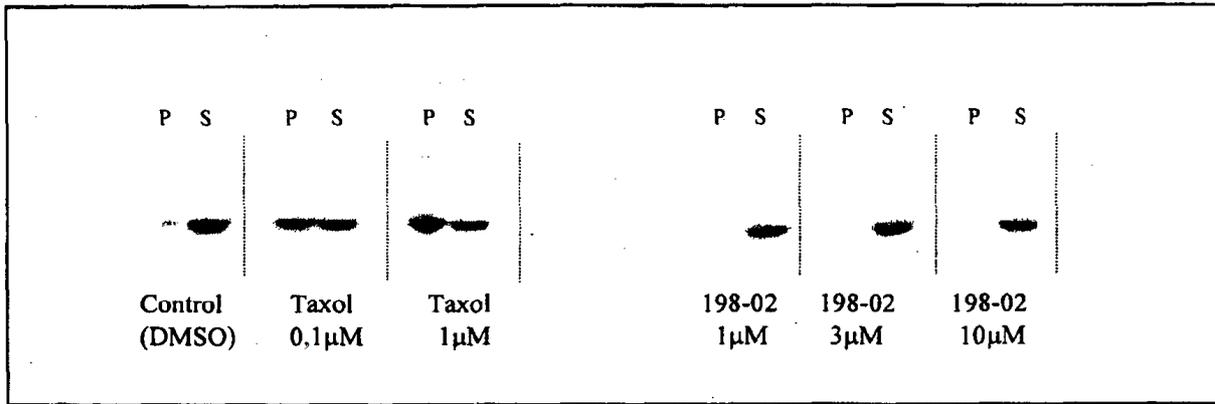
35



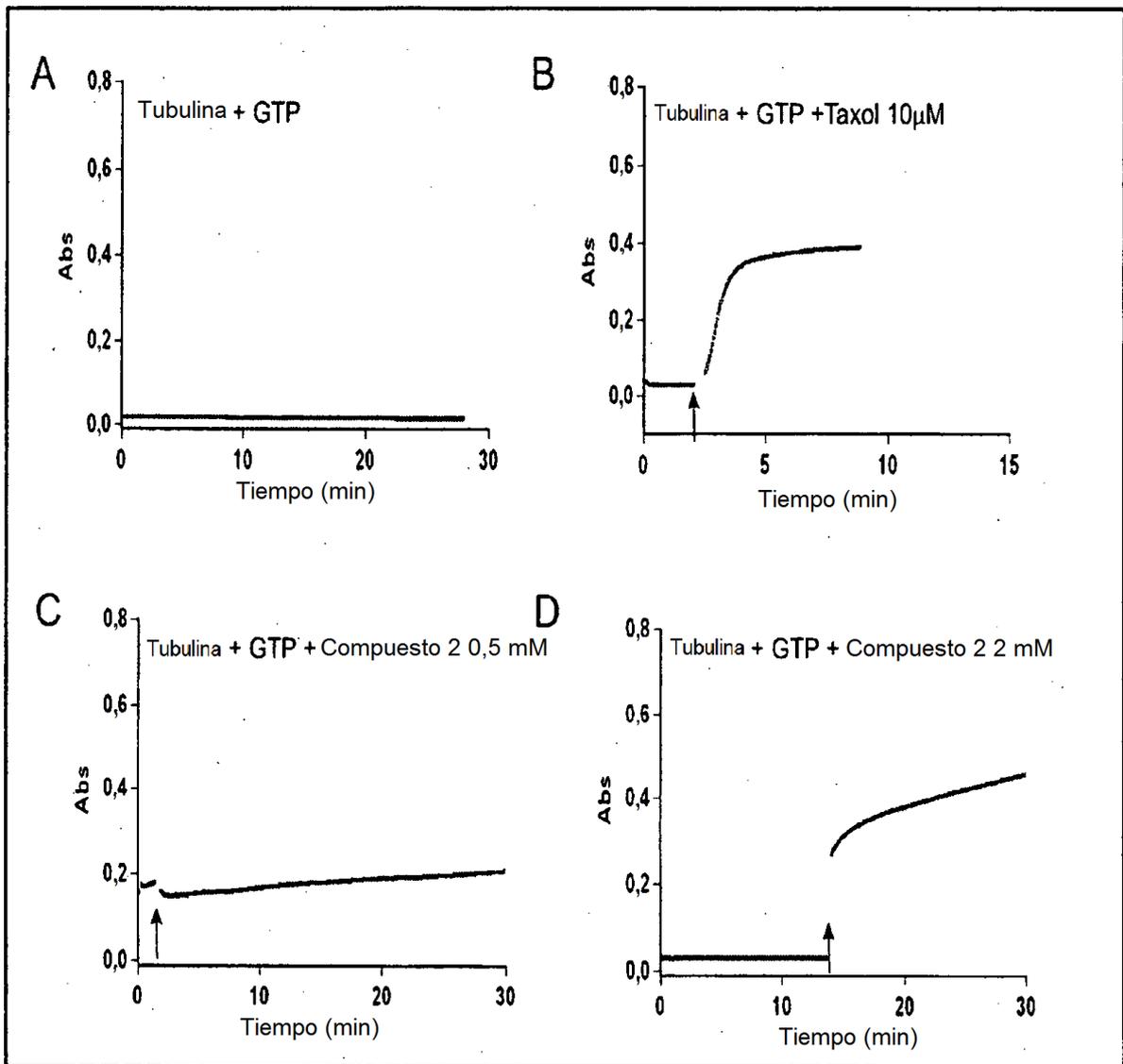


y





**Figura 1**



**Figura 2**

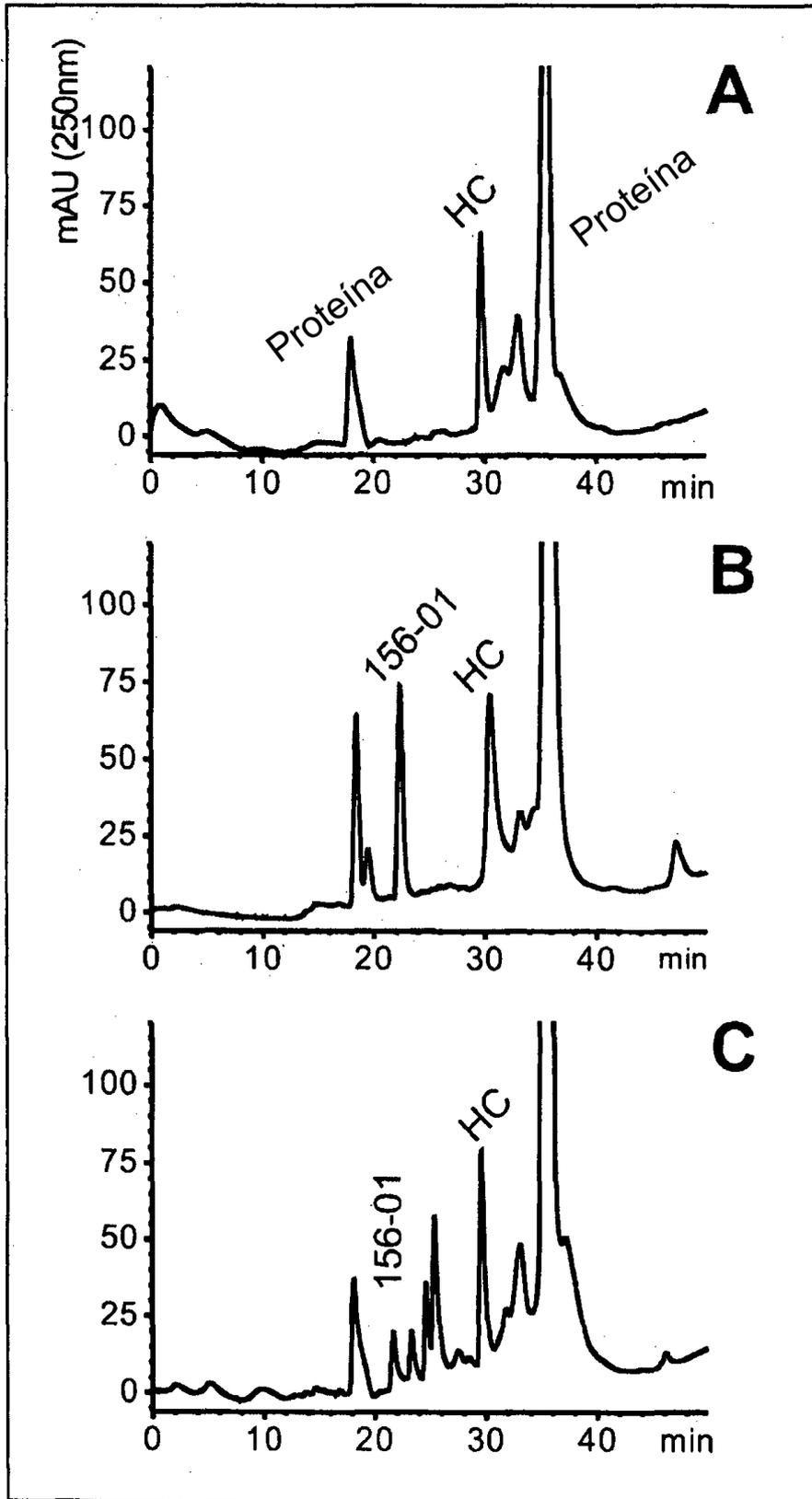


Figura 3

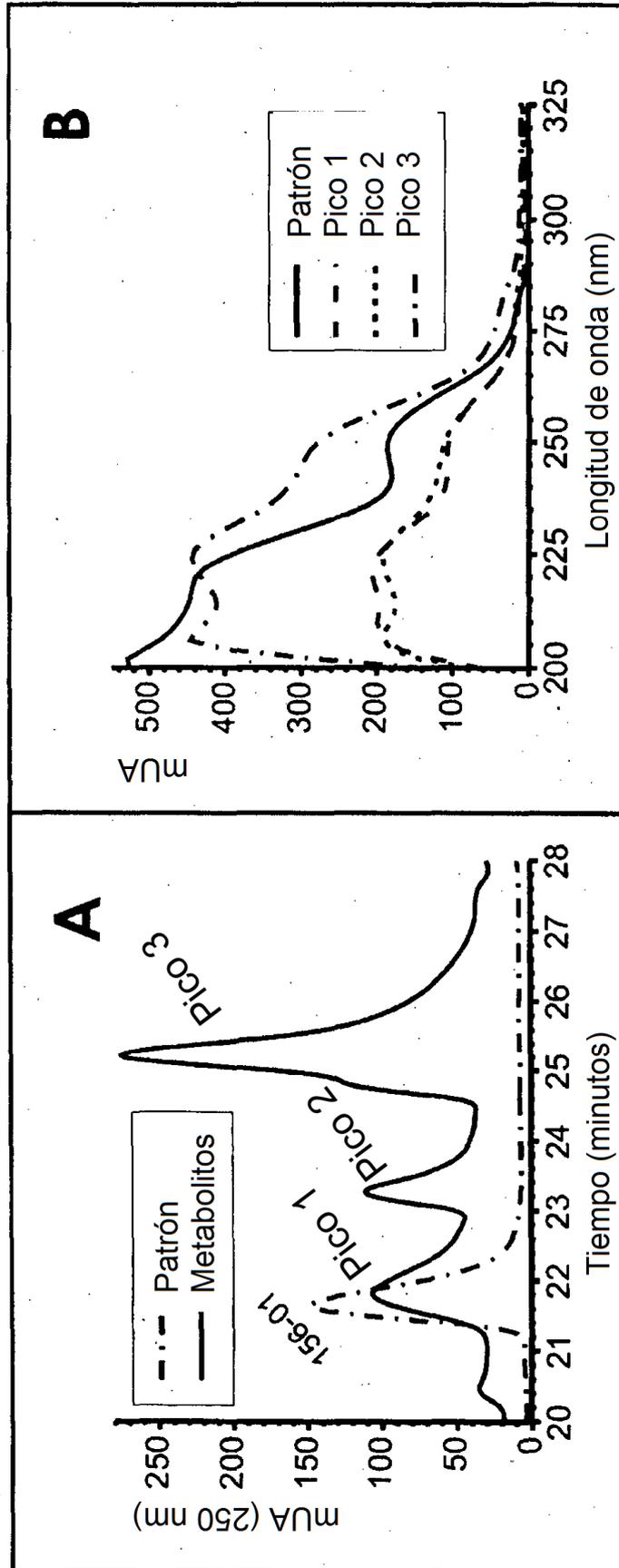
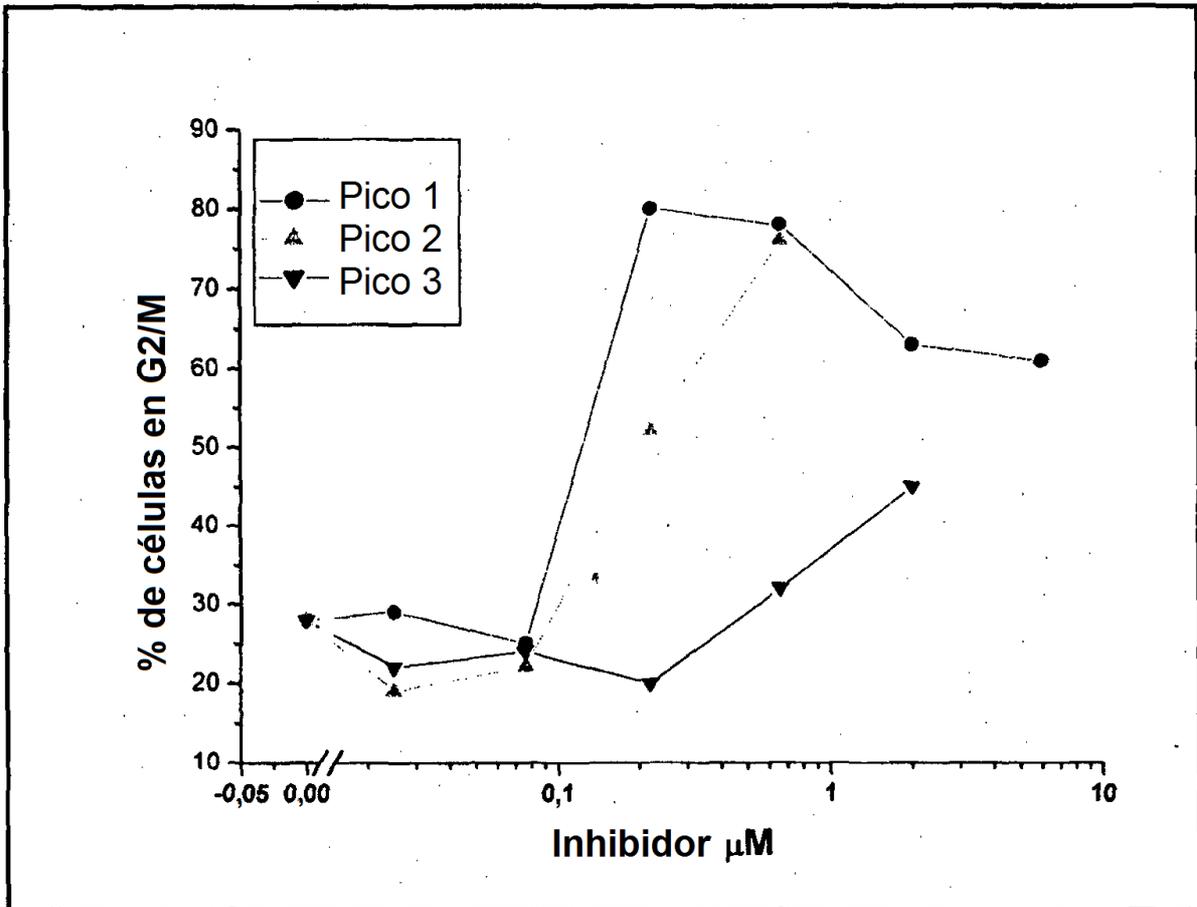


Figura 4



**Figura 5**

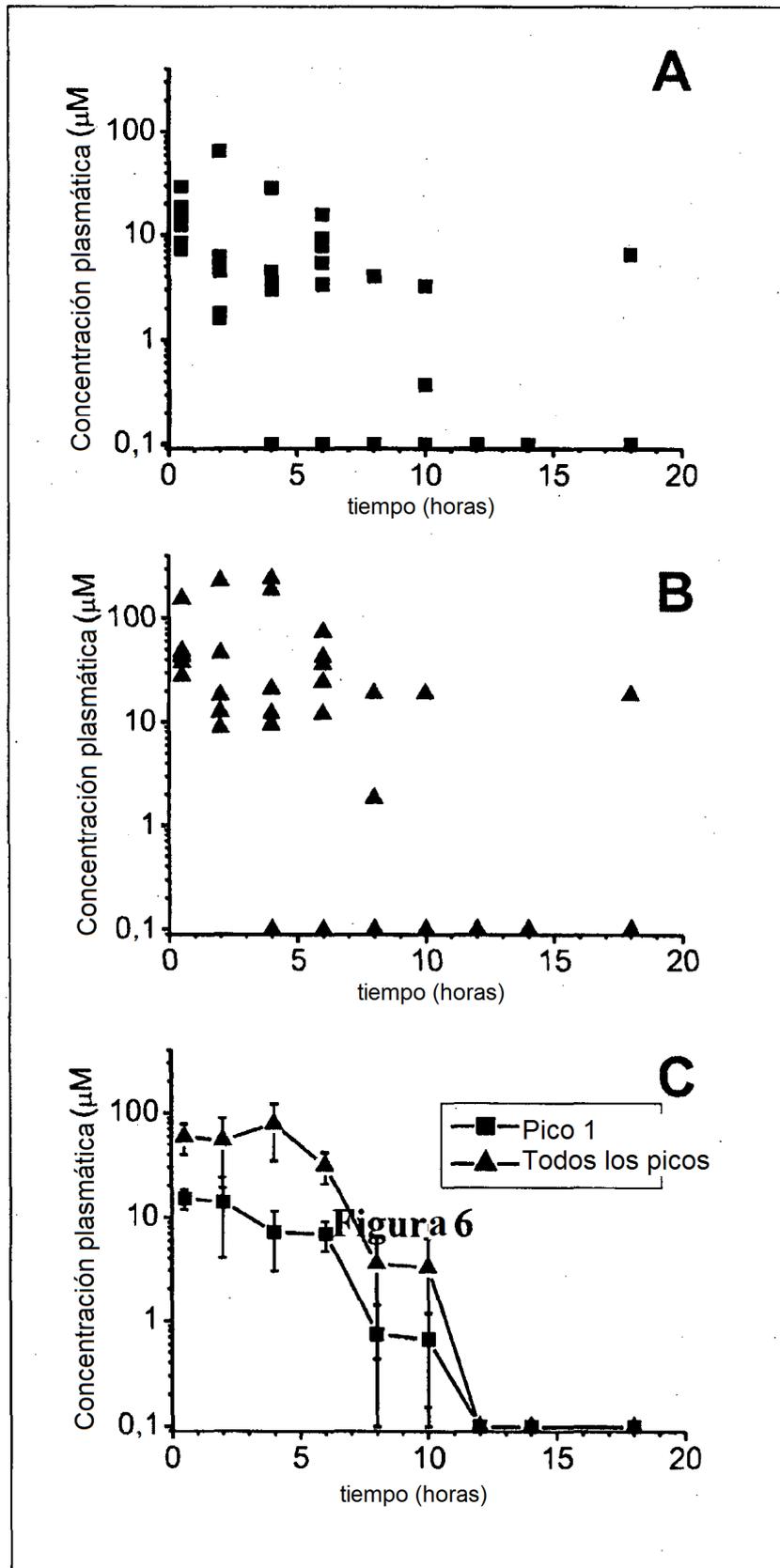


Figura 6

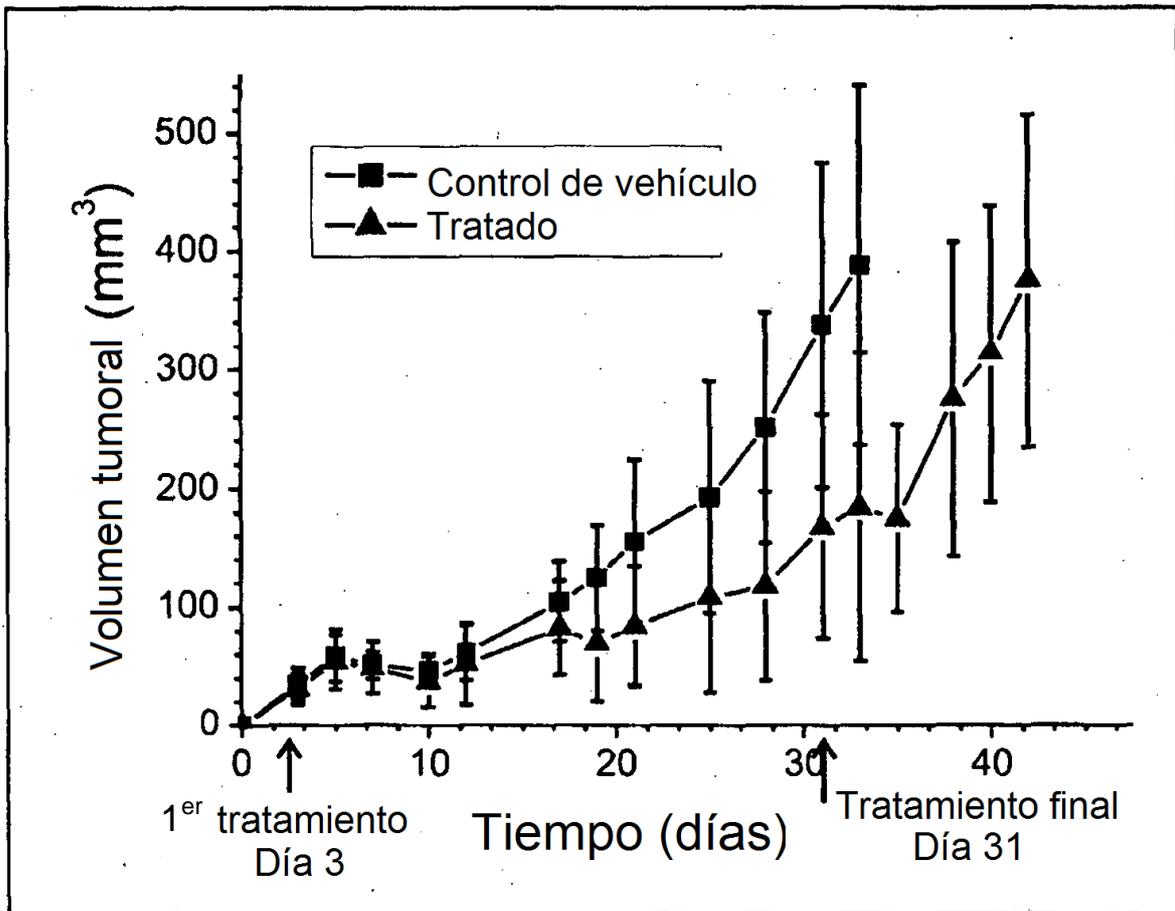
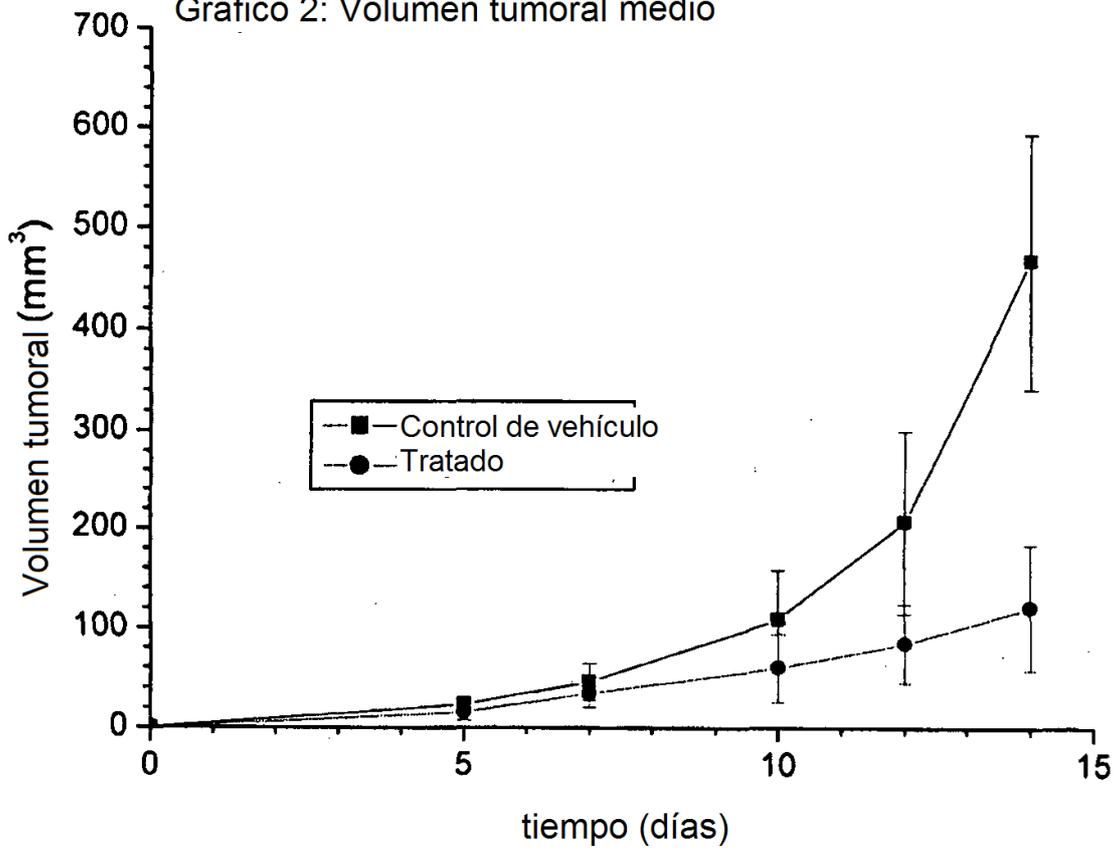


Figura 7

**Xenoinjertos 156-01 con U87MG( $\Delta$ 2-7) (PK13) 16/10/2009**

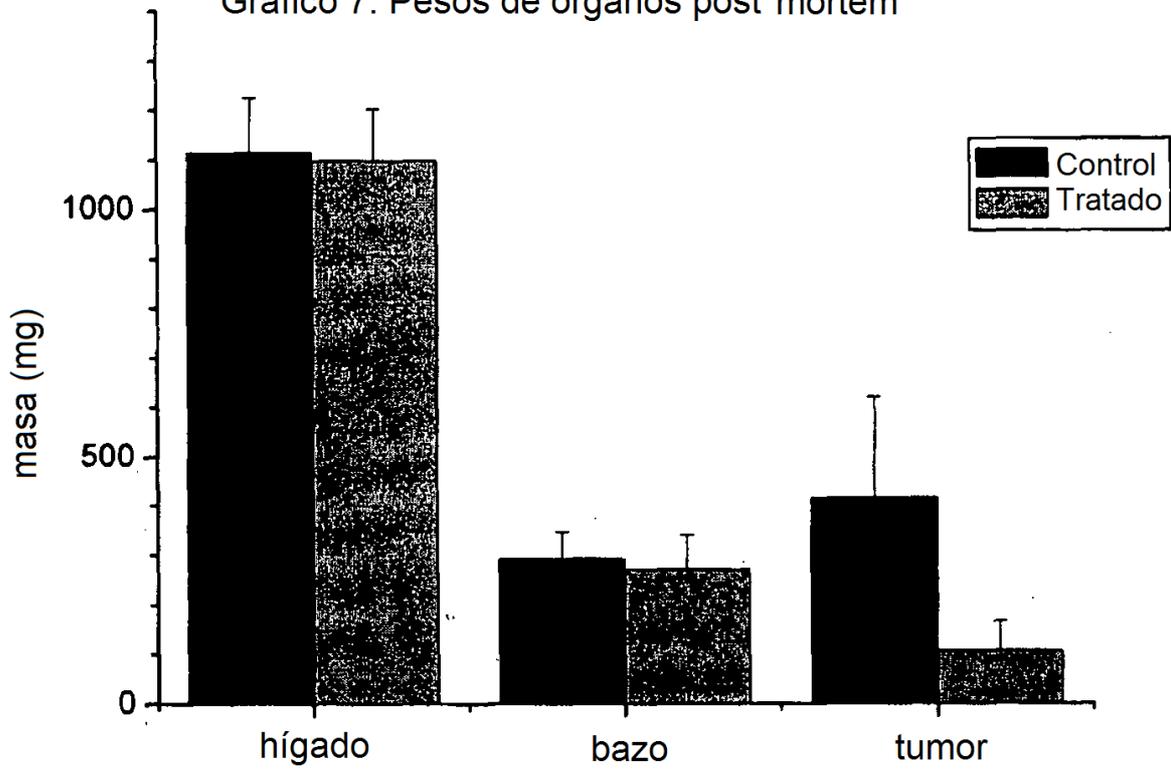
Gráfico 2: Volumen tumoral medio



**Figura 8**

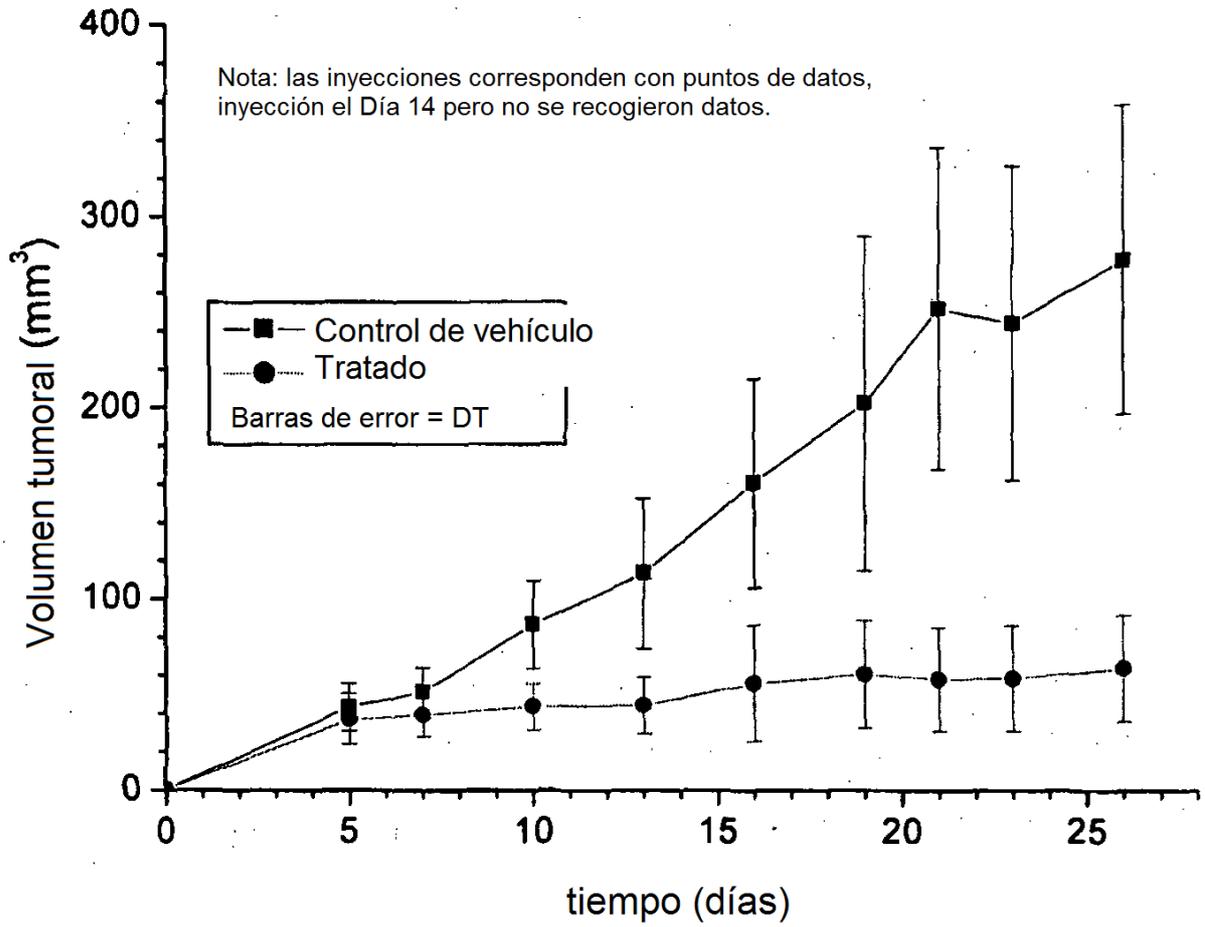
Xenoinjertos 156-01 con U87MG( $\Delta$ 2-7) (PK13) 16/10/2009

Gráfico 7: Pesos de órganos post mortem

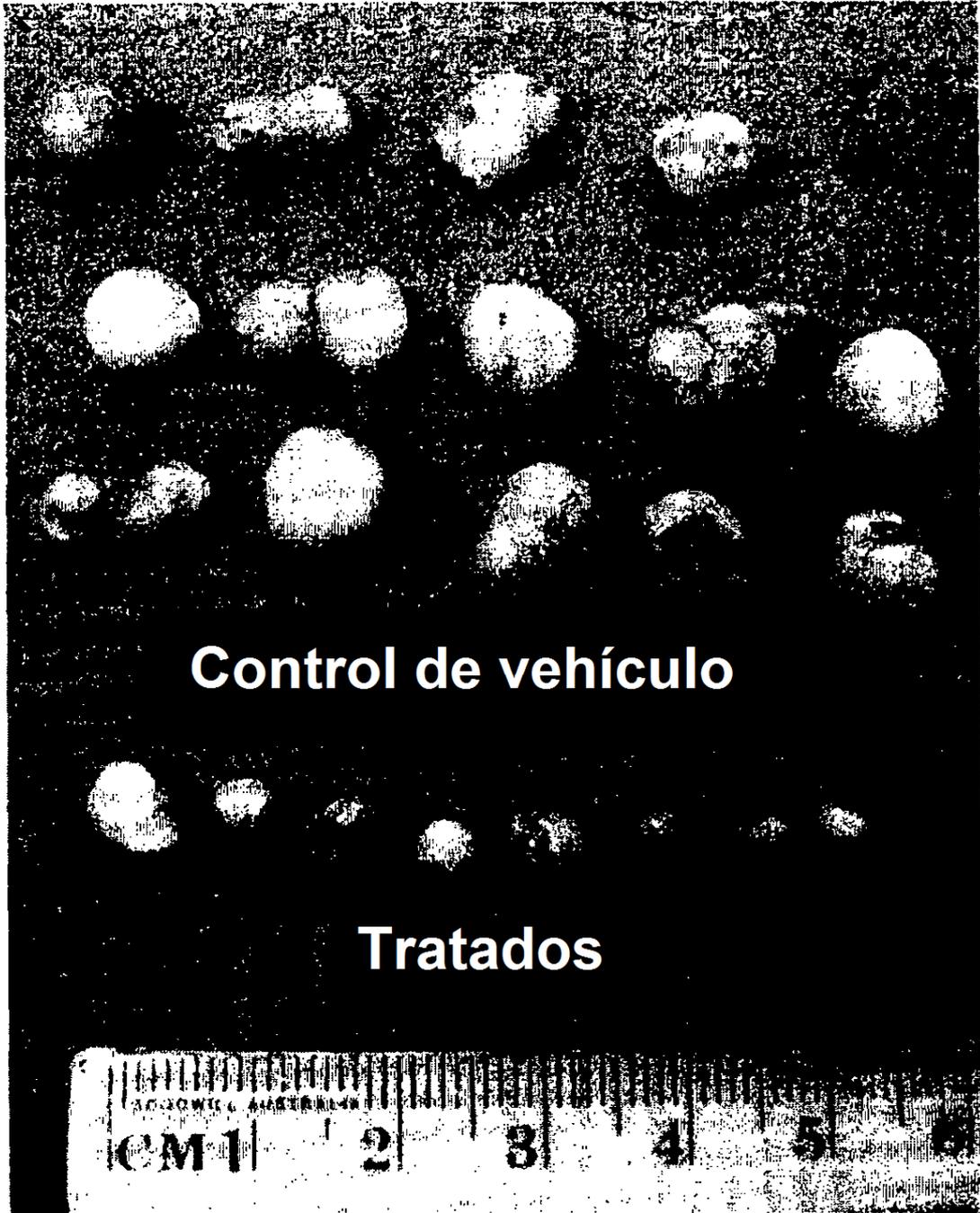


**Figura 9**

**Gráfico 2: Volumen tumoral medio**



**Figura 10**



**Figura 11**