

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 479**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01) **C07D 487/04** (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4706 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013** **PCT/SE2013/000142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14046589**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013** **E 13839817 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2900667**

54 Título: **Medios y métodos para tratar tumores sólidos**

30 Prioridad:

21.09.2012 SE 1200571

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

10.12.2019

73 Titular/es:

VIVOLUX AB (100.0%)
Hus Oscar II, Uppsala Science Park
751 83 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

LINDER, STIG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 734 479 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

Medios y métodos para tratar tumores sólidos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a medios para tratar tumores de cáncer sólidos, en particular tumores de cáncer sólidos diseminados, en una persona afectada por cáncer y a un método correspondiente.

10 Antecedentes de la invención

Se deben desarrollar fármacos anticancerígenos nuevos y eficaces para pacientes que padecen cáncer diseminado. El desarrollo de fármacos para tumores sólidos está asociado con problemas específicos debido a las complejas condiciones biofísicas y metabólicas en el tejido tumoral 3D que pueden ser difíciles de imitar en sistemas experimentales in vitro. Se sabe que la hipoxia y la difusión limitada de nutrientes conducen a la inactividad y resistencia a los agentes anticancerígenos convencionales y la radioterapia. Además, los medicamentos contra el cáncer deben poder penetrar en el parénquima tumoral para llegar a las células cancerosas en concentraciones tóxicas. Algunos medicamentos que están en uso clínico para el tratamiento de tumores sólidos muestran una penetración deficiente en las masas tumorales tridimensionales, lo que puede ser una de las razones de su limitada eficacia. Los esferoides multicelulares (MCS) imitan los tumores sólidos humanos mejor que los cultivos monocapa en 2D y, por lo tanto, son más adecuados que los cultivos monocapa para la detección de fármacos activos en tumores sólidos.

La muerte celular a menudo se subdivide en tres tipos de muerte celular: apoptosis (tipo I), muerte celular autofágica (tipo II) y necrosis (tipo III). La apoptosis está mediada por la activación de las caspasas. La autofagia es un mecanismo conservado evolutivamente para la degradación de proteínas celulares de larga vida y orgánulos celulares dañados. La formación de autofagosomas es una característica principal de la autofagia. La formación de autofagosomas requiere la activación de fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III y también es dependiente de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Atg-Atg12 y Atg8). La autofagia protege las células durante las condiciones de privación de nutrientes, y las células se someten a apoptosis cuando se inhibe la autofagia. Las características morfológicas de la autofagia también se han observado durante la muerte celular en condiciones de inhibición de la caspasa.

Los documentos WO 02/089809 y WO 2004/063196 describen derivados de tetraazafluoreno para uso en medicina, sin embargo, no contra el cáncer.

El documento WO 2009/035534 describe un método para tratar enfermedades oculares isquémicas asociadas con compuestos similares a la fórmula I de la presente invención, pero no describe el uso de estos compuestos como agentes anticancerosos.

Herrmann et al., (2) se relaciona con el uso de agentes anticancerosos, sin embargo los derivados de azafluoreno de la fórmula (1) presente, contra tumores sólidos.

Eshba et al. (1) dan a conocer derivados de N-(1-piridina-2-il-metilideno)-N-(9H-1,3,4,9-tetraza-fluoreno-2-il)-hidrazina como agentes antivirales y anticancerígenos.

El documento WO 2012/128689 describe derivados de tetraazafluoreno para uso contra tumores sólidos.

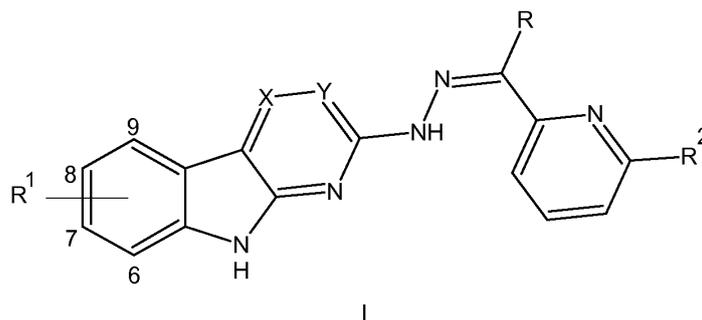
50 Objetos de la invención

Un objetivo principal de la invención es proporcionar un medio para el tratamiento eficiente de tumores de cánceres sólidos.

Otros objetos de la invención se harán evidentes a partir del siguiente resumen de la invención, una serie de realizaciones preferidas de la misma ilustradas en un dibujo, y las reivindicaciones adjuntas.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención, se describe un medio para el tratamiento eficiente de tumores de cáncer sólidos. El medio es un compuesto de la fórmula general I, en donde R es H o metilo o metileno sustituido con alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, metoxi, metoxi sustituido por uno a tres flúor, halógeno; R² es H o alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado; X es CH o N; Y es CH o N; R no comprende H o metilo si R¹ es H o alquilo C₁-C₄, R² es H o alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, X es N e Y es N.



Se prefiere que R² sea H. Las realizaciones preferidas del compuesto de la invención comprenden R = H, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = CH; R = CH₂C(CH₃)₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N; R = CH₂CH₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N.

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el compuesto de la fórmula general puede estar adicionalmente sustituido con alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado en una de las posiciones 6, 7, 8, 9 del mono-, di- o triazacarbazolilo no sustituido por R¹.

El compuesto de la invención comprende cualquier sal farmacéuticamente aceptable, complejo de sal/disolvente, complejo metálico (excepto uno con cualquiera de Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺), complejo de disolvente y profármaco de los mismos.

El compuesto de la invención puede existir como una mezcla de sus isómeros cis/trans en el enlace N = C que conecta la porción 1-piridina-2-ilo con la porción iminofluoren-2-ilo. Dado que la velocidad de isomerización en condiciones fisiológicas es sustancial, se presume que los isómeros ejercen un efecto farmacológico similar o incluso sustancialmente igual en el cuerpo.

El compuesto de la invención es un quelante de hierro permeable a las células. Si bien no desean limitarse a la teoría, los inventores creen que el efecto anticancerígeno del compuesto de la invención se basa en sus propiedades quelantes del hierro.

El compuesto de la invención muestra un efecto citotóxico en una serie de modelos in vitro e in vivo. El efecto citotóxico reside en la reducción de la respiración mitocondrial. Se sabe que el tejido del cáncer de colon contiene glucosa en concentraciones de aproximadamente el 10% de la del tejido normal, y se sugiere que el tejido del cáncer depende de la respiración aeróbica a través del ciclo de Krebs (Hirayama A et al., Cancer Res 69 (2009) 4918). -4925). En un modelo esferoide multicelular de cáncer de colon HCT116 in vitro, el compuesto de la invención produce muerte celular correspondiente a un índice de supervivencia (IS) de 50% o menos a una concentración de 10 μM/L. En esta solicitud, la limitación de la supervivencia celular al 50% o menos a una concentración de 10 μM/L por un compuesto químico se considera un efecto citotóxico sustancial y se denomina así. La actividad citotóxica de los esferoides indica que el compuesto de la invención afecta tanto a poblaciones de células en proliferación como a inactivas. Si bien el compuesto de la invención también afecta a la proliferación celular del cultivo de células de cáncer de colon HCT116 monocapa en medio con alto contenido de glucosa en condiciones normóxicas, la falta de glucosa aumenta la actividad antiproliferativa.

El compuesto de la invención induce la disfunción mitocondrial y aumenta la dependencia de la glucosa. El agotamiento de la glucosa aumenta la sensibilidad de las células cancerosas al compuesto de la invención dando como resultado un aumento de la citotoxicidad y la apoptosis.

De acuerdo con la presente invención, se describe el uso del compuesto de la invención para tratar un tumor de cáncer sólido en una persona. De acuerdo con un aspecto preferido, el quelante de hierro permeable a las células de la invención se usa preferiblemente en combinación con un agente inhibidor de autofagia para dicho tratamiento.

De acuerdo con otro aspecto preferido de la invención, se describe una composición farmacéutica que comprende el quelante de hierro de la invención y un vehículo farmacéutico. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía adecuada, tal como por vía oral o parenteral. Los vehículos adecuados comprenden, por ejemplo, dimetilsulfóxido y medios acuosos, tales como mezclas que comprenden dimetilsulfóxido y agua. Los vehículos de fluidos preferidos son aquellos capaces de disolver el compuesto de la invención. Otros vehículos fluidos preferidos, en particular vehículos acuosos, son aquellos que comprenden el compuesto de la invención en forma finamente dispersa, tal como en forma de micropartículas de un tamaño de 10 μm o inferior.

De acuerdo con otro aspecto preferido de la invención, se describe un método para tratar un cáncer sólido en una persona, que comprende administrar a la persona una dosis farmacológicamente efectiva del quelante de hierro de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable. La dosis farmacológicamente efectiva se administra

preferiblemente comprendida por la composición farmacéutica de la invención.

El compuesto de la invención induce una respuesta autofágica in vitro e in vivo.

5 De acuerdo con la presente invención, también se describe el uso de los compuestos para tratar un tumor sólido en una persona afectada por cáncer, comprendiendo el método administrar a dicha persona una dosis farmacológicamente efectiva de la combinación del quelante de hierro permeable a las células de la invención. La administración puede ser por cualquier vía adecuada, tal como parenteral u oral en forma de una única combinación farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como dimetilsulfóxido.

10 La invención se describirá ahora con más detalle haciendo referencia a una serie de realizaciones preferidas ilustradas en un dibujo que comprende varias figuras.

Breve descripción de las figuras.

15 Las figuras 1a-1l ilustran la citotoxicidad del compuesto de la invención en un modelo de células de carcinoma de colon HCT116;

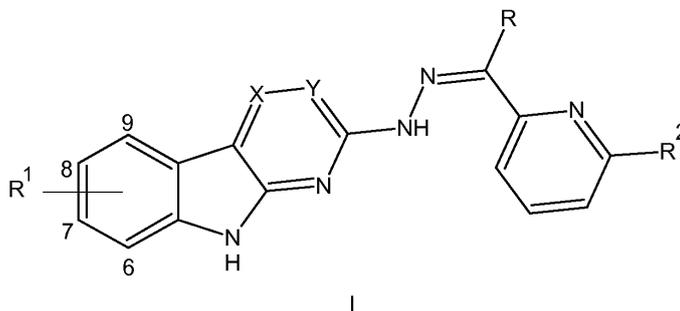
20 Las figs. 2a-2h ilustran la ausencia de citotoxicidad sustancial en compuestos no comprendidos en la invención pero que tienen una estructura similar.

Descripción de realizaciones preferidas

Materiales y procedimientos

25 Compuestos de la invención.

Se prepararon compuestos ejemplares (Tabla 1) de la fórmula general I de la invención.



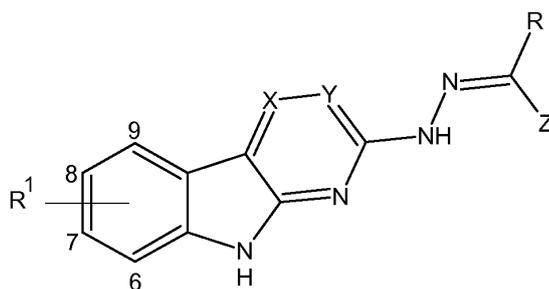
30

Tabla 1. Compuestos ejemplares de la invención

Compuesto nº	R	R ¹	R ²	X	Y
1	CH ₃	7-Cl	H	N	N
2	CH ₃	6-Cl	H	N	N
3	CH ₃	8-OCH ₃	H	N	N
4	CH ₃	8-OCF ₃	H	N	N
5	CH ₃	6-CH ₃ , 8-CH ₃	H	NN	
6	CH ₃	9-Br	H	N	N
7	CH ₃	8-Cl	H	N	N
8	CH ₃	8-CH ₃	H	N	N
9	CH ₂ CH ₃	6-CH ₃	H	N	N
10	CH ₂ C(CH ₃) ₃	6-CH ₃	H	N	N
11	H	6-CH ₃	H	CH	CH

Los compuestos 5 y 8 en la Tabla 1 son solo para comparación, no son parte de la invención reivindicada.

35 La tabla 2 muestra varios compuestos nuevos de fórmula general II que no están comprendidos en la invención. Su citotoxicidad es baja o esencialmente inexistente. Fueron preparados por razones de comparación.



II

Tabla 2. Compuestos ejemplares no comprendidos en la invención

Compuesto nº	R	R ¹	X	Y	Z
12	CH ₃	6-CH ₃	N	N	fenilo
13	CH ₃	6-CH ₃	N	N	2-(6-metoxipiridilo)
14	CH ₃	6-CH ₃	N	N	3-piridilo
15	CH ₃	6-CH ₃	N	N	4-piridilo
16	C(CF ₃) ₃	6-CH ₃	N	N	2-piridilo
17	C(CH ₃) ₃	6-CH ₃	N	N	2-piridilo
18	CH(CH ₃) ₂	6-CH ₃	N	N	2-piridilo
19	CH ₃	6-CH ₃	C	C	3-piridilo

5 Métodos generales

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC o mejor. Las condiciones anhidras se establecieron mediante la adición al disolvente de un exceso de tamices moleculares de 3 Å al menos 24 h antes de su uso. Se obtuvieron espectros de masas de ionización por electropulverización de baja resolución utilizando un espectrómetro de masas Agilent en modo de ionización positiva. La cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice 60 de Merck (malla 230-400). Los datos analíticos de CL/EM se obtuvieron con un espectrómetro de masas Agilent; Sistema Agilent 1100. (a) Columna ACE C8, (50 x 3,0 mm, 5 µM); Gradiente: 10-97% de acetonitrilo en agua/0.1% de TFA, en 3 minutos, 1.0 ml/minuto. (b): columna Xbridge C18, (3,5 mm, 50 x 3,0 mm); gradiente de 10% a 97% de acetonitrilo en NH₄HCO₃ 10 mM (pH 10) en 3 minutos, 1 ml/minuto. Los nombres de las estructuras químicas se determinaron mediante Marvin Sketch 5.2.6, ChemAxon.

EJEMPLO 1. Procedimiento general para la preparación de los intermediarios de 5H-[1,2,4] triazino[5,6-b]indol-3-il-hidrazina utilizados en la síntesis de compuestos de la invención 1-8

La tiosemicarbazida (50 mg, 0,11 mmol), las correspondientes isatinas (0,12 mmol) y K₂CO₃ (23,4 mg, 0,17 mmol) se disolvieron en agua (1 ml) y se calentaron a reflujo durante 1,5 horas. Luego la temperatura se ajustó a TA. Las mezclas se acidificaron utilizando HOAc y los precipitados se filtraron. Los licores madre se concentraron. Los derivados de 2H,3H,5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-iona en bruto se usaron sin purificación en la siguiente etapa.

Una mezcla de los correspondientes derivados de 2H,3H,5H-[1,2,4] triazino[5,6-b]indol-3-iona (0,1 mmol) e hidrato de hidrazina (10 ml) se sometió a reflujo durante 4 h. Al enfriar se formó un precipitado y se separó por filtración. El precipitado se lavó con THF y éter dietílico y se secó a temperatura ambiente. Los intermediarios de 5H-[1,2,4] triazino[5,6-b]indol-3-ilhidracina se usaron sin purificación adicional.

Ejemplo 2. Procedimiento general para la preparación de compuestos de la invención 1-8.

El correspondiente intermediario 5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ilhidracina (0,1 mmol) se suspendió en ácido acético al 5% en agua (1 ml) y se calentó a 50 °C. A la suspensión tibia se le añadió 2-acetilpiridina (0,50 ml) y la reacción se mantuvo a 50 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró. Los productos sólidos se lavaron a fondo con EtOH y se secaron a temperatura ambiente.

2-[(1E)-1-(2-{7-cloro-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il}hidrazin-1-iliden)etil]piridina (compuesto 1). Pureza 98% (isómero principal); CL/EM: tr 1,7760 (isómero principal), 1,945 (isómero menor), EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 338 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-{6-cloro-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il}hidrazin-1-iliden)etil]piridina (compuesto 2). Pureza 96% (isómero principal); CL/EM: tr 1,667 (isómero principal), 1,868 (isómero menor), EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 338 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-{8-metoxi-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il}hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 3). Pureza 99%; CL/EM: tr 1,661 (isómero principal); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 334 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-{8-(trifluorometoxi)-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il}hidrazin-1-iliden)etil]piridina (compuesto 4). Pureza

99% (isómero principal); CL/EM: tr 1,996 (isómero principal), 2,166 (isómero menor); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 388 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-(6,8-dimetil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 5). Pureza 92% (isómero principal); CL/EM: tr 2,016 (isómero principal), 1,878 (isómero menor); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 332 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-(9-bromo-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 6). Pureza 99% (isómero principal); CL/EM: tr 1,744 (isómero principal), 1,927 (isómero menor); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 383/385 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-(8-cloro-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 7). Pureza 98%; CL/EM: tr 1,800; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 338/340 [M⁺H]⁺.

2-[(1E)-1-(2-(9-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 8). Pureza 92% (isómero principal); CL/EM: tr 1,790 (isómero principal), 1,941 (isómero menor); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 318 [M⁺H]⁺.

Ejemplo 3 Procedimiento para la preparación de compuestos de la invención 9 y 10

A una suspensión agitada de 3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol (20 mg, 0,09 mmol) en ácido acético al 5% en agua (0,67 ml) se añadió la cetona correspondiente (0,47 mmol) y la reacción se agitó a 50 °C durante el tiempo especificado a continuación). Después de enfriar, se añadió agua (1 ml), el precipitado se filtró y se lavó con agua/acetoneitrilo 1:1 y 2:1 o con dietil éter.

2-[(1E)-1-(2-(6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazin-1-iliden)propil]-piridina (compuesto 9). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 1 h 15 min. Se formó un precipitado y se lavó con éter dietílico para proporcionar el compuesto del título con una pureza del 99%, Método B, CL/EM: RT 1,851 (isómero principal), 1,982 (isómero menor); EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 332 [M⁺H]⁺.

2-(3,3-Dimetil-N-(6-metil-5H-[1,2,4] triazino[5,6-b] indol-3-) butanohidraconoil) piridina (compuesto 10). La reacción se agitó a 50 ° C durante 2 horas y luego a 60 ° C durante la noche y finalmente a 80 ° C durante 3 días. Los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con éter dietílico y acetoneitrilo para dar el producto del título con una pureza del 90%, Método B, CL/EM: tr 2,25, EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 374 [M⁺H]⁺.

Ejemplo 4. Procedimiento para la preparación de 2- y 3-[(1Z)-1-(2-(8-metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol-2-il) hidrazin-1-iliden)etil]piridinas

2,6-dicloro-3-(3-metil-2-nitrofenil)piridina. En un vial de microondas, se disolvieron 270 mg de 2-nitro-3-bromotolueno (1,25 mmol) y 240 mg de ácido 2,6-dicloro-piridina-3-bórico (240 mg) en 4 ml de una mezcla de disolventes. (1,4-dioxano/H₂O, 4: 1), al que se añadió carbonato de potasio (345 mg), seguido de la adición de 28 mg de tetrakis Pd(PPh₃)₄ (0,025 mmol), se desgasificó con nitrógeno durante 5 min. un reactor de microondas a 100 °C durante 15 min, y se evaporó para eliminar la mayor parte del disolvente. El residuo se disolvió en 50 ml de acetato de etilo, se lavó con 3 x 10 ml de salmuera y se secó sobre MgSO₄. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (heptano/acetato de etilo, 85:15). El compuesto del título puro (99 mg, 28%) se obtuvo como un polvo blanco. CL/EM: tr 1,803; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 283 [M⁺H]⁺.

2-(2,6-Dicloropiridin-3-il)-6-metil-anilina. En un matraz de vidrio, se disolvieron 282 mg de 2,6-dicloro-3-(3-metil-2-nitrofenil)piridina (1 mmol) en 20 ml de metanol, luego se añadió 325 mg de polvo de zinc (5 mmol) y 570 µl de ácido acético (10 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, luego a 75 °C durante 1 h. Una vez finalizada la reacción, la mezcla de reacción se filtró para eliminar el precipitado, y el precipitado se lavó con 20 ml de metanol, luego se evaporó para eliminar la mayor parte del disolvente. El residuo se disolvió en acetato de etilo y salmuera, y se purificó por cromatografía (heptano/acetato de etilo, 90:10). CL/EM: tr 1,734; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 253 [M⁺H]⁺.

2-cloro-8-metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol. 2-(2,6-Dicloropiridin-3-il)-6-metil-anilina (154 mg, 0,61 mmol), 59 mg de yodato de cobre, 70 mg de L-prolina (0,61 mmol) y 398 mg de Cs₂CO₃ (1,22 mmol) se mezclaron con 8 ml de DMF, se calentaron a 90 °C durante 1 h, luego a 100 °C durante 5 h, se diluyeron con acetato de etilo y se lavaron con salmuera para eliminar la mayor parte del DMF y la base. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (heptano/acetato de etilo 90:10), rendimiento 49 mg. CL/EM: tr 1,730; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 217 [M⁺H]⁺.

2-Hidrazinil-8-metil-8H, 8aH, 9H-pirido[2,3-b]indol. Se suspendió 2-cloro-8-metil-8H, 8aH, 9H-pirido[2,3-b]indol, (33 mg, 0,15 mmol) en 0,8 ml de hidruro de hidrazina y se agitó a 85 °C durante el fin de semana. El material de partida se había convertido completamente. La mezcla se enfrió para formar un precipitado. El producto bruto se separó por filtración para proporcionar 21 mg del compuesto del título bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación. CL/EM: tr 1,320; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 213 [M⁺H]⁺.

3-[(1Z)-1-(2-(8-Metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol-2-il)hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 19). Se suspendió 2-

hidrazinil-8-metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol (10 mg, 0,05 mmol) en 0,5 ml de ácido acético al 5% que comprende 27 μ l de 3-acetil piridina y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego a 50 °C durante otros 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, el precipitado que se había formado se recogió y se purificó por HPLC prep., (columna C18, gradiente de metanol al 45-85% en NH_4HCO_3 10 mM (pH 10), 25 ml/min). El compuesto del título (1 mg) se obtuvo con una pureza del 90%. CL/EM: A, tr 1,674, B tr 2,34; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 316 [M⁺H]⁺.

2-[(1Z)-1-(2-{8-Metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol-2-il}hidrazin-1-iliden)etil]-piridina (compuesto 11). Se suspendió 2-hidrazinil-8-metil-8H,8aH,9H-pirido[2,3-b]indol (10 mg, 0,05 mmol) en una mezcla de 0,5 ml de ácido acético al 5% y 28 μ l de 2-acetil piridina, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La temperatura se elevó a 50 °C y la mezcla se agitó durante otros 30 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente. Se formó un precipitado, que se purificó por HPLC. prep., (columna C18, gradiente de metanol al 45-85% en NH_4HCO_3 10 mM (pH 10), a 25 ml/min). El compuesto del título (1 mg) se obtuvo con una pureza del 95%. CL/EM: A, tr 1,805, B, tr 2,608; EM ESI⁺/EM ESI⁺ em/z 316 [M⁺H]⁺.

Abreviaturas: ACN, acetonitrilo; DCM, diclorometano; DMF, dimetilformamida; tr, tiempo de retención; TA, temperatura ambiente; CL, cromatografía líquida; IS, índice de supervivencia

Ejemplo 5. Cultivo celular, generación de MCS y determinación de la citotoxicidad in vitro

Las células de carcinoma de colon HCT116 se mantuvieron en medio modificado con 5A de McCoy/suero de ternera fetal al 10% a 37 °C en CO_2 al 5%. Los MCS se prepararon utilizando una modificación del método de Herrmann R et al., Selección de compuestos que inducen la apoptosis de células cancerosas cultivadas como esferoides multicelulares. *J biomol Screen* 2008; 13: 1-8. Se añadió una suspensión celular que contenía 10.000 células (200 μ l) a cada pocillo de placas de 96 pocillos recubiertas con poli-HEMA. Luego, los pozos se llenaron en exceso al agregar 170 μ l adicionales de medio para adquirir una curvatura de superficie convexa. Se colocaron separadores de plastilina (3 mm) en las esquinas de cada placa para evitar que las tapas tocaran el medio. Las placas se invirtieron luego para permitir que las células se sedimentaran a la interfaz líquido/aire y se incubaron con agitación suave. Después de 24 h de incubación, las placas volvieron a la normalidad. Primero se eliminó el exceso de medio por aspiración y luego los separadores de plastilina. Las placas se incubaron durante 4 días antes del tratamiento con fármaco. Después de 24 horas de tratamiento con fármaco, se añadió NP40 al medio de cultivo a una concentración del 0,1% para extraer K18 escindido de caspasa de MCS e incluir material liberado al medio de células muertas. La queratina-18 escindida de caspasa (K18-Asp396) se determinó usando 25 ml de medio/extracto usando el ensayo ELISA CytoDeath M30 (una variante del ELISA M30-Apoptosense® (Hägg M et al., Un nuevo ensayo de alto rendimiento para detección de fármacos proapoptóticos. *Invest New Drugs* 2002; 20: 253-9) desarrollado para uso in vitro (Peviva AB, Bromma, Suecia)). Las mediciones de la viabilidad se realizaron mediante el método de la fosfatasa ácida (APH) descrito por Friedrich et al., Una herramienta confiable para determinar la viabilidad celular en el cultivo complejo 3-d: el ensayo de la fosfatasa ácida. *J Biomol Screen* 2007; 12: 92537. Se restó la actividad de fondo. La citotoxicidad de los compuestos de la invención (Figs. 1a-11) y de compuestos relacionados estructuralmente no comprendidos en la invención (Figs. 2a-2h) se determinó en el modelo de células de carcinoma de colon HCT116 y se expresó mediante el índice de supervivencia de las células en dependencia de la concentración de compuestos.

Ejemplo 6. El compuesto de la invención exhibe citotoxicidad in vivo.

El compuesto de la invención (compuesto 11) se inyectó por vía intravenosa en ratones NMRI. A la dosis máxima tolerada (DMT) de 16 mg/kg, se observó una concentración plasmática inicial de $\sim 100 \mu\text{M}$, > 10 veces la Cl_{50} de líneas celulares tumorales y células de cáncer colorrectal primario del paciente in vitro. El compuesto se distribuyó rápidamente y finalmente se eliminó con una vida media de 4-5 h. La toxicidad sistémica del compuesto de la invención es baja. Las dosis de hasta 4,5 mg/kg no produjeron cambios notables en los parámetros plasmáticos del animal, como la ALT hepática, la glucosa en sangre y la proteína total, ni impidieron que los animales aumentaran de peso.

Ejemplo 7. El compuesto de la invención es un quelante de hierro permeable a las células.

Para comprobar si la actividad citotóxica del compuesto de la invención depende del agotamiento del hierro, se añadió cloruro de hierro a las células HCT116 antes de la adición del compuesto de la invención. Se descubrió que el cloruro de hierro anula totalmente el efecto del compuesto de la invención, tanto en las células HCT116 que expresan wtp53 como en las células HCT116 en las que el gen p53 se ha roto.

Ejemplo 8 Composición farmacéutica.

El compuesto de la invención se disuelve en un disolvente orgánico, por ejemplo, metanol, que comprende al menos 2 equivalentes molares de ácido clorhídrico. Al agregar un segundo solvente, por ejemplo etanol, el diclorhidrato del compuesto precipita de la solución como tal o como un complejo con el solvente precipitante, por ejemplo como

5 compuesto•2 HCl•EtOH. El complejo de diclorhidrato/etanol es una realización preferida del compuesto de la invención para uso en una composición farmacéutica. Se utiliza preferentemente en forma de crioprecipitado. Si se desea, el crioprecipitado puede incorporarse en un comprimido en combinación con excipientes farmacéuticos en polvo estándar, como manitol, almidón y microcelulosa. Los excipientes deben ser de baja basicidad. Cuando se suspenden en agua, no deben elevar el pH por encima de 7,0, sino que deben proporcionar un pH de 5,0 a 7,0.

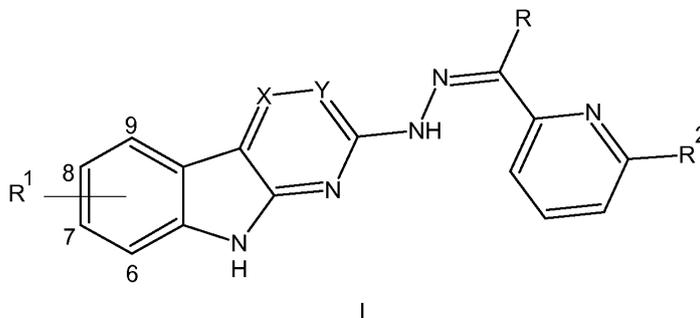
10 Se llevaron a cabo estudios de estabilidad a temperatura ambiente con 0,1 mg/L a 15 mg/L del complejo de diclorhidrato/etanol en manitol acuoso al 5% (para proporcionar isotonicidad). Se encontró que las soluciones más débiles se degradaban más rápidamente. Por ejemplo, aproximadamente el 2,5% del compuesto 11 se degrada después del almacenamiento durante 100 h de una solución que comprende 15 mg de compuesto por litro, mientras que aproximadamente el 5% del compuesto se degrada en una solución que comprende 2 mg de compuesto por litro, y aproximadamente 1/3 del compuesto en una solución que comprende 0,1 mg de compuesto por litro. LA HPLC revela la formación de una serie de productos de degradación.

15 Referencias

1. Eshba et al. Síntesis de algunos derivados de 1,2,4-triazino[5,6-b]indol sustituidos como posibles agentes antivirales y anticancerígenos. Pharmazie vol. 42, n ° 10, 1987; 664-666.
 2. Herrmann et al. "Selección de compuestos que inducen la apoptosis de células cancerosas cultivadas como esferoides multicelulares", Journal of biomolecular screening, vol. 13, no. 1, 1 (2008), páginas 1-8.
- 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. El compuesto citotóxico de fórmula general I, en donde R es H o metilo o metileno sustituido con alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, metoxi, metoxi sustituido por uno a tres flúor, halógeno; R² es H o alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado; X es CH o N; Y es CH o N; R no comprende H o metilo si R¹ es H o alquilo C₁-C₄, R² es H o alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, X es N e Y es N.



- 10 2. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en R = H, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = CH; R = CH₂C(CH₃)₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N; R = CH₂CH₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N.
3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que R = CH₂C(CH₃)₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N.
- 15 4. El compuesto de la reivindicación 2, en el que R = CH₂CH₃, R¹ = 6-CH₃, R² = H, X e Y = N.
5. Una mezcla de isómeros cis, trans del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una sal farmacéuticamente aceptable, complejo sal/solvente, complejo metálico, excepto uno con cualquiera de Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, complejo solvente del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 6 seleccionada de clorhidrato y diclorhidrato.
8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 6-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la sal farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 6-7, o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de un tumor de cáncer sólido en una persona.
- 30 10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la sal farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 6-7, o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso de acuerdo con la reivindicación 9 en una dosis farmacológicamente efectiva.
- 35 11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la sal farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 6-7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde se priva al tumor de glucosa antes de la administración.

