

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 702**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/50** (2007.01)

**C07F 9/38** (2006.01)

**C07C 335/04** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2015 PCT/EP2015/077279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16079327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015 E 15801727 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3237015**

54 Título: **Derivados hidroxibisfosfónicos hidrosolubles de la doxorubicina**

30 Prioridad:

**20.11.2014 FR 1461253**

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

**20.02.2020**

73 Titular/es:

**ATLANTHERA (100.0%)  
3, rue Aronnax  
44800 Saint Herblain, FR**

72 Inventor/es:

**EGOROV, MAXIM;  
GOUJON, JEAN-YVES;  
LE BOT, RONAN y  
DAVID, EMMANUELLE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 743 702 T3

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

## DESCRIPCIÓN

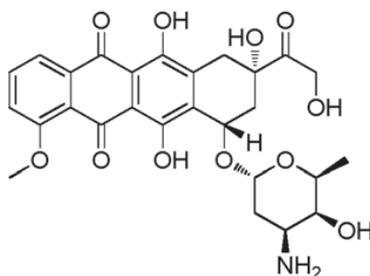
Derivados hidroxibisfosfónicos hidrosolubles de la doxorrubicina

5 La presente invención se refiere a derivados hidroxibisfosfónicos hidrosolubles de la doxorrubicina que actúan sobre el tejido óseo, específicamente para su uso como medicamento, en particular en el tratamiento de un tumor óseo, a los procedimientos de síntesis de los mismos y a las composiciones farmacéuticas que comprenden tales derivados.

10 El tejido óseo es un tejido conjuntivo en continua remodelación compuesto por cristales de hidroxiapatita, una matriz extracelular y células especializadas (osteoblastos y osteoclastos). Cualquier alteración del equilibrio entre los fenómenos de aposición y resorción ósea lleva a patologías osteolíticas u osteocondensantes que pueden ser de naturaleza tumoral (con tumores primarios, como el osteosarcoma, o secundarios, como las metástasis óseas). Los osteosarcomas son tumores óseos muy agresivos con aposiciones periósticas, destrucción de la cortical e invasión de los tejidos blandos. El osteosarcoma aparece por lo general en la población joven (con una media de edad de 18 años) y representa el 5 % de los cánceres infantiles. Estos tumores tienen la particularidad de establecer un círculo vicioso entre la osteólisis y la proliferación tumoral. El tratamiento actual de estos tumores consiste en una quimioterapia preoperatoria, seguida de una extirpación quirúrgica del tumor y después una quimioterapia posoperatoria, lo que permite una supervivencia de los pacientes de 5 años del 60-70 %, aunque solamente del 30 % cuando se detectan metástasis pulmonares. Frente a estas tasas de supervivencia bastante mediocres, parece necesario el desarrollo de nuevas terapias para los osteosarcomas.

25 Los derivados del ácido hidroxibisfosfónico (HBP) son moléculas conocidas por su gran afinidad por el tejido óseo y su propiedad de inhibición de la resorción ósea (Moriceau *et al.*, *Curr Pharm Des.* 2010, 16(27), 2981). La doxorrubicina es uno de los productos esenciales usados en la terapia de los tumores óseos. No obstante, la toxicidad de la doxorrubicina limita considerablemente su uso. El interés de asociar químicamente la doxorrubicina a un HBP es doble. La vectorización debe permitir dirigir la actividad antitumoral de la doxorrubicina al nivel del sitio óseo (y tratar así más eficazmente el tumor) disminuyendo la concentración circulante (lo que permite disminuir su toxicidad). El vector HBP puede mejorar al mismo tiempo el tratamiento de osteólisis tumoral debido a su efecto antirresortivo.

30



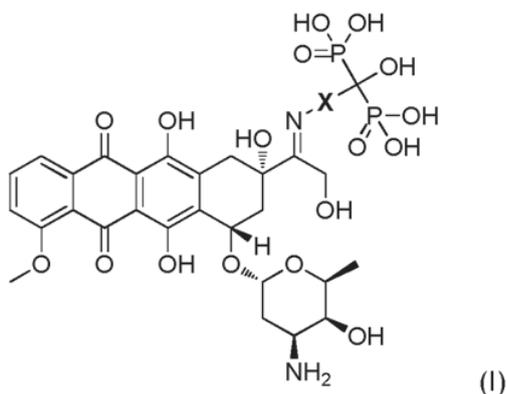
**Doxorrubicina**

35 La solicitud WO 2012/130911 describe en particular este planteamiento de asociación química de un vector con principios activos, entre ellos la doxorrubicina, sobre un vector que lleva una función HBP mediante un enlace imina. No obstante, el producto descrito en la solicitud WO 2012/130911 que lleva un resto doxorrubicina (modificado o no) acoplado a un vector HBP se ha demostrado que es insoluble (o muy poco soluble en su forma modificada) en agua, incluso con aditivos orgánicos (por ejemplo, Tween®, PEG, glicerina, glucosa) o minerales (por ejemplo, carbonato o bicarbonato de sodio), y en disolventes orgánicos (por ejemplo, etanol o dimetilsulfóxido) lo que hace difícil el uso de este producto como medicamento.

40

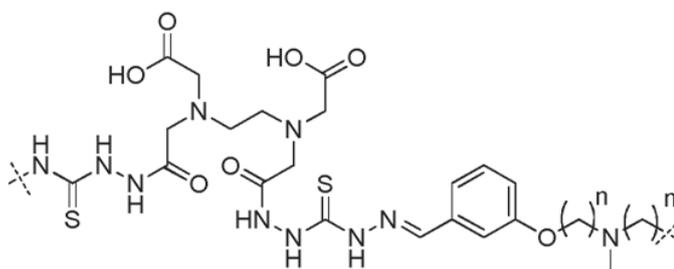
Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar nuevos derivados de doxorrubicina acoplados a un vector HBP que sean solubles en agua a fin de permitir su uso como medicamento.

45 La presente invención se refiere, por tanto, a un derivado hidroxibisfosfónico de la doxorrubicina con la siguiente fórmula general (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X representa un grupo bivalente seleccionado entre:

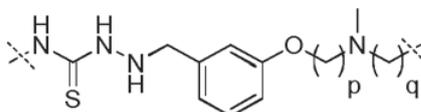
5 (1)



con n y m que representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero comprendido entre 1 y 6, en particular entre 1 y 4,

10

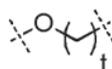
(2)



con p y q que representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero comprendido entre 1 y 6, en particular entre 1 y 4, y

15

(3)



20 con t que representa un número entero comprendido entre 1 y 6, en particular entre 1 y 4,

estando unidos estos grupos a la función imina del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de nitrógeno o de oxígeno terminal de los mismos y a la función ácido hidroxibisfosfónico del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de carbono terminal de los mismos.

25

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención, por tanto, permiten una vectorización de la doxorubicina (agente antitumoral) con un vector hidroxibisfosfónico que se dirige al tejido óseo. El tipo de unión de la doxorubicina y la naturaleza del vector se adaptan especialmente para asegurar la solubilidad elevada de los compuestos en agua a fin de facilitar su uso clínico.

30

En la presente invención, por "farmacéuticamente aceptable" se pretende designar lo que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no indeseable ni biológicamente ni de otro modo y que es adecuada para un uso veterinario al igual que farmacéutico humano.

35

Por "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto se pretende designar una sal que es farmacéuticamente aceptable, tal como se define en el presente documento, y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto precursor.

40

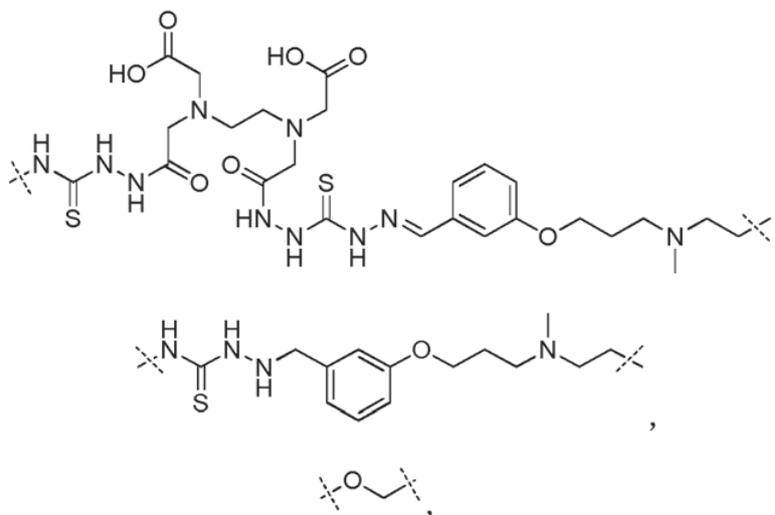
Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden específicamente:

(1) las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables formadas con ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como el ácido acético, el ácido bencenosulfónico, el ácido benzoico, el ácido canforsulfónico, el ácido cítrico, el ácido etanosulfónico, el ácido fumárico, el ácido glucoheptónico, el ácido glucónico, el ácido glutámico, el ácido glicólico, el ácido hidroxinaftoico, el ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, el ácido láctico, el ácido maleico, el ácido málico, el ácido mandélico, el ácido metanosulfónico, el ácido mucónico, el ácido 2-naftalenosulfónico, el ácido propiónico, el ácido salicílico, el ácido succínico, el ácido dibenzoil-L-tartárico, el ácido tartárico, el ácido p-toluenosulfónico, el ácido trimetilacético, el ácido trifluoroacético y similares, y

(2) las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor es sustituido por un ion metálico, por ejemplo, un ion de un metal alcalino (por ejemplo, Na, K, Li o Cs), un ion de un metal alcalinotérreo (por ejemplo, Ca, Mg) o un ion de aluminio; o bien se coordina con una base orgánica farmacéuticamente aceptable tal como la dietanolamina, la etanolamina, la N-metilglucamina, la trietanolamina, la trometamina y similares; o con una base inorgánica farmacéuticamente aceptable tal como el hidróxido de aluminio, el hidróxido de calcio, el hidróxido de potasio, el carbonato de sodio, el bicarbonato de sodio, el hidróxido de sodio y similares.

Así, n, m, p, q y t representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en particular igual a 1, 2, 3 o 4.

De acuerdo con una realización particular de la invención, n = 3, m = 2, p = 3, q = 2 y t = 1. Así, ventajosamente, X representa un grupo seleccionado entre:



y estando unidos estos grupos a la función imina del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de nitrógeno o de oxígeno terminal de los mismos y a la función ácido hidroxibisfosfónico del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de carbono terminal de los mismos.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre los compuestos II), (III), (IV) descritos en la parte experimental que sigue a continuación en el presente documento y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención se refiere igualmente a un compuesto de fórmula (I) tal como se describe anteriormente en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento, en particular para actuar sobre el tejido óseo.

La presente invención se refiere también al uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se describe anteriormente en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica que actúa más particularmente sobre el tejido óseo.

En particular, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento de un tumor óseo.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento de un tumor óseo que comprende la administración a una persona que lo necesite de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) tal como se describe anteriormente en el presente documento, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El tumor óseo puede ser en particular un tumor óseo primitivo tal como un osteosarcoma, un condrosarcoma, un tumor de células gigantes o un sarcoma de Ewing; metástasis óseas; o un mieloma múltiple.

5 La presente invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) tal como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Esta composición se puede formular para permitir su administración, particularmente por vía parental (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular), es decir, preferentemente en forma de una solución inyectable, y se puede destinar a los mamíferos, incluido el hombre.

15 La solución que se va a inyectar se puede encontrar en forma de suspensiones acuosas, soluciones salinas isotónicas o soluciones estériles e inyectables que contienen agentes de dispersión y/o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables.

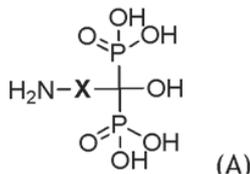
20 La posología variará en función del tratamiento y en función de la enfermedad en cuestión. Los compuestos de la invención como principios activos se pueden usar en particular en dosis comprendidas entre 0,01 mg y 5000 mg al día, administrados en una sola dosis al día o administrados en varias dosis a lo largo del día, por ejemplo dos veces al día en dosis iguales. Puede ser necesario usar dosis fuera de estos intervalos, lo que será obvio para el experto en la técnica.

25 La presente invención tiene también por objeto una composición farmacéutica tal como se define anteriormente en el presente documento para su uso en el tratamiento de un tumor óseo, particularmente tal como se define anteriormente en el presente documento.

30 La presente invención se refiere igualmente a procedimientos de preparación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención.

Un primer procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a) reacción de la doxorubicina o una sal de la misma con un compuesto con la fórmula (A) siguiente:



35 o una sal del mismo, en la que X es tal como se define anteriormente en el presente documento, para dar un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención, y

40 (b) opcionalmente salificación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (a) anterior para dar una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Etapas (a):

45 La doxorubicina se puede usar en particular en forma de su sal clorhidrato.

El compuesto de fórmula (A) se puede preparar tal como se describe en la parte experimental que sigue a continuación en el presente documento.

50 El acoplamiento entre la doxorubicina (A) o una sal de la misma y el compuesto de fórmula (A) o una sal del mismo se puede efectuar en un disolvente seleccionado entre tetrahidrofurano (THF), metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), agua y mezclas de los mismos, particularmente en una mezcla agua/THF. Este acoplamiento se puede realizar a una temperatura comprendida entre 0 y 80 °C, en particular a temperatura ambiente.

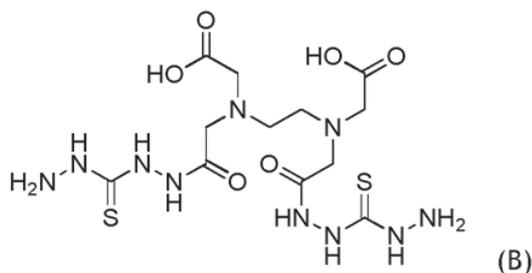
55 Por "temperatura ambiente" se entiende, en el contexto de la presente invención, una temperatura comprendida entre 15 y 40 °C, preferentemente entre 20 y 30 °C, particularmente de aproximadamente 25 °C.

Etapas (b):

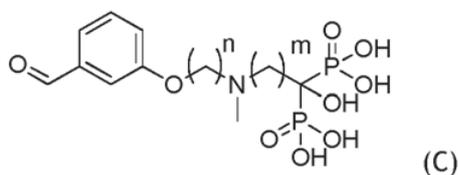
60 La salificación del compuesto de fórmula (I) se podrá llevar a cabo mediante la reacción del compuesto de fórmula (I) con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable.

Un segundo procedimiento destinado a preparar compuestos de fórmula (I) para los cuales X representa un grupo (1) comprende las etapas siguientes:

- 5 (i) reacción de acoplamiento de un compuesto con la fórmula (B) siguiente:



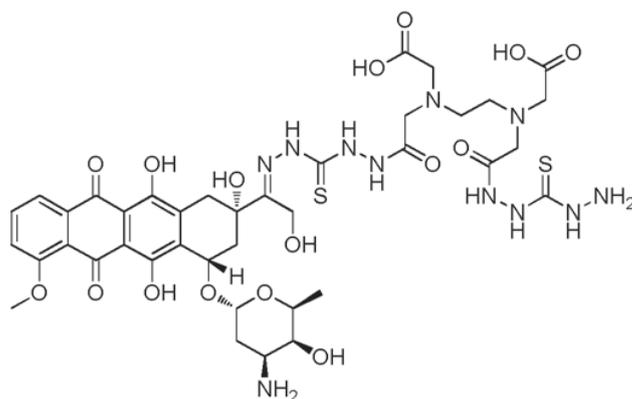
- 10 o una sal del mismo,  
con un compuesto con la fórmula (C) siguiente:



- 15 o una sal del mismo,  
en la que n y m son tal como los definidos previamente,  
y la doxorubicina o una sal de la misma,  
efectuando la reacción de acoplamiento en una sola etapa en presencia del compuesto de fórmula (B) o de  
una sal del mismo, del compuesto de fórmula (C) o de una sal del mismo y de la doxorubicina o de una sal  
de la misma, o en dos etapas mediante acoplamiento previo del compuesto de fórmula (B) o de una sal del  
20 mismo con la doxorubicina o una sal de la misma antes de efectuar el acoplamiento con el compuesto de  
fórmula (C) o una sal del mismo, o mediante acoplamiento previo del compuesto de fórmula (B) o de una sal  
del mismo con el compuesto de fórmula (C) o una sal del mismo antes de efectuar el acoplamiento con la  
doxorubicina o una sal de la misma,  
25 para dar un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención para el cual X representa un grupo (1), y  
(ii) opcionalmente salificación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (i) anterior para dar una sal  
farmacéuticamente aceptable del mismo.

Etapas (i):

- 30 La doxorubicina se puede usar en particular en forma de su sal clorhidrato.
- El compuesto de fórmula (B) se puede preparar tal como se describe en la parte experimental que sigue a  
continución en el presente documento mediante reacción de la tiocarbhidrazida (compuesto 2) con dianhídrido  
35 etilendiaminotetraacético (compuesto 1).
- El compuesto de fórmula (C) se puede preparar tal como se describe en la solicitud WO 2012/130911. Se puede  
usar en particular en forma de sal disódica.
- 40 De acuerdo con una primera variante, los compuestos de fórmulas (B) y (C) y la doxorubicina o una sal de los  
mismos se hacen reaccionar todos juntos para dar un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención para el  
cual X representa un grupo (1) (reacción de acoplamiento en 1 etapa).
- 45 De acuerdo con una segunda variante (reacción de acoplamiento en 2 etapas), el compuesto de fórmula (B) o una  
sal del mismo se hace reaccionar con la doxorubicina o una sal de la misma en una primera etapa para dar el  
compuesto intermedio con la fórmula (D) siguiente:

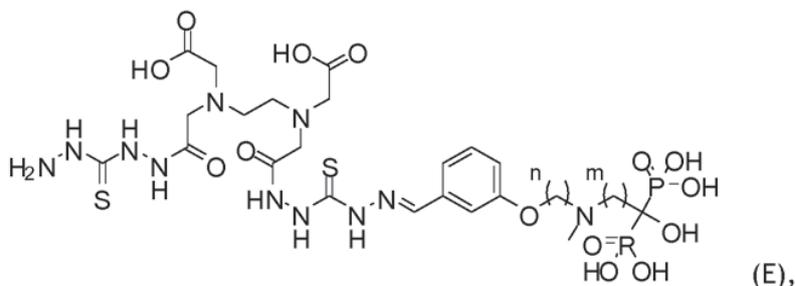


Este compuesto de fórmula (D) se hace reaccionar después con el compuesto de fórmula (C) o una sal del mismo en una segunda etapa para dar un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención para el cual X representa un grupo (1).

5

De acuerdo con una tercera variante (reacción de acoplamiento en 2 etapas), el compuesto de fórmula (B) o una sal del mismo se hace reaccionar con el compuesto de fórmula (C) o una sal del mismo en una primera etapa para dar el compuesto intermedio con la fórmula (E) siguiente:

10



en la que n y m son tal como se han definido previamente.

Este compuesto de fórmula (E) se hace reaccionar después con la doxorubicina o una sal de la misma en una segunda etapa para dar un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención para el cual X representa un grupo (1).

15

Las reacciones de acoplamiento mencionadas anteriormente en el presente documento en las tres variantes se pueden efectuar en un medio ácido, particularmente en presencia de ácido trifluoroacético. Se puede usar un disolvente seleccionado entre tetrahidrofurano, metanol, dimetilsulfóxido, agua y mezclas de los mismos, particularmente una mezcla THF/agua. Este acoplamiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente.

20

Por "temperatura ambiente" se entiende, en el contexto de la presente invención, una temperatura comprendida entre 15 y 40 °C, preferentemente entre 20 y 30 °C, particularmente de aproximadamente 25 °C.

25

Etapas (ii):

La salificación del compuesto de fórmula (I) se puede llevar a cabo mediante la reacción del compuesto de fórmula (I) con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable.

30

El compuesto obtenido mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento se puede separar del medio de reacción mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica tal como, por ejemplo, mediante extracción, evaporación del disolvente o incluso mediante precipitación y filtración.

35

Por otro lado, el compuesto se puede purificar si es necesario mediante técnicas bien conocidas por el experto en la técnica tal como mediante recristalización o precipitación si el compuesto es cristalino, mediante cromatografía en columna (por ejemplo, de gel de sílice, opcionalmente pudiendo estar modificada la sílice para hacerla hidrófoba en particular tal como en una columna C18 o C8) o, incluso, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

40

La presente invención tiene también por objeto un compuesto de fórmula (A) o (B) tal como se define anteriormente en el presente documento o una sal del mismo, tal como una sal farmacéuticamente aceptable definida previamente en el presente documento.

Este compuesto se puede seleccionar en particular entre los compuestos 4, 7, 13 descritos en la parte experimental que sigue a continuación en el presente documento y las sales de los mismos, tales como sales farmacéuticamente aceptables definidas previamente en el presente documento.

- 5 Tales compuestos son útiles como intermedios de síntesis, en particular para preparar los compuestos de fórmula (I) tales como los definidos previamente en el presente documento.

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos no limitantes que siguen a continuación.

10 **Figuras**

La **Figura 1** representa la evolución en función del tiempo del volumen tumoral medio (mm<sup>3</sup>) de un tumor HOS desarrollado en ratones en los grupos de control (CT), compuesto (II), compuesto (III), doxorubicina, vector 5, y doxorubicina + vector 5.

- 15 La **Figura 2** representa las radiografías del día 27 de las patas tumorales de 10 ratones de cada uno de los grupos de control (CT), compuesto (II) y compuesto (III).

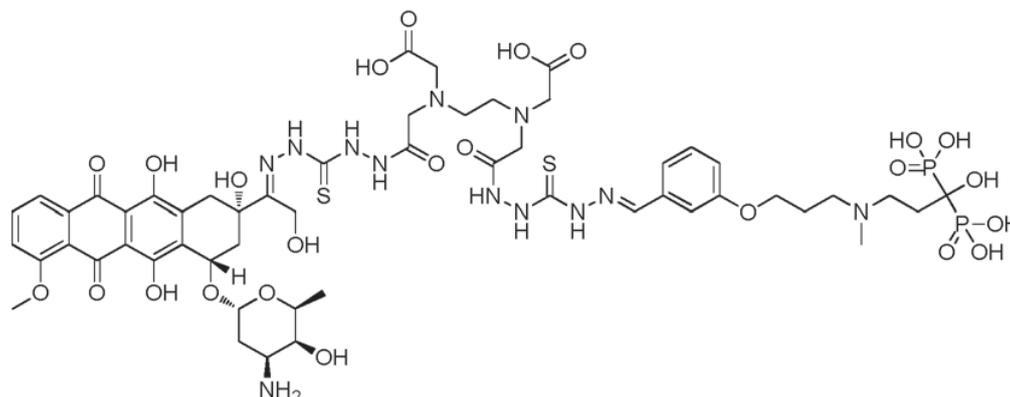
**Ejemplos**

20 Abreviaturas utilizadas:

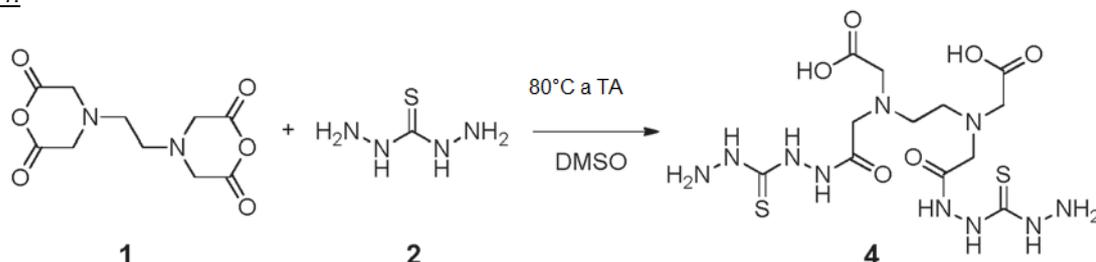
- DMSO : Dimetilsulfóxido  
 DPBS : Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco  
 EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético  
 25 ES : Electropulverización  
 HPLC : Cromatografía líquida de alto rendimiento  
 MS : Espectrómetro de masas  
 Rdto : Rendimiento  
 RMN : Resonancia magnética nuclear  
 30 sat : Saturado  
 TA : Temperatura ambiente  
 TFA : Ácido trifluoroacético  
 THF : Tetrahidrofurano  
 TRIS : 2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol  
 35

**1. Síntesis de compuestos de acuerdo con la invención**

Compuesto (II):

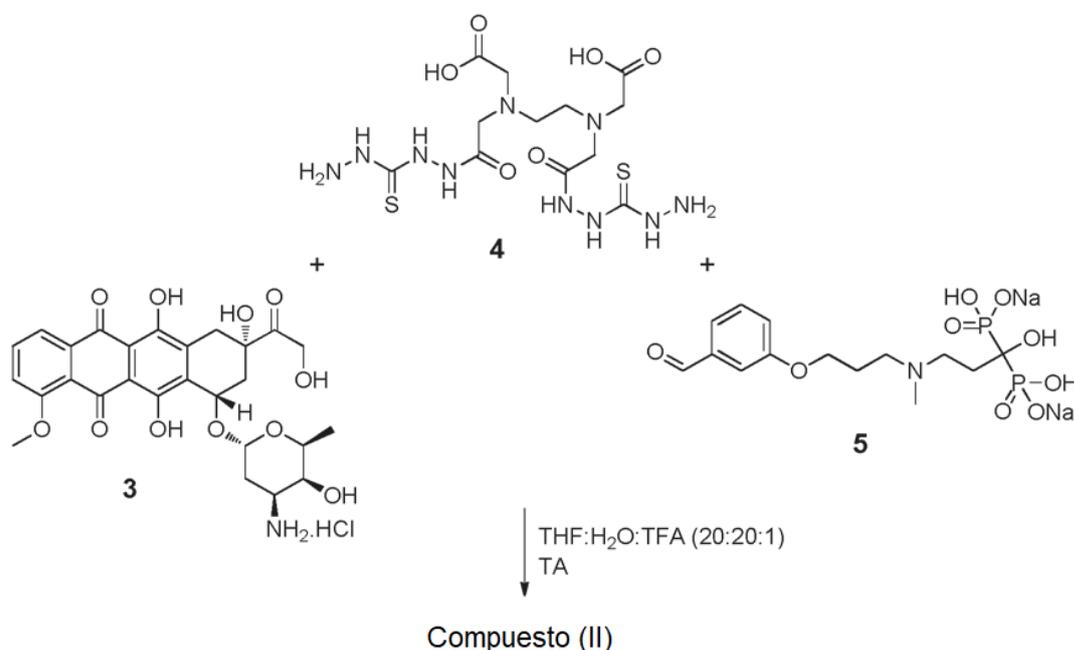


40 Etapa 1:



El compuesto **1** (3 g, 11,7 mmol) se solubiliza en DMSO (15 ml) a 80 °C y después se añade a una solución de compuesto **2** (5 g, 47,2 mmol) en DMSO (30 ml) a 80 °C. La solución transparente obtenida se agita 3 h a TA. La mezcla de reacción se diluye con una mezcla de metanol (120 ml) y agua (120 ml). A la solución transparente obtenida se añade metanol (600 ml) con agitación seguido de éter dietílico (150 ml) y la agitación se continúa durante 5 min a TA. El precipitado obtenido se filtra y se lava con metanol, después se solubiliza completamente en 150 ml de agua a TA durante 15 min. A la solución obtenida se le añade de nuevo metanol (600 ml) seguido de éter dietílico (150 ml) y la agitación se continúa durante 5 min a TA. El precipitado obtenido se filtra, se lava con metanol seguido de éter dietílico y se seca después al vacío a TA. Se obtiene el compuesto **4** (3,2 g, rdt = 58 %). Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ, ppm: 3,87 (2H, s), 3,70 (2H, s), 3,24 (2H, s).

Etapa 2:



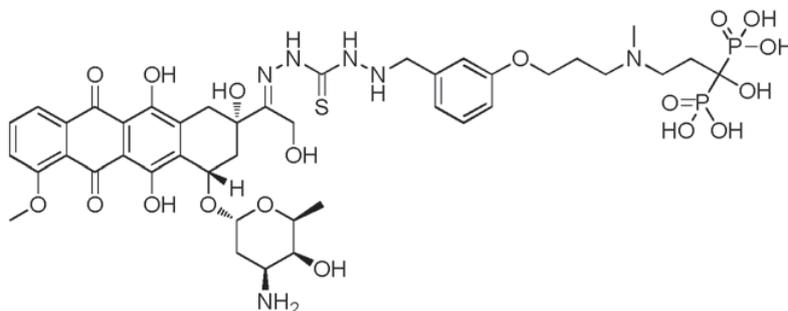
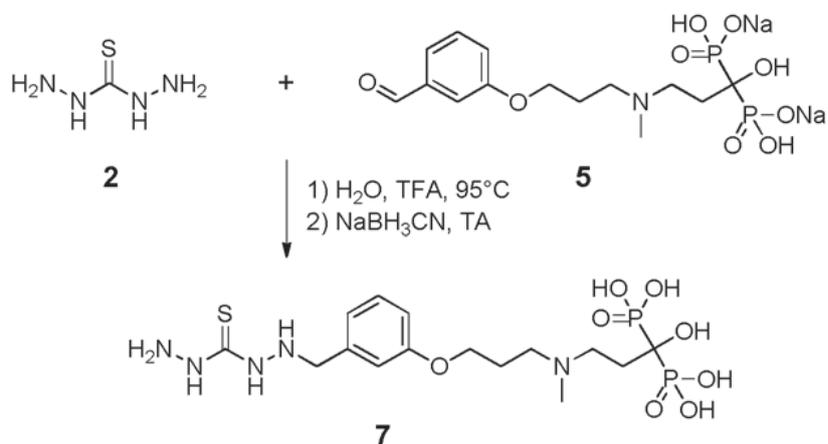
15 La síntesis del compuesto **5** se describe en la solicitud WO 2012/130911. En atmósfera de argón se añade de una vez una solución del compuesto **4** (1060 mg, 2,26 mmol) en 24 ml de la mezcla THF/H<sub>2</sub>O/TFA (20/20/1) a una solución de los compuestos **3** (918 mg, 1,58 mmol) y **5** (1028 mg, 2,26 mmol) en 24 ml de la mezcla THF/H<sub>2</sub>O/TFA (20/20/1). La solución de color rojo oscuro obtenida se agita a TA durante 16 h protegida de la luz. A continuación se añaden 360 ml de una mezcla Et<sub>2</sub>O/MeOH (5/1) a la solución manteniendo la agitación y la suspensión de precipitado rojo obtenido se agita durante 5 min a TA. El precipitado se filtra y se lava con Et<sub>2</sub>O y después se seca al vacío. El polvo rojo obtenido se solubiliza en 10 ml de mezcla NaHCO<sub>3</sub>sat : H<sub>2</sub>O (1:1) y la solución obtenida se introduce en una columna C18 y se eluye después con un gradiente de [600 ml de 3 % MeOH/H<sub>2</sub>O + 2 ml de 20 % NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O] a [600 ml de 50 % MeOH/H<sub>2</sub>O + 2 ml de 20 % NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O]. El producto final sale a partir de aproximadamente 450 ml de eluyente en aproximadamente 150 ml de eluyente. Las fracciones que contienen el producto final se evaporan al vacío hasta aproximadamente 10 ml de solución restante que se diluye seguidamente con MeOH (40 ml) seguido de Et<sub>2</sub>O (200 ml). La mezcla obtenida se agita hasta la formación de un precipitado rojo que se agita durante 5 min a TA, después se filtra, se lava con Et<sub>2</sub>O y se seca al vacío a TA. Se obtiene el compuesto (II) (526 mg, rdt = 23 %).

20

25

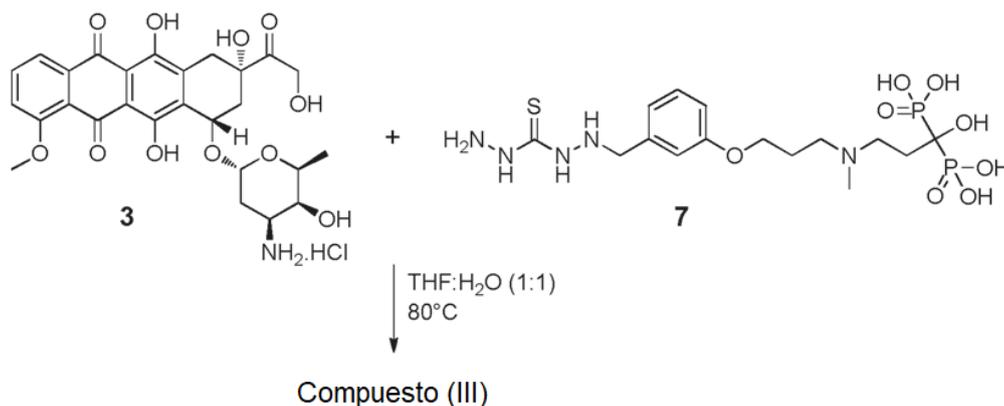
30 Espectro de RMN <sup>1</sup>H (1 % TFA-D/DMSO-D<sub>6</sub>, 400 MHz) δ, ppm: 14,07 (1H, s), 13,36 (1H, s), 11,97 (1H, s), 11,24 (1H, s), 10,53 (1H, s), 10,48 (1H, s), 10,30 (1H, s), 9,80 (1H, s), 8,05 (1H, s), 7,95 (2H, s), 7,84 (2H, m), 7,68 (1H, dd), 7,46 (1H, s), 7,40 (1H, d), 7,33 (1H, t), 7,02 (1H, d), 5,30 (1H, s), 4,99 (1H, s), 4,61 (1H, t), 4,5-3,7 (12H, m), 3,6-2,85 (14H, m), 3,01 (1H, d), 2,81 (3H, s), 2,27 (4H, m), 2,13 (2H, m), 1,85 (1H, t), 1,65 (1H, d), 1,18 (3H, d). Espectro de RMN <sup>31</sup>P (1 % TFA-D/DMSO-D<sub>6</sub>, 162 MHz) δ, ppm: 18,23. Espectro de masas (ES-) (m/z): [M-H]<sup>-</sup> 1386. Pureza mediante análisis HPLC (C18, H<sub>2</sub>O/EDTA/NH<sub>3</sub>-MeCN): 97 %.

35

Compuesto (III):5 Etapa 1:

El compuesto **5** (1 g, 2,2 mmol) se añade con agitación a una solución de compuesto **2** (1 g, 9,4 mmol) en agua (40 ml) a 95 °C. A la solución transparente obtenida se le añade TFA (0,8 ml) y la mezcla se agita 30 min a la misma temperatura. La mezcla se lleva a continuación a TA y se añade NaBH<sub>3</sub>CN (0,6 g, 9,5 mmol) y después se continúa la agitación durante 24 h a TA. La mezcla de reacción se introduce en una columna C18 que se eluye con un gradiente de [600 ml de 3 % MeOH/H<sub>2</sub>O] a [600 ml de 50 % MeOH/H<sub>2</sub>O]. El exceso de compuesto **2** se eluye después de aproximadamente 150 ml de eluyente y el producto final **7** se eluye después de aproximadamente 400 ml de eluyente en un volumen de aproximadamente 200 ml de eluyente. Las fracciones se evaporan al vacío hasta aproximadamente 10 ml de solución restante que se diluye seguidamente agitando con MeOH (200 ml) seguido de Et<sub>2</sub>O (300 ml). El precipitado obtenido se filtra, se lava con Et<sub>2</sub>O y se seca al vacío a TA. Se obtiene el compuesto **7** (780 mg, rdt = 71 %).

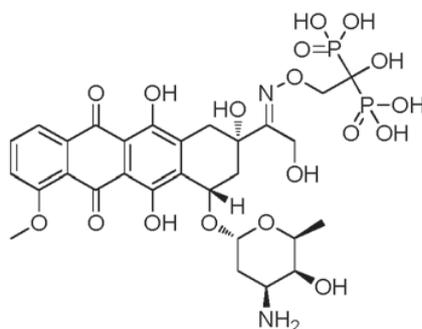
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ, ppm: 7,26 (1H, t), 6,97 (2H, m), 6,89 (1H, dd), 4,10 (2H, t), 3,89 (2H, s), 3,60-3,10 (4H, s), 2,82 (3H, s), 2,31 (2H, m), 2,19 (2H, m). Espectro de RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O, 162 MHz) δ, ppm: 16,87. Espectro de masas (ES-) (m/z): [M-H]<sup>-</sup> 500.

Etapa 2:

La mezcla de compuestos **7** (250 mg, 0,5 mmol) y **3** (290 mg, 0,5 mmol) se solubiliza en 6 ml de una mezcla THF/H<sub>2</sub>O (1/1) a 80 °C, se agita a esta temperatura durante 3 min, después se evapora a sequedad al vacío. La mezcla seca obtenida se deja durante 5 min a 80 °C al vacío y el matraz cerrado se enfría rápidamente a TA con agua fría. El sólido obtenido se solubiliza con agitación a 30-40 °C en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub>sat (4 ml), agua (4 ml) y THF (8 ml). La solución transparente muy oscura obtenida se diluye con agua (50 ml) y se introduce en una columna C18. La columna se eluye con un gradiente de 600 ml de 3 % MeOH/H<sub>2</sub>O a 600 ml de MeOH. El compuesto (**III**) se eluye después de aproximadamente 400 ml de eluyente en un volumen de aproximadamente 200 ml de eluyente. Las fracciones se evaporan al vacío hasta aproximadamente 10 ml de solución restante que se diluye agitando con MeOH (100 ml) seguido de Et<sub>2</sub>O (300 ml). El precipitado rojo formado se filtra, se lava con Et<sub>2</sub>O y se seca al vacío a TA. Se obtiene el compuesto (**III**) (160 mg, rdt = 32 %).

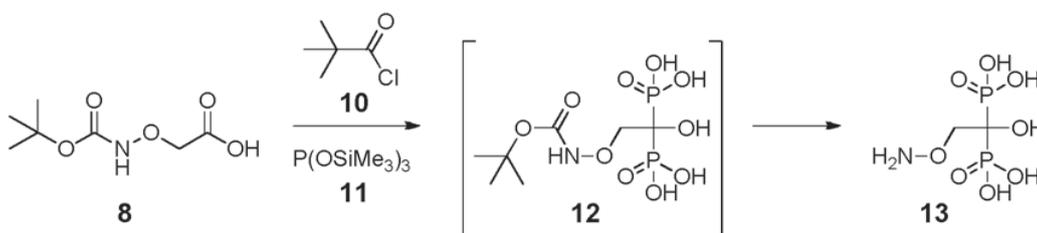
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O/THF-D8 = 3/1, 400 MHz) δ, ppm: 8,03 (2H, m), 7,81 (1H, d), 7,40 (1H, t), 7,21 (1H, s), 7,07 (1H, d), 5,40 (1H, s), 5,17 (1H, t), 4,42-3,99 (11H, m), 3,80-3,35 (6H, m), 3,14-3,95 (4H, m), 2,73-2,35 (7H, m), 2,22 (1H, t), 2,02 (1H, m), 1,47 (1H, m), 1,44 (3H, d). Espectro de RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O/THF-D8 = 3/1, 162 MHz) δ, ppm: 14,62. Espectro de masas (ES-) (m/z): [M-H]<sup>-</sup> 1025. Pureza mediante análisis HPLC (C18, H<sub>2</sub>O/EDTA/NH<sub>3</sub>-MeCN): 98 %.

#### Compuesto (IV):



20

#### Etapa 1:

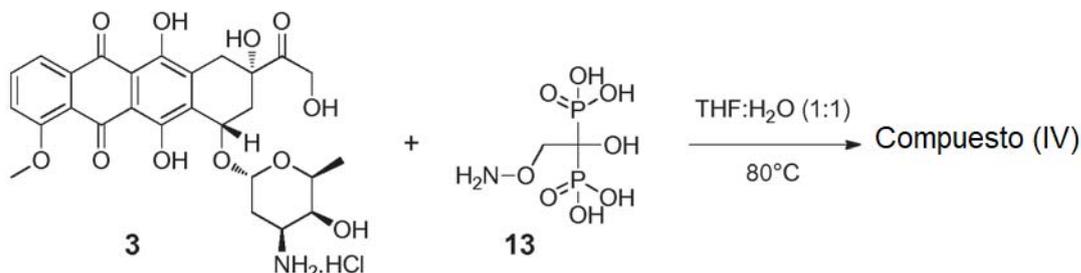


25

A una solución transparente del producto comercial **8** (300 mg, 1,57 mmol) en THF (2 ml) se le añade trietilamina (218 µl, 1,57 mmol) y la mezcla homogénea se enfría a 0 °C. A esta temperatura, la solución del producto **10** (190 mg, 1,57 mmol) en THF (600 µl) se añade progresivamente y la mezcla de reacción se agita durante 15 min a 0 °C. El precipitado se filtra rápidamente a fin de recoger la solución transparente en atmósfera de argón. A esta solución se añade el compuesto **11** (1,4 g, 4,71 mmol) y la mezcla transparente obtenida se agita durante 1 h a TA. Se añade de nuevo metanol (3 ml) y al cabo de 10 min de agitación la mezcla se concentra al vacío a sequedad a 36 °C. Al residuo obtenido, se añade TFA (2 ml) y el precipitado blanco formado se agita a TA durante 1 h, después los volátiles se evaporan a sequedad a 36 °C. El aceite obtenido se trata con metanol seguido de éter y el precipitado blanco formado se filtra, se lava con éter y se seca. Se obtiene el compuesto **13** (205 mg, rdt = 55 %).

35

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ, ppm: 4,49 (2H, t). Espectro de RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O, 162 MHz) δ, ppm: 14,18.

Etapa 2:

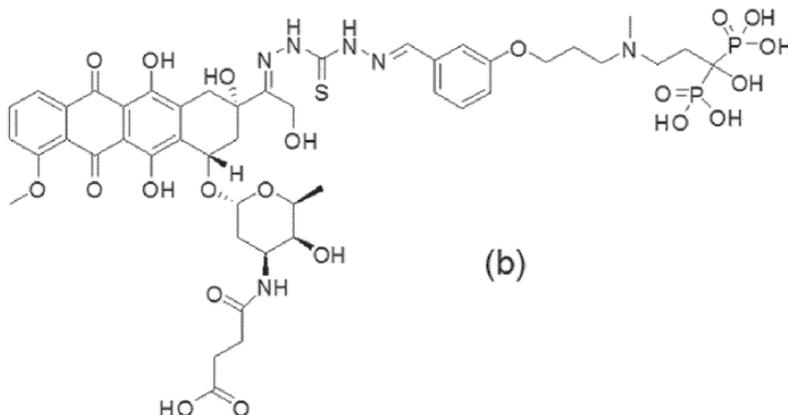
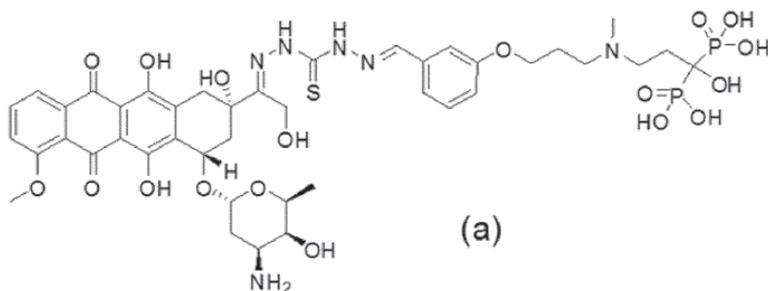
En atmósfera de argón, una solución de los compuestos **3** (270 mg, 0,46 mmol) y **13** (100 mg, 0,42 mmol) en 3 ml de una mezcla THF/H<sub>2</sub>O/TFA (20/20/1) se agita a TA durante 16 h protegida de la luz. Se añaden de nuevo 20 ml de una mezcla NaHCO<sub>3</sub>sat : H<sub>2</sub>O (1:1) y la solución obtenida se introduce en una columna C18 y se eluye después con un gradiente de [600 ml de 3 % MeOH/H<sub>2</sub>O + 2 ml de 20 % NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O] a [600 ml de 50 % MeOH/H<sub>2</sub>O + 2 ml de 20 % NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O]. El producto final sale a partir de aproximadamente 210 ml de eluyente en aproximadamente 150 ml de eluyente. Las fracciones que contienen el producto final se evaporan al vacío hasta aproximadamente 5 ml de solución restante que se diluye seguidamente con metanol (40 ml) seguido de éter dietílico (200 ml). La mezcla obtenida se agita hasta la formación de un precipitado rojo que se agita durante 5 min a TA, después se filtra, se lava con éter dietílico y se seca al vacío a TA. Se obtiene el compuesto (**IV**) (160 mg, rdtó = 47 %).

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ, ppm: 7,66 (1H, t), 7,38 (2H, m), 5,48 (1H, s), 4,84 (1H, s), 4,62 (2H, m), 4,40 (2H, s), 4,29 (1H, m), 3,90 (3H, s), 3,87 (1H, s), 3,73 (1H, t), 2,90 (1H, d), 2,57 (1H, d), 2,35 (1H, d), 2,15-1,92 (3H, m), 1,33 (3H, d). Espectro de RMN <sup>31</sup>P (D<sub>2</sub>O, 162 MHz) δ, ppm: 15,19 (1P, d), 15,08 (1P, d). Espectro de masas (ES<sup>+</sup>) (m/z): [M-H]<sup>-</sup> 807. Pureza mediante análisis HPLC (C18, H<sub>2</sub>O/EDTA/NH<sub>3</sub>-MeCN): 99 %.

**2. Solubilidad de los compuestos (II), (III) y (IV) en comparación con los productos (a) y (b).**

La solicitud WO 2012/130911 describe el derivado (b) anterior resultante del acoplamiento entre un resto doxorubicina modificado y un vector de tipo HBP. Este compuesto (b) es insoluble en agua y poco soluble en agua con adición de TRIS lo que hace difícil el uso de tal compuesto.

Utilizando el mismo vector HBP que en la solicitud WO 2012/130911, el producto (a) obtenido del acoplamiento de la doxorubicina con este vector 5 es igualmente insoluble en agua, en agua con aditivos orgánicos (Tween®, PEG, glicerina, glucosa, TRIS) o minerales (carbonato o bicarbonato de sodio), y en disolventes orgánicos (etanol o dimetilsulfóxido o mezclas de los mismos con agua), lo que hace difícil la explotación de este producto.



30

La solubilidad de los productos (II), (III) y (IV) de acuerdo con la invención mejora considerablemente con respecto a la solubilidad de las moléculas (a) y (b) (véase la tabla siguiente), lo que permite facilitar el uso de tales compuestos como medicamentos.

|                                    | (II)                   | (III)                  | (IV)                   | (a)       | (b)                  |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|----------------------|
| DPBS o agua                        | aproximadamente 255 mM | aproximadamente 160 mM | aproximadamente 315 mM | insoluble | insoluble            |
| solución de TRIS en agua a 2 mg/ml | no ensayado            |                        |                        | insoluble | aproximadamente 1 mM |

5

### 3. Ensayos biológicos

#### Material y métodos:

10 Se evaluó la actividad antitumoral de los compuestos de acuerdo con la invención (II) y (III) en un modelo murino xenogénico ortotópico de osteosarcoma osteolítico inducido mediante inyección paratibial de la línea tumoral humana HOS (osteosarcoma humano, ATCC) en ratones inmunodeprimidos. La actividad de las moléculas de acuerdo con la invención se comparó con la de las subunidades principales que las componen (la doxorubicina y el vector **5**) solas o en asociación. Los tratamientos, en 10 animales por grupo, se iniciaron al día siguiente de la inducción tumoral y se administraron de 1 a 2 veces por semana durante 5 semanas por vía intraperitoneal. Se midieron los volúmenes tumorales dos veces a la semana usando un calibrador y se llevó a cabo un seguimiento radiográfico una vez a la semana. El volumen tumoral, expresado en mm<sup>3</sup>, se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:  $V = (L \times l^2)/2$  (L y l se corresponden con la longitud mayor y la longitud menor del tumor, respectivamente, expresadas en mm).

15

20 Se han estudiado, por tanto, los grupos de tratamiento siguientes, cada uno de 10 ratones:

| Grupos |   | Tratamiento administrado por vía intraperitoneal (Volumen de inyección de 10 ml/kg) |
|--------|---|---|
| 1      | Control (disolvente: DPBS)                          | 2x/sem  |
| 2      | Compuesto (II) (2,5 mM en DPBS)                     | 25 µmol/kg - 2x/sem   |
| 3      | Compuesto (III) (2,5 mM en DPBS)                    | 25 µmol/kg - 2x/sem   |
| 4      | Doxorubicina (0,37 mM en NaCl <sub>lac</sub> 0,9 %) | 3,7 µmol/kg - 1x/sem  |
| 5      | Vector <b>5</b> (2,5 mM en DPBS)                    | 25 µmol/kg - 2x/sem   |
| 6      | Doxorubicina (0,37 mM en NaCl <sub>lac</sub> 0,9 %) | 3,7 µmol/kg - 1x/sem  |
|        | Vector <b>5</b> (2,5 mM en DPBS)                    | 25 µmol/kg - 2x/sem   |

#### Resultados:

25

*Toxicidad.* Administrada a una dosis de 12 mg/kg (20 µmol/kg), la doxorubicina es responsable de un adelgazamiento precoz de los animales (pérdida de peso > 10 % que requirió la eutanasia de los animales después de 2 semanas de tratamiento) y de una cardiotoxicidad. Los compuestos (II), (III) y (IV) usados en una dosis molar equivalente no inducen signos de toxicidad. Con el fin de tratar más eficazmente el tumor, las moléculas bifuncionales se pueden usar incluso en dosis mayores que los agentes anticancerosos solos (sabiendo que la dosis usual de tratamiento con doxorubicina es de 2 mg/kg (3,7 µmol/kg)). Un estudio de determinación de la dosis máxima puso en evidencia una pérdida de peso similar de los ratones cuando los compuestos (II), (III) y (IV) se usaban en una dosis 13 veces mayor que la doxorubicina sola por vía intravenosa o por vía intraperitoneal.

30

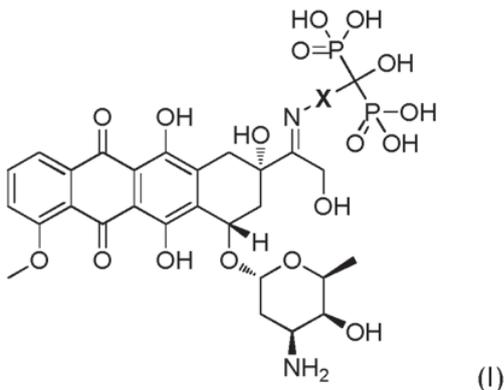
35 *Propiedades antitumorales* (Veáanse las Figuras 1 y 2). Los compuestos (II) y (III) reducen significativamente el tamaño de los tumores extraóseos medidos con respecto al grupo de control y a los grupos tratados con el vector **5** y/o la doxorubicina.

40 La comparación de los volúmenes tumorales de los diferentes grupos es posible, si bien solo hasta el día 27. Tras esa fecha, los animales de los grupos de control, doxorubicina y vector **5** han tenido que ser sometidos a eutanasia debido a volúmenes tumorales demasiados grandes. Además, el día 32 todos los animales del grupo doxorubicina + vector **5** presentan un tumor con un volumen superior a 1500 mm<sup>3</sup> mientras que solo un ratón del grupo de compuesto (II) supera este umbral.

Prevención de las lesiones óseas asociadas al desarrollo tumoral Los compuestos (II) y (III) reducen las fracturas metafisarias, la alteración de la integridad de las corticales y la neoformación de hueso ectópico con respecto a los grupos de control, doxorubicina, vector **5** y doxorubicina + vector **5**. El día 27, cuando el 90 % de los animales del grupo de control presentan fracturas al nivel de la metafisis tibial, el sitio del desarrollo tumoral, estas fracturas no son detectadas en ninguno de los ratones tratados por los compuestos (II) y (III). Las lesiones observadas en el grupo de la doxorubicina son equivalentes a las del grupo de control (osteólisis importantes en la superficie de las corticales y fracturas metafisarias). El vector **5** (grupos de vector **5** y de doxorubicina + vector **5**) reduce en parte las fracturas metafisarias, si bien se observan lamentablemente lesiones osteolíticas importantes en las superficies de las corticales. Por el contrario, los compuestos de acuerdo con la invención previenen significativamente la osteólisis asociada al desarrollo tumoral en este modelo de osteosarcoma.

REIVINDICACIONES

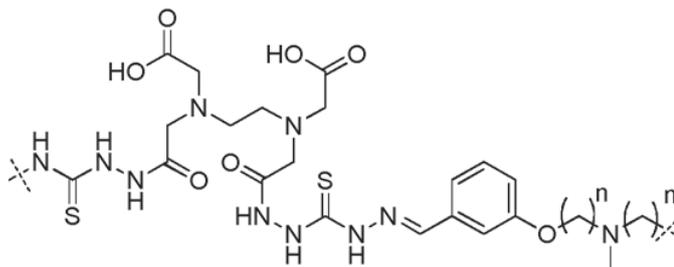
1. Compuesto con la siguiente fórmula general (I):



5

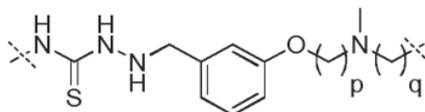
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
en la que X representa un grupo bivalente seleccionado entre:

10 (1)



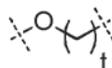
con n y m que representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero comprendido entre 1 y 6,  
(2)

15



con p y q que representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero comprendido entre 1 y 6, y  
(3)

20



con t que representa un número entero comprendido entre 1 y 6,

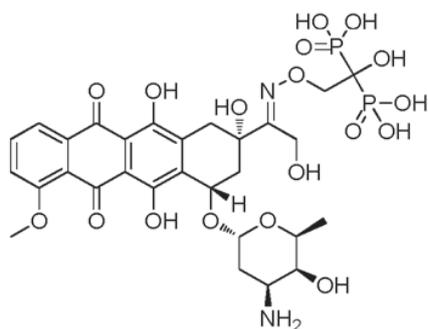
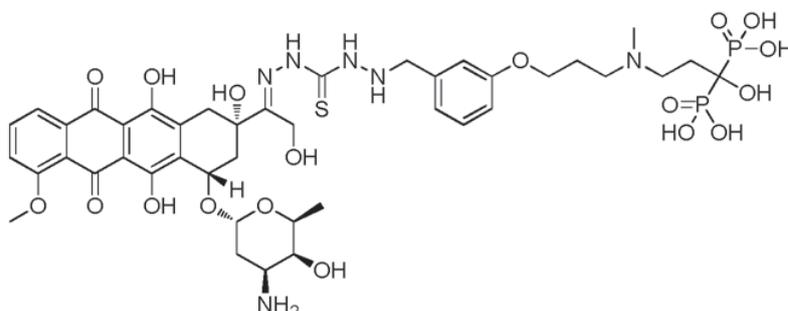
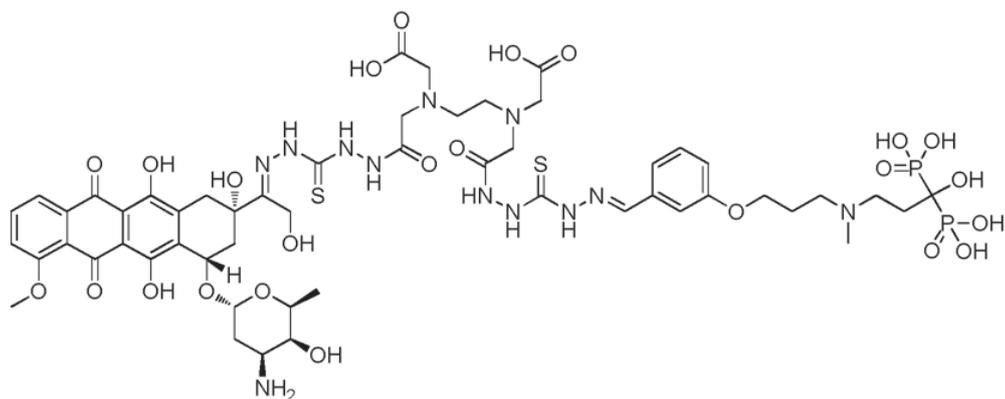
25

estando unidos estos grupos a la función imina del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de nitrógeno o de oxígeno terminal de los mismos y a la función ácido hidroxibisfosfónico del compuesto de fórmula (I) a través del átomo de carbono terminal de los mismos.

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** n, m, p, q y t representan cada uno, independientemente entre sí, un número entero comprendido entre 1 y 4.

30

3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** se selecciona entre los compuestos siguientes:



5

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10

4. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.

5. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un tumor óseo.

15

6. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** el tumor óseo se selecciona entre los tumores óseos primitivos tales como un osteosarcoma, un condrosarcoma, un tumor de células gigantes o un sarcoma de Ewing; las metástasis óseas; y el mieloma múltiple.

20

7. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso como medicamento.

9. Composición de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de un tumor óseo.

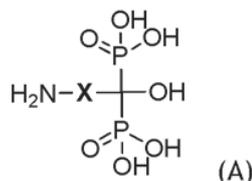
25

10. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por que** el tumor óseo se selecciona entre los tumores óseos primitivos tales como un osteosarcoma, un condrosarcoma, un tumor de células gigantes o un sarcoma de Ewing; las metástasis óseas; y el mieloma múltiple.

30

11. Procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende las etapas siguientes:

(a) reacción de la doxorubicina o una sal de la misma con un compuesto con la fórmula (A) siguiente:



5 o una sal del mismo,

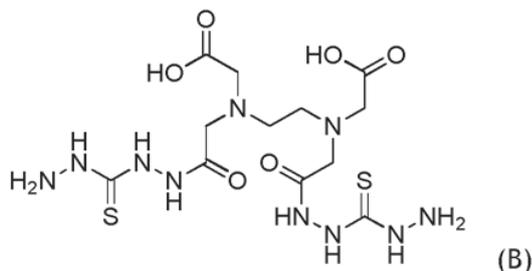
en la que X es tal como se define en la reivindicación 1,  
para dar un compuesto de fórmula (I), y

10 (b) opcionalmente salificación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (a) anterior para dar una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el cual X representa un grupo (1) que comprende las etapas siguientes:

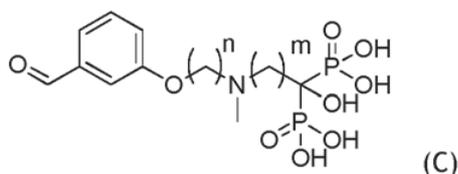
15

(i) reacción de acoplamiento de un compuesto con la fórmula (B) siguiente:



20 o una sal del mismo,

con un compuesto con la fórmula (C) siguiente:



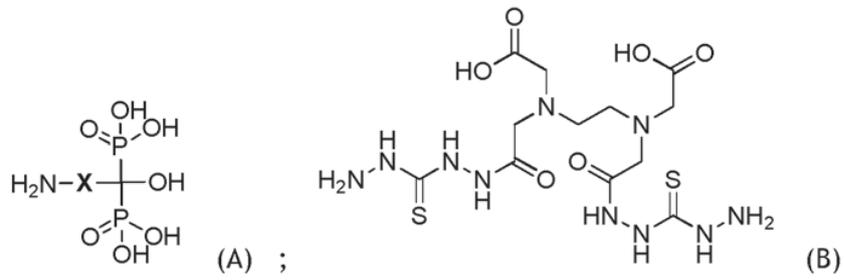
25 o una sal del mismo,

en la que n y m son tal como se definen en la reivindicación 1,  
y la doxorubicina o una sal de la misma,

30 efectuando la reacción de acoplamiento en una sola etapa en presencia del compuesto de fórmula (B) o de una sal del mismo, del compuesto de fórmula (C) o de una sal del mismo y de la doxorubicina o de una sal de la misma, o en dos etapas mediante acoplamiento previo del compuesto de fórmula (B) o de una sal del mismo con la doxorubicina o una sal de la misma antes de efectuar el acoplamiento con el compuesto de fórmula (C) o una sal del mismo, o mediante acoplamiento previo del compuesto de fórmula (B) o de una sal del mismo con el compuesto de fórmula (C) o una sal del mismo antes de efectuar el acoplamiento con la doxorubicina o una sal de la misma, para dar un compuesto de fórmula (I) para el cual X representa un grupo (1), y

40 (ii) opcionalmente salificación del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa (i) anterior para dar una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

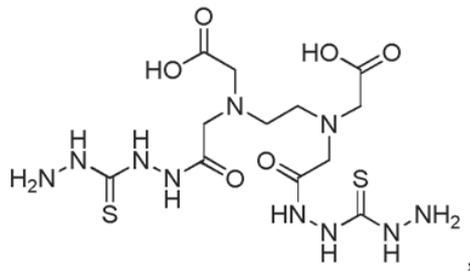
13. Compuesto con la fórmula (A) o (B) siguiente:



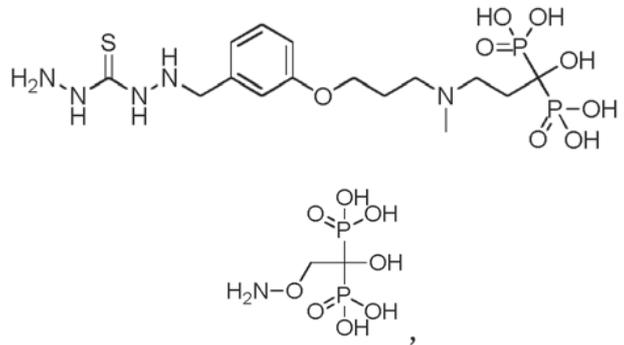
en la que **X** es tal como se define en la reivindicación 1, o una sal del mismo.

5

14. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** se selecciona entre los compuestos siguientes:



10



15 y las sales de los mismos.

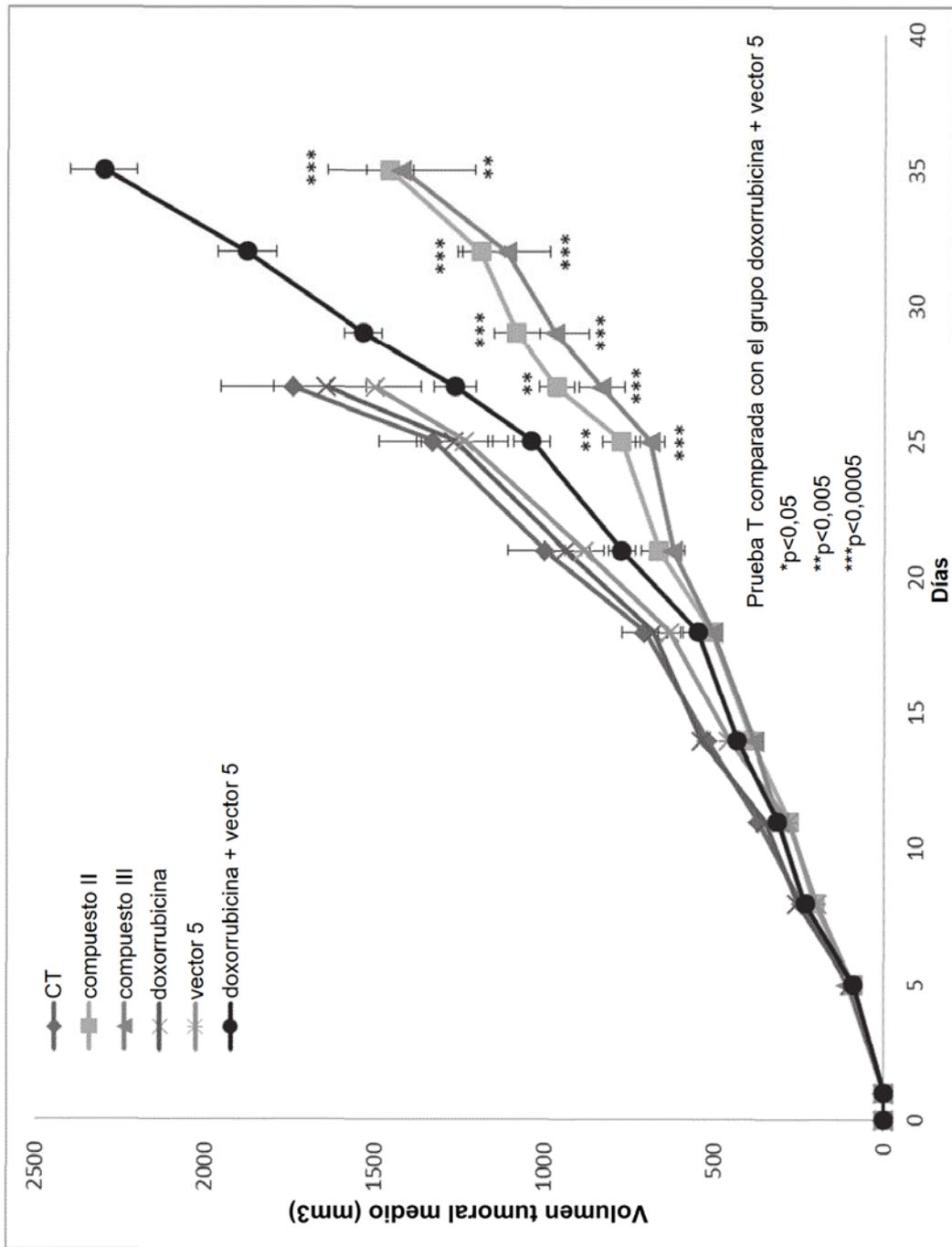
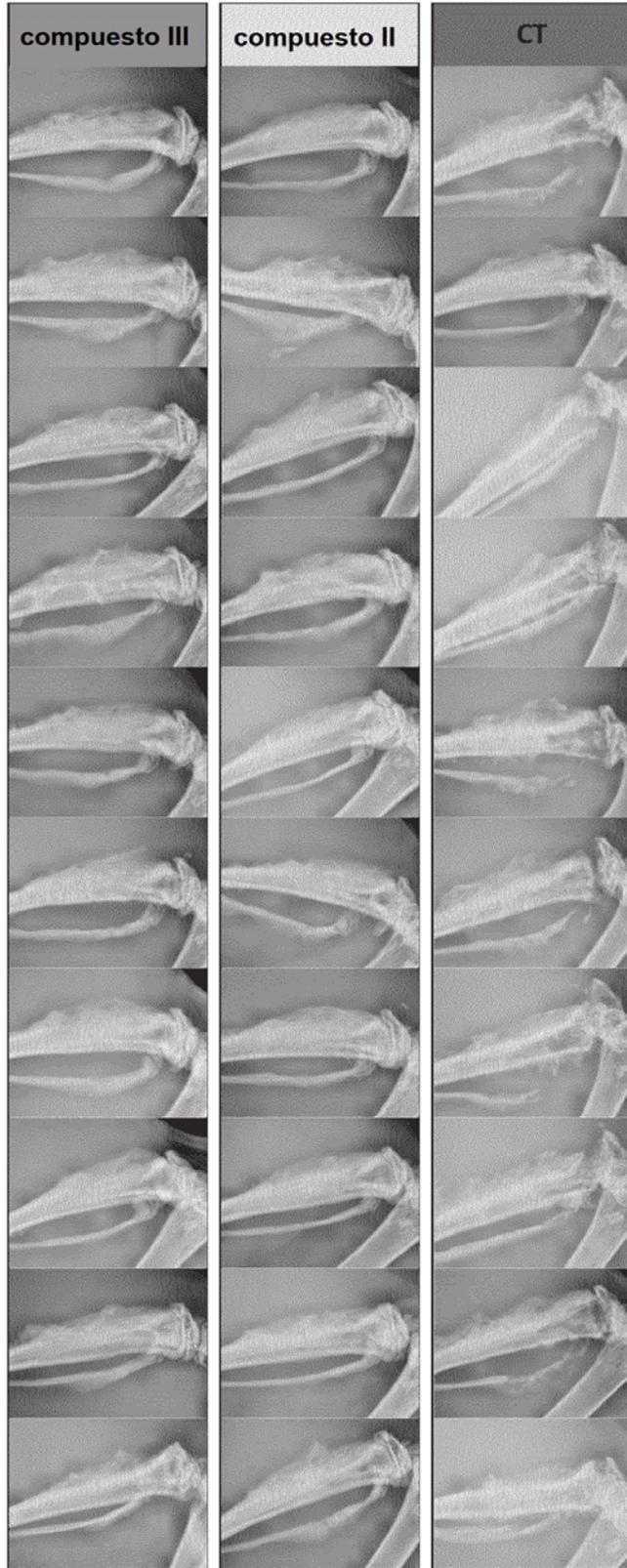


Figura 1



**Figura 2**