

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 290**

21 Número de solicitud: 201400466

51 Int. Cl.:

**C07D 213/74** (2006.01)

**C07D 215/42** (2006.01)

**C07D 453/02** (2006.01)

**A61K 31/4409** (2006.01)

**A61K 31/4706** (2006.01)

**A61K 31/439** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**05.06.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.08.2014**

Fecha de la concesión:

**11.05.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**19.05.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (75.0%)**  
Hospital Real. Avda. Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES y  
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ENTRENA GUADIX , Antonio José ;**  
**LÓPEZ CARA, Luisa Carlota ;**  
**ESPINOSA UBEDA, Antonio;**  
**SCHIAFFINO ORTEGA, Santiago;**  
**MARCO DE LA CALLE , Carmen ;**  
**CARRASCO JIMÉNEZ, María Paz ;**  
**RÍOS MARCO , Pablo ;**  
**VIOLA , Giampetro ;**  
**BORTOLOZZI , Rorberta y**  
**BASSO , Giuseppe**

54 Título: **Inhibidores polares simétricos de colina cinasa con actividad antitumoral**

57 Resumen:

Inhibidores polares simétricos de colina cinasa con actividad antitumoral.

La presente invención se refiere a compuestos polares simétricos de bispíridinio, bisquinuclidinio y bisquinolinio con un linker derivado del 1,2-bis(p-toliloxi)etano inhibidores de colina cinasa, su síntesis y su uso como medicamento antitumoral.

ES 2 482 290 B1

**DESCRIPCIÓN**

**INHIBIDORES POLARES SIMÉTRICOS DE COLINA CINASA CON  
ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

**5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se enmarca en el campo farmacéutico. Concretamente la invención se refiere a compuestos polares simétricos de bispiridinio, bisquinuclidinio y bisquinolinio con un linker derivado del 1,2-bis(p-toliloxi)etano inhibidores de colina cinasa, su síntesis y su uso como medicamento antitumoral.

10

**OBJETO DE LA INVENCION**

El primer objeto de la presente invención es una familia de compuestos con estructura simétrica de sales de bispiridinio, bisquinolino o bisquinuclidinio, inhibidores de la enzima colina cinasa (ChoK).

15

El segundo objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de los compuestos de la familia citada anteriormente.

20 El tercer objeto de la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos como inhibidores de la enzima colina cinasa (ChoK).

El tercer objeto de la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos como medicamentos.

25

Un cuarto objeto de la invención es la elaboración de medicamentos, en particular, composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéutica efectiva dichos compuestos o cualquiera de sus tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos como hemos definido antes y al menos un vehículo o coadyuvante aceptable farmacológicamente.

30

El quinto objeto de la presente invención se refiere al uso de estos compuestos para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por ChoK, preferentemente cáncer, más preferentemente, cáncer de cérvix,

35

adenocarcinoma de colon, leucemias, carcinoma mamario, carcinoma de próstata, carcinoma no microcítico de pulmón y hepatoma humano.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

5

La enzima colina cinasa (ChoK) es la primera enzima de la ruta CDP-colina o ruta de Kennedy, que permite la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), fosfolípido mayoritario de las membranas celulares. Esta enzima cataliza la fosforilación de colina a fosfocolina (PCho) utilizando ATP y  $Mg^{2+}$  como cofactor.

10

En condiciones tumorales, diferentes oncogenes, como *src*, *mos* [Hernández-Alcoceba, R.; Saniger, L.; Campos, J.; Núñez, M. C.; Khaless, F.; Gallo M. A.; Espinosa, A.; Lacal, J. C. *Oncogene* 1997, 15, 2289-2301], pero fundamentalmente el oncogene *ras*, provoca un exceso de actividad de ChoK

15

[Macara, I. G. *Mol. Cell. Biol.* 1989, 9, 325-328; Ratnam, S.; Kent, C. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 323, 313-322] lo que se traduce en un incremento de los niveles intracelulares de PCho, sin que exista una cooperación con la biosíntesis de PC [Bhakoo, K. K.; Williams, S. R.; Florian, C. L.; Land, H.; Noble, M. D. *Cancer Res.* 1996, 56, 4630-4655]. El empleo de técnicas de resonancia

20

magnética nuclear (RMN) aplicadas en diferentes tumores humanos (mama, pulmón, colon, colorrectal, próstata y linfoma hepático, entre otros) ha permitido corroborar que en todos ellos se produce un notable aumento de los niveles de PCho con respecto a los niveles existentes en los correspondientes tejidos sanos [Aboagye, E. O.; Bhujwala, Z. M. *Cancer Res.* 1999, 59, 80-84; de Certaines, J.

25

D.; Larsen, V. A.; Podo, F.; Carpinelli, G.; Briot, O.; Henriksen, O. *NMR Biomed.* 1993, 6, 345-365; Ruiz-Cabello, J.; Cohen, J. S. *NMR Biomed.* 1992, 5, 226-233; Smith, T. A.; Bush, C.; Jameson, C.; Titley, J. C.; Leach, M. O.; Wilman, D. E.; McCready, V. R. *NMR Biomed.* 1993, 6, 318-323].

30

Existen un gran número de estudios que avalan que el aumento de la concentración intracelular de PCho promueve la mitosis celular, permitiendo afirmar que el papel que en ChoK juega en la carcinogénesis humana se debe al incremento de la concentración del producto de catálisis, PCho [Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jimenez, B.; Lacal, J. C. *Oncogene* 1993, 8, 2959-2968;

Kiss, Z. *Cell Signal* 1999, 11, 149-157], que actúa como segundo mensajero implicado en la transducción de la señal mitogénica.

Debido al importante papel que juegan ChoK y PCho en la carcinogénesis humana, la ChoK se ha convertido en una diana terapéutica perfecta para el  
5 diseño de fármacos antitumorales, capaces de inhibir selectivamente la enzima evitando la producción de PCho y, por tanto, la actividad mitogénica asociada a este metabolito.

10 La inhibición de ChoK produce una disminución de la proliferación celular y previene el crecimiento tumoral en ratones [Hernández-Alcoceba, R.; Fernández, F.; Lacal, J. C. *Cancer Res.* 1999, 59, 3112-3118]. Además, la inhibición de ChoK mediante inhibidores específicos conduce a las células tumorales a la apoptosis, mientras que no afecta a las células normales [Rodríguez-González,  
15 A.; Ramírez de Molina, A.; Fernández, F.; Lacal, J. C. *Oncogene* 2004, 23, 8247-8259].

La ChoK está presente en otros organismos eucariotas como es *Plasmodium falciparum*, causante del 80% de las infecciones de malaria. En este parásito,  
20 ChoK cataliza la biosíntesis de PCho, del que se obtiene a su vez PC [Vial, H. J.; Ancelin, M. L. *Subcell Biochem.* 1992, 18, 259-306].

La inhibición de la biosíntesis de PC como estrategia antimalárica ha sido ampliamente estudiada frente a *P. falciparum*. Se han obtenido un gran número  
25 de compuestos con estructura de sales de amonio mono, bis y triscuaternarias capaces de inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro* [Ancelin, M. L.; Vial, H. J.; Philippot, J. R. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 4068-4071; Ancelin, M. L.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29, 814-820; Ancelin, M. L.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbuté, S.; Ringwald, P.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2590-2597; Salom-Roig, X. J.; Hamzé, A.; Calas, M.; Vial, H. J. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2005, 849-862] y en algunos casos, *in vivo* [Ancelin, M. L.; Calas, M.; Bonhoure, A.; Herbuté, S.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2598-2605], interfiriendo la biosíntesis de PC, incluso en cepas resistentes a múltiples fármacos [Ancelin, M.

L.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbuté, S.; Ringwald, P.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 2590-2597].

La identificación de la secuencia genética que codifica ChoK en *P. falciparum* [Choubey, V.; Guha, M.; Maity, P.; Kumar, S.; Raghunandan, R.; Maulik, P. R.; Mitra, K.; Halder, U. C.; Bandyopadhyay, U. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1760, 1027-1038], ha permitido obtener la enzima recombinante ChoK de *P. falciparum* (PfChoK). Estudios empleando bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTAB) han permitido demostrar que la actividad antimalárica mostrada por este compuesto se debe a su capacidad de inhibir PfChoK, lo que provoca un descenso en la generación de PCho, lo que a su vez se traduce en una disminución de la biosíntesis de PC y por tanto, en la muerte del parásito [Choubey, V.; Maity, P.; Guha, M.; Kumar, S.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Bandyopadhyay, U. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51, 696-706].

15

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### Definiciones

20 A lo largo de la presente memoria, "hidrocarburo alifático" se refiere a un radical hidrocarburo lineal o ramificado, cíclico o no, que consta de 1 a 6 átomos de carbono y también de átomos de hidrógeno, que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo etc. Los hidrocarburos alifáticos, pueden estar  
25 opcionalmente insaturados con dobles ó triples enlaces, o también sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio

"Enfermedad mediada por ChoK", se refiere a cualquier enfermedad o afección  
30 en las que la modulación de la expresión o de la actividad de colina cinasa (ChoK) puede ser beneficiosa para los pacientes que sufran dicha enfermedad o afección. Esto incluye, pero no se limita a aquellas enfermedades o afecciones que implican una alteración en la expresión o actividad de ChoK o que se benefician de una inhibición de ChoK. Preferiblemente tal enfermedad o afección  
35 es el cáncer, más preferentemente leucemia, cáncer de cérvix, adenocarcinoma

de colon, leucemia, carcinoma mamario, carcinoma de próstata, carcinoma no microcítico de pulmón y hepatoma humano.

5 Se entenderá por "*preparar en microondas*" o "*preparar con el uso de microondas*" a hacer reaccionar dos o más compuestos sometidos a radiación por microondas, preferentemente en un microndas específico de síntesis de laboratorio.

10 Los términos "*transportador*", "*coadyuvante*" y/o "*vehículo*" se refieren a las entidades moleculares o sustancias con las que se administran el principio activo. Tales vehículos, transportadores o coadyuvantes farmacéuticos, pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo éstos los de petróleo o de origen vegetal, animal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y excipientes similares, disgregantes, 15 agentes humectantes o diluyentes. Los transportadores, coadyuvantes y vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

20 El término "*profármaco*", incluye cualquiera de los compuestos que se convierte en el compuesto de Fórmula I, cuando se administra a un paciente, por ejemplo en el proceso metabólico del profármaco. Ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan solo a ellos, acetato, formiato, benzoato, carboximetoxi, carboxietoxi y derivados de grupos funcionales (tales como alcohol, ácido carboxílico, éter, éster o grupos amino) en los compuestos de Fórmula I.

25 El término "*solvato*" se refiere al compuesto formado por la interacción de un disolvente y de un compuesto. Los solvatos adecuados, son solvatos aceptables farmacéuticamente, tales como solvatos, hidratos incluyendo monosolvatos, hidratos y hemisolvatos hidratos. El término "*hidrato*" se refiere a monosolvatos, 30 hidratos, disolvatos, hidratos y trisolvatos, hidratos.

El término "*sal*" se refiere a una sal de un compuesto que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Tales sales incluyen, pero no se limitan sólo a ellos:

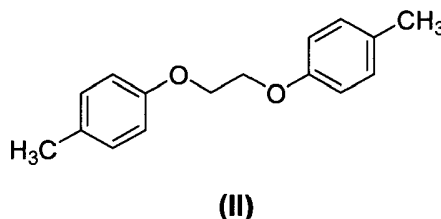
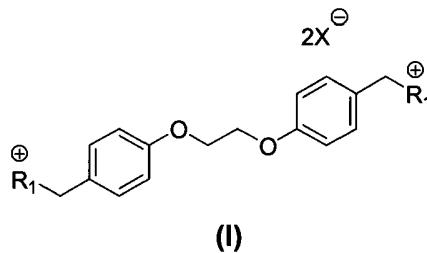
35

- Sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas por ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido p-toluensulfónico y similares.

- Sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original es reemplazado por un ión metálico, por ejemplo un ión de un metal alcalino, un metal alcalinotérreo o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, dicitclohexilamina y similares. Algunas formas de sales pueden encontrarse como hidratos, de tal forma que el término sal se define generalmente para incluir las formas hidratadas y no hidratadas de la sal.

**Compuestos objeto de la invención**

Los compuestos objeto de esta invención responden a la fórmula general (I), que tienen en común un espaciador derivado del 1,2-bis(p-toliloxi)etano (III).y dos radicales R<sub>1</sub> iguales.



En una realización particular,  $R_1$  se selecciona del grupo formado por:

- cabezas catiónicas derivadas del anillo de piridina
- 5   • cabezas catiónicas derivadas del anillo de quinolina; y
- restos de quinuclidina

En una realización aún más particular,  $R_1$  se selecciona del grupo formado por:

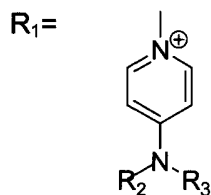
- 10   • cabezas catiónicas derivadas del anillo de piridina sustituido en posición *para* con restos de aminas primarias, secundarias o terciarias de tipo alifático (cíclicas o acíclicas) o aromático como sustituyentes.
- cabezas catiónicas derivadas del anillo de quinolina convenientemente sustituido en posición 4 con aminas primarias secundarias o terciarias alifáticas (cíclicas o acíclicas), y/o con restos aromáticos; y en
- 15   posición 5, 6, 7 ó 8, con un sustituyentes  $R_4$  que podría ser H, halógeno, una amina (primaria, secundaria o terciaria) o un -OR donde  $R = H$ , alquilo ó aromático;
- restos de quinuclidina sustituido en posición 2, 3 ó 4 por  $R_2$  que podría ser H, un halógeno, un hidroxilo -OH o un éter -OR donde  $R =$
- 20   hidrocarburo alifático ó aromático.

Estos compuestos se pueden dividir en 3 Familias **A**, **B** y **C** atendiendo a la naturaleza de  $R_1$ .

25

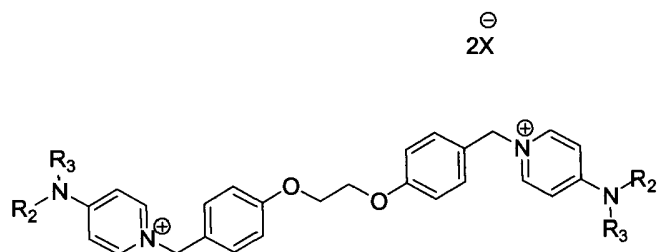
**Familia A:**  $R_1$  pueden ser cabezas derivadas del anillo de piridina sustituido en posición *para* con restos de aminas primarias, secundarias o terciarias de tipo alifático (cíclicas o acíclicas) o aromático como sustituyentes.

30





La estructura general de la **Familia A** correspondería a la **Estructura IA**

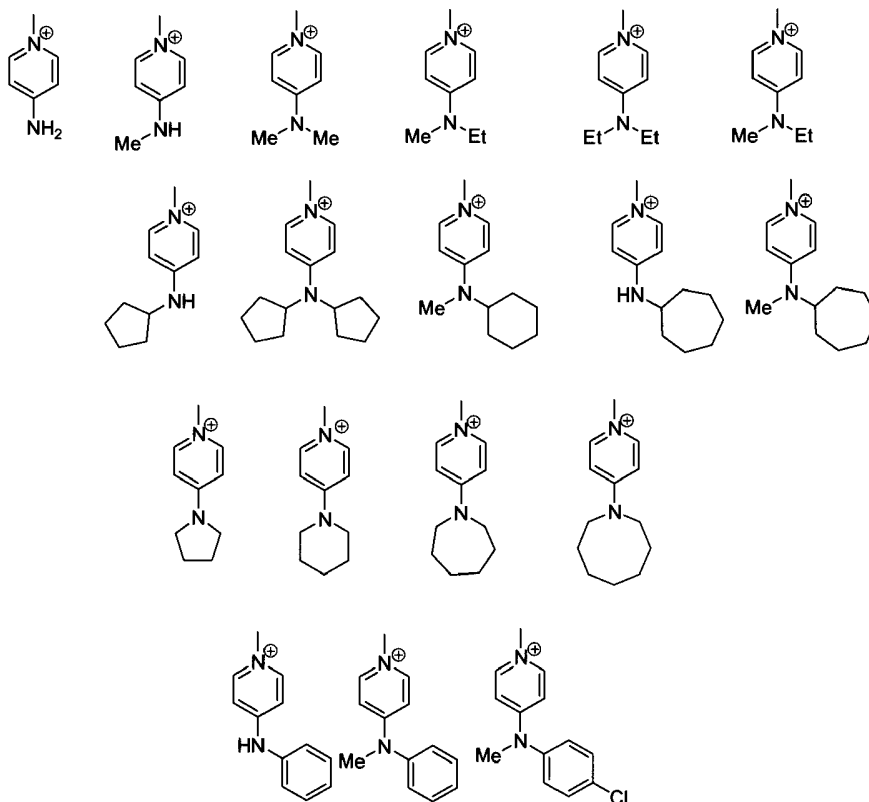


5

(IA)

10 Donde  $R_2$  y  $R_3$  se seleccionan del grupo formado por H, hidrocarburos alifáticos de 1 a 8 carbonos, hidrocarburos alifáticos cíclicos, de 5 a 8 carbonos y anillos aromáticos.

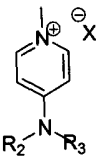


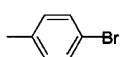
Algunos ejemplos de cabezas se recogen a continuación:



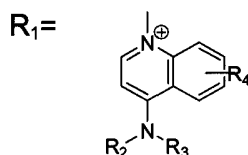
15

En la **Tabla I** se contemplan a modo de ejemplo algunos posibles compuestos, pertenecientes a esta familia

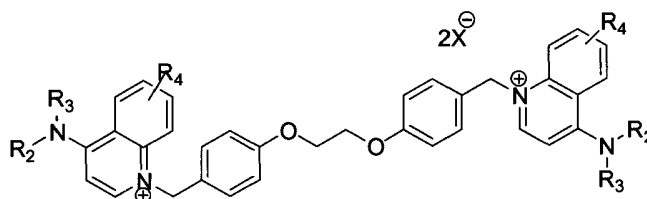
**Tabla I**

| Código  | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |
|---------|---|---|-----------------|
| EB-3D   |  | CH <sub>3</sub>   | CH <sub>3</sub> |
| EB-3AC  |   | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -  |                 |
| EB-3PY  |   |  | CH <sub>3</sub> |
| EB-3CPY |   |  | CH <sub>3</sub> |
| EB-3C1  |   |  | CH <sub>3</sub> |

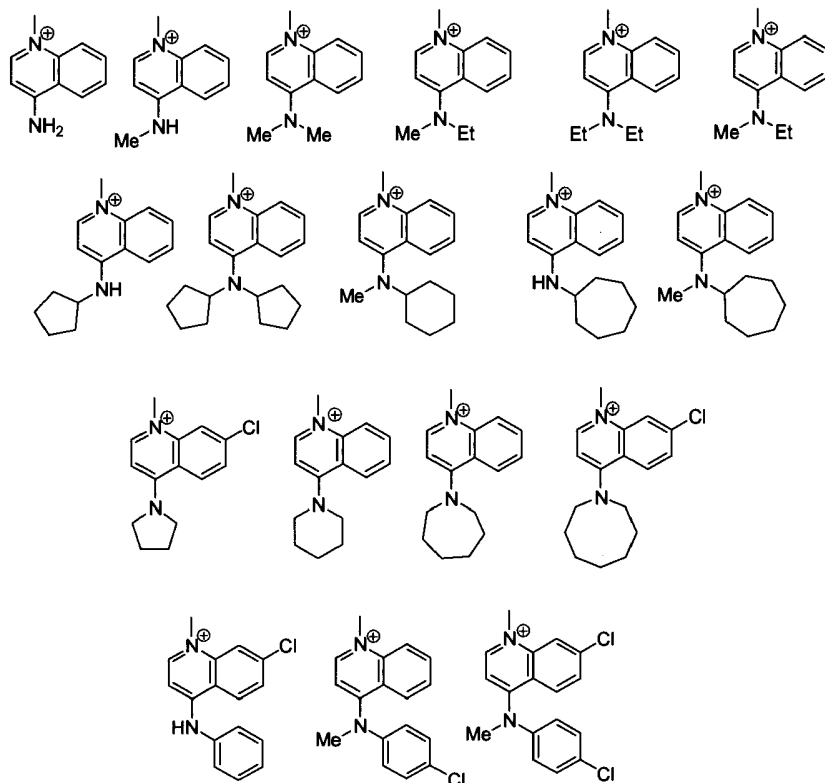
**Familia B:** R<sub>1</sub> pueden ser cabezas catiónicas derivadas del anillo de quinolina convenientemente sustituido en posición 4 con aminas primarias secundarias o terciarias alifáticas (cíclicas o acíclicas), y/o con restos aromáticos; y en posición 5, 6, 7 ó 8, con un sustituyentes R<sub>4</sub> que podría ser H, halógeno, una amina (primaria, secundaria o terciaria) o un -OR donde R = H, alquilo ó aromático.



La estructura general de la **Familia B** correspondería a la **Estructura IB**

**Estructura IB**

Algunos ejemplos de cabezas se recogen a continuación:



5 En la **Tabla II** se contemplan a modo de ejemplo algunos posibles compuestos de esta **Familia IB**.

**Tabla II**

| Código        | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                     | R <sub>3</sub>  | R <sub>4</sub> |
|---------------|----------------|------------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>EB-3P</b>  |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - |                 | Cl             |
| <b>EB-3CA</b> |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - |                 | H              |
| <b>EB-3DC</b> |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - |                 | Cl             |
| <b>EB-3CM</b> |                |                                    | CH <sub>3</sub> | H              |
| <b>EB-3DM</b> |                |                                    | CH <sub>3</sub> | Cl             |
| <b>EB-3CC</b> |                |                                    | CH <sub>3</sub> | H              |
| <b>EB-3C</b>  |                |                                    | CH <sub>3</sub> | Cl             |

10

15

**Familia C:** R<sub>1</sub> que pueden ser restos de quinuclidina sustituido en posición 2, 3 ó 4 por R<sub>5</sub> que podría ser H, un halógeno, un hidroxilo -OH o un éter -OR donde R = alquilo ó aromático.

R<sub>1</sub>=

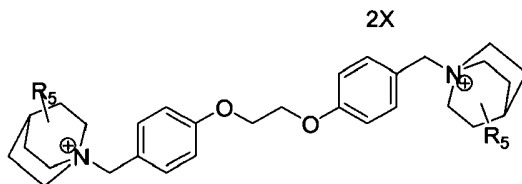
5



La estructura general de la **Familia C** correspondería a la **Estructura IC**

10

**Estructura IC**



Algunos ejemplos de cabezas se recogen a continuación:

15



En la **Tabla III** se contemplan a modo de ejemplo algunos posibles compuestos pertenecientes a esta familia

20

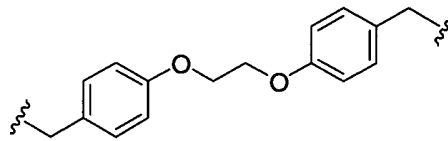
**Tabla III**

| Código        | R <sub>1</sub> | R <sub>5</sub> |
|---------------|----------------|----------------|
| <b>EB-3Q</b>  |                | H              |
| <b>EB-3QO</b> |                | OH             |

25

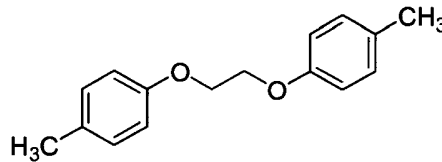
**Metodo general de síntesis de los compuestos objeto de la invención.**

El procedimiento de preparación de los compuestos que responden a la fórmula general (IA, IB y IC) comprende los siguientes pasos:

5 - **Síntesis de precursores del espaciador y del espaciador**

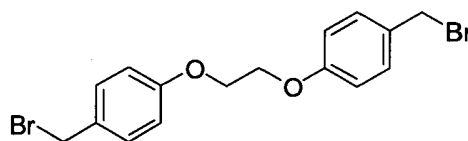
(II)

- 10 Se entiende por grupo espaciador II un derivado del **1,2-bis(p-toliloxi)etano III** que actúe como nexo de unión entre los dos grupos de piridinio, quinolinio o quinuclidinio presentes en las estructuras definidas por las fórmulas generales de las **Estructuras IA, IB ó IC**.



(III)

- 15 La síntesis del espaciador comienza con la síntesis de **1,2-bis(p-toliloxi)etano (III)** a partir 4-metoxifenol y 1,2-dibromoetano, asequibles comercialmente (Sigma-Aldrich ®). En un reactor de microondas se disuelve 4-metoxifenol en etanol y se añade NaOH (1:1 equivalentes), la mezcla de reacción se mantiene de 20 a 30 min agitando a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añaden 0.5 equivalentes de 1,2-dibromoetano y la mezcla de reacción se irradia en un microondas a una temperatura de entre 115 y 145°C, preferentemente a 130°C, durante un periodo de tiempo de 25 a 35 min, preferentemente 28 min. La reacción se enfría y se añade agua destilada. El sólido precipitado se filtra y se lava dos veces con agua y una vez con EtOH, se seca a vacío para obtener un
- 20
- 25 sólido blanco identificado como 1,2-bis(p-toliloxi)etano (III).



(IV)

Para la obtención de **2-bis(4-(bromometil)fenoxi)etano (IV)** se irradia en un microondas a una temperatura de entre 110 y 130°C, preferentemente a 120°C, durante un periodo de tiempo de 20 a 30 min, preferentemente 21 min una  
 5 disolución 1,2-bis(p-toliloxi)etano (III), NBS y dibenzilperoxido (Relacion molar 1:2:0.8) en CCl<sub>4</sub>. El precipitado obtenido se filtra y se lava con dietileter, se seca a vacío y se obtiene un sólido amarillo.

Ambas reacciones han sido descritas previamente en bibliografía pero sin el uso de microondas, [Self-Complementary [2]catenanes and Their Related  
 10 [3]Catenanes. *Chem. Eur. J.*, 6 (2000) 2262-2273].

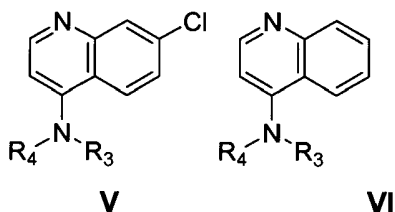
Para la obtención de III se empleaba un tiempo de reacción de 8 horas a reflujo, obteniendo un rendimiento del 21%. Con el uso de microondas se ha mejorado  
 15 mejorado considerablemente el tiempo y rendimiento (28 min y 35%).

Para la obtención de IV se empleaba un tiempo de reacción de 5 horas a reflujo y obteniendo un rendimiento del 39%. Con el uso de microondas hemos mejorado considerablemente el tiempo y rendimiento (21 min y 65%).  
 20

#### - Síntesis de cabezas quinolónicas V y VI

En la estructura general IB, R<sub>1</sub> pueden ser cabezas derivadas de anillo de quinolina convenientemente sustituidas en posición 4 con aminas alifáticas primarias secundarias terciarias (cíclicas o acíclicas), y/o con restos aromáticos; y en posición 5, 6, 7 ó 8, con un sustituyentes R<sub>5</sub> que podría ser H, halógeno, una amina (primaria, secundaria o terciaria) o un -OR donde R = H, alquilo ó aromático.  
 25

30



A modo de ejemplo se detalla el procedimiento para la obtención de 7-cloro-4-(sustituída) **quinolina (V)**. Se irradia en un microondas a una temperatura de entre 165-195°C, preferentemente a 180°C, durante un periodo de tiempo de 20  
5 a 30 min, preferentemente durante 15 minutos, una mezcla de 4,7-dicloroquinolina con el aminoderivado correspondiente, disueltos en ácido acético (cuando el amino derivado es un análogo de anilina) o sin disolvente (si el amino derivado es una amina cíclica alifática). A modo de ejemplo se detallan algunas aminas utilizadas, metilnilina, 4-clometilnilina, perhidroazepina,  
10 pirrolidina asequibles comercialmente (Sigma-Aldrich ®) (Relación molar 1:2.66). Transcurrido dicho tiempo, la reacción se neutraliza con NaOH y agua, se extrae la fase orgánica con diclorometano, se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo se purifica mediante columna cromatografica flash usando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1 v/v) como  
15 eluyente.

Para la obtención de 4-(sustituída) quinolina (**VI**) se irradia en el microondas la 4-hidroxiquinolina con cloruro de fosforilo (Relación molar 1:5) asequibles comercialmente (Sigma-Aldrich ®), a 150° durante 30 minutos. Transcurrido  
20 dicho tiempo, se añade sobre el reactor cerrado 3 equivalentes del aminoderivado correspondiente (a modo de ejemplo: perhidroazepina, pirrolidina, metilnilina, 4-clometilnilina) asequible comercialmente (Sigma-Aldrich ®), y se irradia en el microndas a 180°C durante 8 minutos. La reacción se neutraliza con NaOH y agua, se extrae la fase orgánica con diclorometano, se seca sobre  
25 sulfato magnésico anhidro, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo se purifica mediante columna cromatografica flash usando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1 v/v) como eluyente.

Ambas reacciones han sido descritas previamente en bibliografía pero sin el uso  
30 de microondas en la patente ES200400072.

Para la obtención de **V** empleaba un tiempo de reacción de 12 horas a reflujo, obteniendo un rendimiento del 85% al 93%. Con el uso de microondas hemos mejorado considerablemente el tiempo de reacción y el rendimiento ha  
35 permanecido practicamente invariable (15 min y 78%).

Para la obtención de VI empleaba un tiempo de reacción de 12 horas a reflujo, obteniendo un rendimiento del 72%. Con el uso de microondas hemos mejorado considerablemente el tiempo de reacción y el rendimiento ha permanecido  
5 prácticamente invariable (38 min y 79%).

**- Síntesis de los productos finales biscatiónicos.**

Una disolución del producto intermedio (IV) en acetonitrilo seco se añade gota a  
10 gota a una disolución de la correspondiente piridina sustituida, quinuclidina o quinolina 4-sustituida (relación molar 1:2) en acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calienta a reflujo bajo atmósfera de argon durante tres días. Transcurrido dicho tiempo, el producto biscatiónico precipitado se filtra y se lava con dietileter, se seca a vacío y/o se purifica mediante columna cromatográfica  
15 flash usando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1 v/v) como eluyente.

**Actividad biológica de los compuestos objeto de la invención.**

Los compuestos objeto de la invención muestran actividad biológica como  
20 inhibidores de la enzima ChoK humana, así como también la actividad antiproliferativa frente a las líneas tumorales de carcinoma de cérvix humano HeLa, adenocarcinoma de colon HT-29, Leucemia Humana tipo-T Jurkat, leucemia promielocítica HL-60, Leucemia humana tipo-B RS4;11, carcinoma mamario MCF-7, carcinoma de próstata PC-3, carcinoma no microcítico de  
25 pulmón A549 y la línea celular resistente a fármacos de hepatoma humano Hep G2.

Así, la invención también se refiere a un método de tratamiento de mamíferos, preferiblemente seres humanos, que necesiten inhibir ChoK, y que comprende la  
30 administración al individuo afectado de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, como se ha definido anteriormente, o cualquiera de los tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos.



En particular, es un método de tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por ChoK, preferentemente tumores, más preferentemente, cáncer de cérvix, adenocarcinoma de colon, leucemia, carcinoma mamario, carcinoma de próstata, carcinoma no microcítico de pulmón y hepatoma humano

5

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina bien como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo hidratos) y se pretende que ambas formas se incluyan dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos dentro la técnica.

10

Cualquier compuesto que es un profármaco de un compuesto de Fórmula I está dentro del alcance y espíritu de la invención. El término " profármaco " se utiliza en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten in vivo en los compuestos de la invención. Tales derivados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, compuestos en los que un grupo hidroxilo libre se convierte en un derivado de éster.

15

Además, los compuestos mencionados en este documento pueden existir como isómeros geométricos (es decir, isómeros cis y trans), como tautómeros, o como atropoisómeros. Específicamente, el término "tautómero" se refiere a uno o más isómeros estructurales de un compuesto que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra. Pares tautoméricos comunes son amina-imina, amida-imida, ceto-enol, lactama-lactima, etc Además, cualquier compuesto que se refiere el presente documento está destinado a representar hidratos, solvatos, y polimorfos, y mezclas de los mismos cuando tales formas existan en el medio. Además, los compuestos mencionados en este documento pueden existir en formas marcadas isotópicamente. Todos los isómeros geométricos, tautómeros, atropoisómeros, los hidratos, solvatos, polimorfos, y las formas marcadas isotópicamente de los compuestos a que se refiere el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

20

25

30

Los compuestos objeto de la invención muestran actividad biológica como inhibidores de la enzima ChoK humana, así como también la actividad

antiproliferativa frente a las líneas tumorales de carcinoma de cérvix humano HeLa, adenocarcinoma de colon HT-29, Leucemia Humana tipo-T Jurkat, leucemia promielocítica HL-60, Leucemia humana tipo-B RS4;11, carcinoma mamario MCF-7, carcinoma de próstata PC-3, carcinoma no microcítico de pulmón A549 y la línea celular resistente a fármacos de hepatoma humano Hep G2.

### Inhibición de la colina cinasa citosólica

10 La enzima ChoK se ha obtenido de la fracción citosólica de células de hepatoma humano HepG2 siguiendo el método experimental descrito previamente [Jiménez-López, J.M.; Carrasco, M.P.; Segovia, J.L.; Marco, C. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 4649-4655]. Para el estudio de la actividad inhibitoria frente a ChoK humana se ha seguido el método experimental previamente publicado [ES 2 148  
15 092 B1]. Estos ensayos se han realizado con los compuestos **EB-3D, EB- AC, EB-3CPY, EB-3Q, EB-3QO, EB-3CM, EB-3CC, EB-3DM, EB-3C, EB-3CA, EB-3DC y EB-3P**. Los resultados se expresan como la concentración ( $\mu\text{M}$ ) necesaria para obtener un 50% de inhibición enzimática ( $\text{CI}_{50}$ ) y se resumen en la **tabla V**.

### 20 Inhibición de la colina cinasa purificada (ChK $\alpha$ 1)

Los efectos de los diferentes inhibidores sobre la colina cinasa (ChoK) se ensayaron utilizando la ChK $\alpha$ 1 purificada, que fue clonada y purificada según la literatura previamente descrita [Sahún-Roncero, M.; Rubio-Ruiz, B; Conejo-García, A.; Velazquez-Campoy, A.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R. *ChemBioChem* 2013, 14, 1291-1295]. Para cada ensayo se hicieron, en paralelo, ensayos control con la misma cantidad que presentaban los distintos inhibidores sintéticos. La cantidad de DMSO nunca excedió una concentración de 0.1%, para evitar la posible inespecificidad en la inhibición de la ChoK.

30 La actividad de la colina cinasa se determinó midiendo el porcentaje de incorporación de  $^{14}\text{C}$  a partir de [metil- $^{14}\text{C}$ ]colina a fosfocolina, ambos en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del inhibidor. La mezcla final de reacción contenía 100 mM Tris (pH 8.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ATP, y 20 ng

de ChoK $\alpha$ 1 purificada. Las muestras se preincubaron a 37°C durante 5 minutos. Para el inicio de la reacción se partió de 1mM [metil-<sup>14</sup>C]colina (4500 dpm/nmol) y se incubó a 37°C durante 10 minutos, siendo el volumen final de la reacción de 55  $\mu$ l. La reacción se paró mediante la inmersión de los tubos de reacción en agua hirviendo durante 3 minutos. Las muestras de la mezcla de reacción se desarrollaron en placas cromatográficas de Silica Gel, en presencia de fosfocolina (0.1 mg) y colina (0.1 mg), utilizando metanol/0.6% NaCl/ 28% NH<sub>4</sub>OH en agua (50:50:5, v/v/v) como líquido de desarrollo. Para la visualización de la fosfocolina se expusieron las placas a una atmósfera de vapor de yodo. Posteriormente se rasparon las muestras y se transfirieron a viales de centelleo para medir la radioactividad, utilizando como soporte técnico un contador de centelleo líquido Beckman 6000-TA (Madrid, España). Al menos se hicieron tres réplicas para cada ensayo realizado. La concentración inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>) se determinó a partir del % de actividad de la enzima frente a las diferentes concentraciones de los inhibidores sintéticos ensayados, usando una curva sigmoideal dosis-respuesta (ED<sub>50</sub>plus v1.0 software).

### **Ensayos de Antiproliferación en células tumorales**

La línea celular HepG2 de hepatoma humano procede de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (Salisbury, Reino Unido). Las células se cultivaron en MEM que contiene 10 % de FBS inactivado por calor, suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/ mL de estreptomina. Las células fueron cultivadas en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C y se subcultivaron a una relación de 1:10 una vez a la semana.

Las células HepG2 se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos (10 000 células/pocillo) y se mantuvieron en MEM que contenía 10 % de FBS durante 24 h. Entonces, se reemplazó el medio de cultivo fresco con medium/10 % de FBS y las células se incubaron durante 24 h en ausencia o presencia de diferentes cantidades de inhibidores de la ChoK disueltos en DMSO. En cada experimento las células controles se incubaron con la misma concentración de DMSO que las células tratadas. La concentración de DMSO no superó nunca el 0,3 % para evitar la lisis celular. La actividad metabólica de las células, indicativa de la proliferación celular, se midió después de la adición de 10  $\mu$ L (por 100 $\mu$ L de

medio) de reactivo WST-1 durante 2-4 horas a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada muestra se analizó usando un lector de microplacas de ELISA Bio-Tex-Instrumentos ELx800 (Winooski, EE.UU). La longitud de onda para la medición de la absorbancia del producto de formazano era 450 nm y una longitud de onda de referencia a 630 nm. La concentración inhibitoria del 50 % (CI<sub>50</sub>) se determinó a partir de las curvas de dosis-respuesta de acuerdo con la relación de inhibición para cada concentración utilizando el software v1.0 ED<sub>50</sub>plus.

Para el crecimiento de las líneas celulares tumorales humanas de linfocitos T (Jurkat), linfocitos B (RS4;11) y leucemia promielocítica (HL-60), se utilizó el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Milán, Italia). Para el crecimiento de las líneas celulares tumorales humanas de adenocarcinoma mamario (MCF-7), carcinoma no microcítico de pulmón (A549), carcinoma de cervix uterino (HeLa) y adenocarcinoma de colon (HT-29) se utilizó el medio de cultivo DMEN (Gibco, Milán, Italia). Ambos medios de cultivo se suplementaron con 115 unidades/mL de penicilina G (Gibco, Milán, Italia), 115 ug/mL de estreptomycin (Invitrogen, Milán, Italia) y un 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Milán, Italia). Las soluciones Stock (10 mM) de los diferentes compuestos se obtuvieron disolviendo los mismos en DMSO. Los pocillos individuales de una placa de cultivo de 96 pocillos se inocularon con 100 uL de medio completo, conteniendo 8 x 10<sup>3</sup> células. Las placas se incubaron a 37°C, en un incubador con atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h antes de los experimentos. Después de remover el medio, se añadieron a cada pocillo 100 uL de medio fresco conteniendo los compuestos a ensayar a diferentes concentraciones y se incubó a 37°C durante 72 h. El porcentaje de DMSO en el medio nunca excedió del 0,25%. El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil)tetrazoilo) como se describió previamente [Romagnoli, Baraldi P.G., Lopez-Cara C., Preti D., Aghazadeh Tabrizi M., Balzarini J., Bassetto M., Brancale A., Xian-Hua Fu, Yan Gao, Jun Li, Su-Zhan Zhang R., Hamel E. Bortolozzi R., Basso G., Viola G. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 9296-9309]. La CI<sub>50</sub> se definió como la concentración de compuesto requerida para inhibir la proliferación celular en un 50%, en comparación con las células tratadas con la máxima cantidad de DMSO (0,25%) y consideradas como el 100% de viabilidad.

En experimentos adicionales la viabilidad celular también se determinó mediante el cálculo de los valores de azul de tripán de células azules positivas (células muertas) y células azul de tripán negativas (células vivas) procedentes de una  
5 mezcla de células en suspensión con un 0,4% de solución de azul de tripán.

Estos ensayos se han realizado con los compuestos **EB-3D, EB-AC, EB-3CPY, EB-3Q, EB-3QO, EB-3CM, EB-3CC, EB-3DM, EB-3C, EB-3CA, EB-3DC y EB-3P**. Los resultados se expresan como la concentración ( $\mu\text{M}$ ) necesaria para obtener un 50% de inhibición del crecimiento celular ( $\text{CI}_{50}$ ) y se resumen más  
10 adelante en la **tabla V**.

#### **Ensayos de Antiproliferación en células no tumorales.**

Células mononucleares periféricas (PBMC) procedentes de donantes sanos se obtuvieron mediante la separación en gradiente de un Linfopreparado (Fresenius KABI Norge AS). Después de un lavado extensivo, las células se resuspendieron  
15 ( $1.0 \times 10^6$  células/mL) en RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino y se incubaron toda la noche. Para las evaluaciones de citotoxicidad en cultivos de proliferación PBL, se resuspendieron células no adherentes a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL en medio de crecimiento conteniendo  $2.5 \mu\text{g/mL}$  PHA (Irvine Scientific).

20 Se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar y se determinó la viabilidad celular 72 h más tarde mediante un ensayo de MTT. Para evaluar la citotoxicidad en los cultivos PBL restantes, se resuspendieron las células no adherentes ( $5 \times 10^5$  células/mL) y se trataron durante 72 h con los  
25 compuestos a ensayar, como fue descrito previamente [Dall'Acqua F., Linardi M.A., Innocenti G., Basso G., Viola G. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 5876-5885].

Se prepararon células madre de la vena del cordón umbilical humanas (HUVEC), como se ha descrito previamente [Porcù E., Viola G. Bortolozzi R., Mitola S.,  
30 Ronca R., Presta M., Persano L., Romagnoli R., Baraldi P.G., Basso G. *Angiogenesis*, 2013, 16, 647-662].

Las células adherentes se mantuvieron en medio M200, adicionado con suplemento de crecimiento bajo en suero (LSGS), conteniendo FBS, Hydrocortisona, hEGF, bFGF, heparina, gentamicina/anfotericina (Life technologies, Monza, Italia). Una vez confluentes, las células fueron despegadas utilizando una solución de tripsina-EDTA y usadas en los experimentos desde el primero hasta el sexto pase.

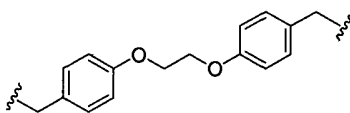
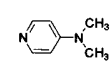
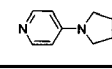
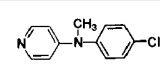


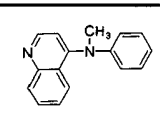
Los fibroblastos humanos procedentes de prepucio se aislaron como se describe previamente [Rheinwald JG, Green H. *Cell* 1975, 6: 331-343] y cultivados en DMEN con 10% de FBS.

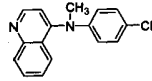
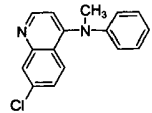
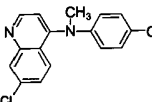
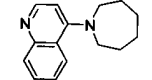
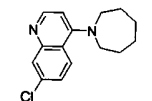
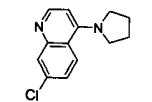
Estos ensayos se han realizado con los compuestos **EB-3D**, **EB-3AC**, **EB-3CM**, **EB-3CC**, **EB-3DM**, **EB-3CA**, **EB-3DC** y **EB-3P**. Los resultados se expresan como como la concentración ( $\mu\text{M}$ ) necesaria para obtener un 50% de inhibición del crecimiento celular ( $\text{CI}_{50}$ ) y se resumen más adelante en la **Tabla VI**.

## 15 MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A título de ejemplo ilustrativo, pero no limitativo, se representan en la **Tabla IV** algunos de los compuestos objeto de esta invención.

**Tabla IV**

| Código         | Espaciador  | R <sub>1</sub>  |
|----------------|---|---|
| <b>EB-3D</b>   |  |   |
| <b>EB-3AC</b>  |   |   |
| <b>EB-3CPY</b> |   |   |
| <b>EB-3Q</b>   |   |  |
| <b>EB-3QO</b>  |   |  |
| <b>EB-3CM</b>  |   |   |

|    |               |   |
|----|---------------|---|
| 5  | <b>EB-3CC</b> |   |
|    | <b>EB-3DM</b> |   |
|    | <b>EB-3C</b>  |   |
| 10 | <b>EB-3CA</b> |   |
|    | <b>EB-3DC</b> |   |
| 15 | <b>EB-3P</b>  |  |

Los ejemplos preparativos se proponen, a continuación, a modo ilustrativo u orientativo, sin que estos sean limitativos:

20 **Ejemplo nº 1: Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-(dimetilamino)piridinio]. (EB-3D).** Sólido de color amarillo (42%); **P.f.** 62-63°C; **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 3.24 (s, 12H), 4.33 (s, 4H), 5.30 (s, 4H), 6.99 (d, *J* = 7.86 Hz, 4H), 7.02 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 7.35 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 8.20 (d, *J* = 7.86 Hz, 4H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 41.20 x 4, 62.22 x 2, 68.86 x 2, 109.93 x 4, 117.30 x 4, 129.20 x 2, 131.98 x 4, 143.76 x 4, 158.87 x 2, 161.80 x 2; **HRMS** (m/e): [M]<sup>2+</sup> calculado para C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 242.1419, encontrado: 242.1409.

30 **Ejemplo nº 2: Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-(pirrolidino)piridinio]. (EB-3AC).** Sólido de color marrón (68%); **P.f.** 129-130°C; **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 2.11 (t, *J* = 6.86 Hz, 8H), 3.54 (t, *J* = 6.84 Hz, 8H), 4.32 (s, 4H), 5.28 (s, 4H), 6.84 (d, *J* = 7.77 Hz, 4H), 7.01 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 7.34 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 8.17 (d, *J* = 7.77 Hz, 4H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 26.98 x 4, 50.28 x 4, 62.26 x 2, 68.86 x 2, 110.51 x 4, 117.29 x 4,

129.31 x 2, 131.92 x 4, 143.68 x 4, 156.05 x 2, 161.79 x 2; **HRMS** (m/e):  $[M]^{2+}$  calculado para  $C_{34}H_{40}N_4O_2$ : 2681576, encontrado: 268.1568.

**Ejemplo n° 3: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{4-[(4-clorofenil)(metil)amino]pyridinio}. (EB-3CYP).**  
 5 Sólido de color blanco (30%); **P.f.** > 300°C;  $^1H$  RMN (600 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$ = 3.53 (s, 6H), 4.33 (s, 4H), 5.35 (s, 4H), 6.92 (m, 4H), 7.02 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 4H), 7.37 (m, 8H); 7.58 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 4H). 8.28(d,  $J$  = 8.5 Hz, 4H).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CD_3OD$ ):  
 10  $\delta$ = 30.55 x 2, 61.64 x 2, 67.81 x 2, 110.27 x 2, 116.27 x 8, 127.95 x 2, 129.28 x 4, 131.13 x 4, 131.94 x 4, 135.52 x 2, 143.52 x 4, 158.31 x 160.85 x 2. **HRMS** (m/e):  $[M]^{2+}$  calculado para  $C_{20}H_{19}N_2OCl$ : 338.1186, encontrado: 338.1194.

**Ejemplo n° 4: Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-quinuclidinio]. (EB-3Q).** Sólido de color blanco (56%);  
 15 **P.f.** > 300°C ;  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$ = 2.01 (dt,  $J$  = 8.23, 3.23 Hz, 12H), 2.18 (dt,  $J$  = 6.44, 3.23 Hz, 2H), 3.48 (m, 12H), 4.35 (s, 4H), 4.43 (s, 4H), 7.13 (d,  $J$  = 8.78 Hz, 4H), 7.47 (d,  $J$  = 8.78 Hz, 4H);  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$ = 22.33 x 2, 25.81 x 6, 56.39 x 6, 68.87 x 2, 69.52 x 2, 117.14 x 4, 121.54 x 2, 136.48 x 4, 162.80 x 2; **HRMS** (m/e):  $[M]^{2+}$  calculado para  $C_{30}H_{42}N_2O_2$ : 231.1623,  
 20 encontrado: 231.1628.

**Ejemplo n° 5: (SS/RR y RS) Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-(3-hidroxi)quinuclidinio]. (EB-3QO).** Sólido de color blanco (63%); **P.f.** 268-270°C;  $^1H$  RMN (300 MHz,  $DMSO-d^6$ ):  $\delta$ = 4.08, 3.64, 3.35, 3.04, 2.27, 2.10 (6m, 26H), 4.41 (s, 4H), 4.43 (s, 4H), 7.13 (d,  $J$  = 8.66 Hz, 4H), 7.48 (d,  $J$  = 8.66 Hz, 4H);  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $DMSO-d^6$ ):  $\delta$  = 17.29, 20.87, 26.83, 52.52, 53.46, 62.26 x 4, 63.27, 65.61 x 4, 66.37, 114.77 x 8, 119.63 x 4, 134.43 x 8, 159.52 x 4; **HRMS** (m/e):  $[M]^{2+}$  calculado para  $C_{30}H_{42}N_2O_4$ : 247.1572, encontrado: 247.1565.

**Ejemplo n° 6: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{4-[metil(fenil)amino]quinolinio}. (EB-3CM).** Sólido de color amarillo (64%); **P.f.** 169-170°C;  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$ = 3.84 (s, 6H), 4.33 (s, 4H), 5.89 (s, 4H), 8.86 (d,  $J$  = 7.44 Hz, 2H), 7.81 (dt,  $J$  = 5.57, 1.43 Hz, 2H), 7.62 (dd,  $J$  = 8.8, 1.3 Hz, 2H), 7.03 (d,  $J$  = 8.76 Hz, 4H), 7.40-7.29 (m,



12H), 7.53 (m, 4H), 7.46 (t,  $J = 7.36$  Hz, 2H), 8.13 (d,  $J = 8.37$  Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 46.75 \times 2, 59.94 \times 2, 68.85 \times 2, 107.73 \times 2, 117.30 \times 4, 120.97 \times 2, 122.29 \times 2, 127.73 \times 4, 127.85 \times 2, 128.64 \times 2, 130.15 \times 2, 130.28 \times 2, 130.63 \times 4, 132.75 \times 4, 135.51 \times 2, 141.68 \times 2, 148.54 \times 2, 150.14 \times 2, 160.80 \times 2, 161.47 \times 2$ ; HRMS (m/e):  $[\text{M}]^{2+}$  calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_2$ : 354.1732, encontrado: 354.1736.

**Ejemplo n° 7: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{4-[(4clorofenil)(metil)amino]quinolinio}. (EB-3CC).**  
 10 Sólido de color amarillo (70%); P.f. 178-180°C;  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 3.82$  (s, 6H), 4.33 (s, 4H), 5.91 (s, 4H), 7.03 (d,  $J = 8.77$  Hz, 4H), 7.33 (d,  $J = 8.77$  Hz, 4H), 7.41-7.37 (m, 8H), 7.52 (d,  $J = 8.91$  Hz, 4H), 7.67 (dd,  $J = 8.8, 1.2$  Hz, 2H), 7.84 (dt,  $J = 5.64, 1.36$  Hz, 2H), 8.16 (dd,  $J = 8.9, 0.6$  Hz, 2H), 8.90 (d,  $J = 7.40$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 46.53 \times 2, 60.09 \times 2, 68.84 \times 2,$   
 15 108.36  $\times 2, 117.30 \times 4, 121.13 \times 2, 122.41 \times 2, 128.20 \times 2, 128.52 \times 2, 129.28 \times 4, 130.00 \times 2, 130.69 \times 4, 132.72 \times 4, 135.58 \times 2, 135.68 \times 2, 141.68 \times 2, 148.77 \times 2, 148.81 \times 2, 160.92 \times 2, 161.48 \times 2$ ; HRMS (m/e):  $[\text{M}]^{2+}$  calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2$ : 388.1342, encontrado: 388.1338.

20 **Ejemplo n° 8: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiil bis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{7-cloro-4-[metil(fenil)amino]quinolinio}. (EB-3DM).**  
 Siguiendo el procedimiento general se obtiene un crudo de reacción que se purifica mediante columna cromatográfica flash usando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (9:1 v/v). Se obtiene un sólido de color marrón-amarillento (61%);  
 25 P.f. 181-183°C;  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 3.82$  (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 4.34 (s, 4H), 5.85 (s, 4H), 7.06-7.03 (d,  $J = 8.70$  Hz, 4H), 7.29 (dd,  $J = 9.3, 1.9$  Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 6H), 7.41-7.40 (d,  $J = 7.48$  Hz, 4H), 7.47 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.56-7.53 (m, 6H), 8.15 (d,  $J = 1.89$  Hz, 2H), 8.82 (d,  $J = 7.50$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 46.87 \times 2, 59.91 \times 2, 68.86 \times 2, 107.93 \times 2, 117.41 \times 4, 120.45 \times 2,$   
 30 120.68  $\times 2, 128.24 \times 2, 127.72 \times 4, 128.24 \times 2, 128.35 \times 2, 130.59 \times 2, 130.77 \times 4, 131.80 \times 2, 132.92 \times 4, 141.90 \times 2, 142.51 \times 2, 148.95 \times 2, 149.76 \times 2, 160.51 \times 2, 161.58 \times 2$ ; HRMS (m/e):  $[\text{M}]^{2+}$  calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2$ : 388.1342, encontrado: 388.1331.

35

**Ejemplo nº 9: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiolbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{7-cloro-4-[(4-clorofenil)(metil)amino]quinolinio}. (EB-3C).** Siguiendo el procedimiento general se obtiene un crudo de reacción que se purifica mediante columna cromatográfica flash usando como eluyente una mezcla

5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1 v/v). Se obtiene un sólido de color marrón-amarillento (39%); **P.f.** 185-186°C; **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 3.82 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 4.35 (s, 4H), 5.88 (s, 4H), 7.06 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H, H-2), 7.35 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H), 7.38 (d, *J* = 7.47 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 1.96 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.78 Hz, 4H), 7.55 (d, *J* = 8.78 Hz, 4H), 7.63 (d, *J* = 9.31 Hz, 2H), 8.20 (d, *J* = 1.93 Hz, 2H), 8.87 (d, *J* =

10 7.46 Hz, 2H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 46.69 x 2, 60.05 x 2, 68.85 x 2, 108.57 x 2, 117.40 x 4, 120.61 x 2, 120.82 x 2, 128.15 x 2, 128.71 x 2, 129.33 x 4, 130.85 x 4, 131.68 x 2, 132.88 x 4, 135.92 x 2, 142.06 x 2, 142.50 x 2, 148.45 x 2, 149.22 x 2, 160.65 x 2, 161.59 x 2; **HRMS** (m/e): [M]<sup>2+</sup> calculado para C<sub>48</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> : 422.0953, encontrado: 422.0952.

15 **Ejemplo nº 10: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiolbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-(1-azepanil)quinolinio]. (EB-3CA).** Sólido de color amarillo (67%); **P.f.** 75-77°C; **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 1.75 (dt, *J* = 5.40, 2.54 Hz, 8H), 8.54 (d, *J* = 7.73 Hz, 2H), 2.09 (m, 8H), 4.09 (m, 8H), 4.30 (s, 4H),

20 5.74 (s, 4H), 7.00 (d, *J* = 8.80 Hz, 4H), 7.10 (d, *J* = 7.74 Hz), 7.27 (d, *J* = 8.80 Hz, 4H), 7.66 (dt, *J* = 5.77, 1.15 Hz, 2H), 7.90 (dt, *J* = 5.67, 1.33 Hz, 2H), 8.05 (dd, *J* = 8.83, 1.05 Hz, 2H), 8.42 (dd, *J* = 8.62, 1.28 Hz, 2H); **<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 29.23 x 4, 29.37 x 4, 56.06 x 4, 58.99 x 2, 68.84 x 2, 104.55 x 2, 117.22 x 4, 120.33 x 2, 121.41 x 2, 127.04 x 2, 128.98 x 2, 130.44 x 2, 130.48 x

25 4, 135.52 x 2, 142.10 x 2, 146.48 x 2, 161.34 x 2, 161.91 x 2; **HRMS** (m/e): [M]<sup>2+</sup> calculado para C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> : 346.6700, encontrado 346.2039.

**Ejemplo nº 11: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiolbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[-7-Cloro4-(1azepanil)quinolinio]. (EB-3DC).** Siguiendo

30 el procedimiento general se obtiene un crudo de reacción que se purifica mediante columna cromatográfica flash usando como eluyente una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1 v/v). Se obtiene un sólido de color blanco (41%); **P.f.** 87-88°C; **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ= 1.74 (m, 8H), 2.08 (m, 8H), 4.08 (m, 8H), 4.33 (s, 4H), 5.72 (s, 4H), 7.03 (d, *J* = 8.64 Hz, 4H), 7.11 (d, *J* = 7.78 Hz, 2H), 7.65 (dd, *J* = 9.2, 1.9 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.64 Hz, 4H), 8.07 (d, *J* = 1.82 Hz, 2H), 8.40 (d, *J*

35

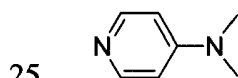
= 9.21 Hz, 2H), 8.51 ppm (d,  $J = 7.75$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta =$  29.16 x 4, 29.28 x 4, 56.12 x 4, 59.00 x 2, 68.85 x 2, 105.00 x 2, 117.32 x 4, 119.78 x 2, 119.88 x 2, 127.45 x 2, 128.57 x 2, 130.59 x 4, 132.31 x 2, 141.82 x 2, 142.95 x 2, 146.77 x 2, 161.44 x 2, 161.56 ppm x 2; HRMS (m/e):  $[\text{M}-\text{Br}]^+$  calculado para  $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}$  : 839.24949, encontrado: 839.2494.

**Ejemplo n° 12: Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-(1-pirrolidinil)quinolinio]. (EB-3P).** Siguiendo el procedimiento general se obtiene un crudo de reacción que se purifica mediante columna cromatográfica flash usando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (9:1 v/v). Se obtiene un sólido de color blanco (48%); P.f. 118-120°C;  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta =$  2.20 (m, 8H), 4.02 (m, 8H), 4.32 (s, 4H), 5.71 (s, 4H), 6.90 (d,  $J = 7.69$  Hz, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.75$  Hz, 4H), 7.66 (dd,  $J = 9.2, 2.0$  Hz, 2H), 7.01 (d,  $J = 8.75$  Hz, 4H), 8.04 (d,  $J = 2.02$  Hz, 2H), 8.51 (d,  $J = 7.69$  Hz, 2H), 8.63 ppm (d,  $J = 9.23$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta =$  24.64 x 4, 55.43 x 4, 59.06 x 2, 68.83 x 2, 104.64 x 2, 117.29 x 4, 119.73 x 2, 120.16 x 2, 127.71 x 2, 128.68 x 2, 130.45 x 4, 131.76 x 2, 141.76 x 2, 142.45 x 2, 146.91 x 2, 157.92 x 2, 161.37 ppm x 2; HRMS (m/e):  $[\text{M}]^{2+}$  calculado para  $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2$ : 352.1337, encontrado: 352.1353.

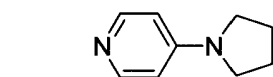
20

### Preparación de reactivos

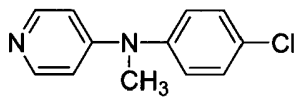
El compuesto 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina es comercial y suministrado por Sigma-Aldrich®.



El compuesto 4-pirrolidinopiridina es comercial y suministrado por Sigma-Aldrich®.



El compuesto 4-(4-cloro-*N*-metilanilino)piridina se preparó siguiendo la metodología descrita en P201400072.



La **Tabla V** indica, a título de ejemplo y no con carácter excluyente, los resultados obtenidos en los estudios de inhibición enzimática frente a ChoK humana, en los estudios antiproliferativos frente a la líneas tumorales Hep-G2, HeLa, HT-29, Jurkat, HL-60, RS4;11, MCF-7, PC-3 y A549

10

15

Tabla V

| Código  | Inhibición<br>enzimática<br>ChoK Hep-G2<br>citoplasmática<br>CI <sub>50</sub> (µM) | Inhibición<br>enzimática<br>ChoKα1<br>purificada<br>CI <sub>50</sub> (µM) | Actividad<br>antiproliferativa CI <sub>50</sub> (µM) |       |       |        |       |        |       |       |       |  |
|---------|--|---|--|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|--|
|         |  |   | Hep-G2   | HeLa  | HT-29 | Jurkat | HL-60 | RS4;11 | MCF-7 | PC-3  | A549  |  |
| EB-3D   | 2.20   | 1.00  | >100   | 0.079 | 0.11  | 0.12   | 0.10  | 0.045  | 0.092 | 0.051 | 0.027 |  |
| EB-3AC  | 45.90  | 9.56  | 24.57  | 0.082 | 4.3   | 0.068  | 0.042 | 1.12   | 0.17  | 4.5   | 2.3   |  |
| EB-3CPY | 7.06   | 1.63  | ---  | 5.6   | 4.3   | 7.3    | 2.1   | 2.7    | 3.5   | 3.1   | 4.9   |  |
| EB-3Q   | 45.49  | ---   | >100   | 16.9  | >100  | >100   | 84.1  | 37.5   | 91.4  | 94.3  | 61.3  |  |
| EB-3QO  | 17.73  | 9.51  | >100   | >100  | 94.0  | >100   | >100  | 66.0   | 50.9  | 48.0  | >100  |  |
| EB-3CM  | 55.39  | 6.85  | 11.92  | 0.15  | 0.12  | 0.060  | 0.063 | 0.24   | 0.17  | 0.47  | 0.21  |  |
| EB-3CC  | 66.32  | 3.27  | 16.31  | 0.25  | 0.75  | 0.098  | 0.71  | 0.15   | 0.46  | 0.26  | 0.11  |  |
| EB-3DM  | 34.93  | 2.79  | 25.13  | 0.32  | 0.35  | 0.31   | 0.92  | 0.026  | 0.32  | 0.85  | 0.18  |  |
| EB-3C   | >100   | 16.22   | 76.81  | 1.5   | 1.0   | 0.76   | 0.87  | 0.50   | 0.66  | 0.72  | 0.29  |  |
| EB-3CA  | 26.33  | 1.66  | 3.85   | 0.17  | 0.15  | 0.11   | 0.42  | 0.16   | 0.11  | 0.09  | 0.30  |  |
| EB-3DC  | 45.96  | 2.02  | 12.64  | 0.26  | 0.27  | 0.072  | 0.18  | 0.036  | 0.28  | 0.11  | 0.52  |  |
| EB-3P   | 25.13  | 0.92  | 2.38   | 0.37  | 0.56  | 0.007  | 0.16  | 0.42   | 0.022 | 0.8   | 0.14  |  |

La **Tabla VI** indica a título de ejemplo y no con carácter excluyente, los resultados obtenidos en los estudios de citotoxicidad de algunos de los compuestos objeto de esta invención.

5

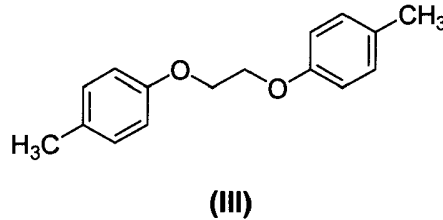
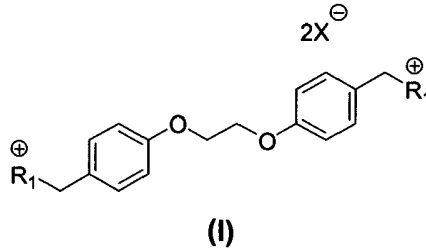
**Tabla VI**

| <b>Código</b> | <b>PBL<br/>(quiescentes)</b> | <b>PBL (+Pha)</b> | <b>Fibroblastos<br/>Humanos</b> | <b>HUVEC</b> |
|---------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>EB-3D</b>  | 1.5±0.64                     | 0.034±0.007       | 5.8±1.3                         | 5.1±0.43     |
| <b>EB-3AC</b> | 34.8±15.6                    | 1.88±0.71         | 30.5±9.6                        | n.d.         |
| <b>EB-3CM</b> | 1.4±0.6                      | 0.10±0.03         | 9.8±2.5                         | n.d.         |
| <b>EB-3CC</b> | 0.98±0.25                    | 0.55±0.11         | 7.4±2.4                         | 10.4±3.5     |
| <b>EB-3DM</b> | 1.0±0.42                     | 0.32±0.03         | 3.7±0.43                        | 16.0±6.6     |
| <b>EB-3CA</b> | 2.0±0.24                     | 0.095±0.021       | 14.3±1.2                        | n.d.         |
| <b>EB-3DC</b> | 2.1±0.80                     | 0.034±0.007       | 3.2±0.86                        | n.d.         |
| <b>EB-3P</b>  | 3.8±0.55                     | 0.49±0.15         | 9.6±1.3                         | 11.4±5.9     |

10

## REIVINDICACIONES

- 1.- Compuesto de fórmula general (I) que comprende el compuesto de fórmula general (III) como espaciador y dos radicales,  $R_1$ , iguales



- 2.- Compuesto según reivindicación anterior donde  $R_1$  se selecciona del grupo formado por:

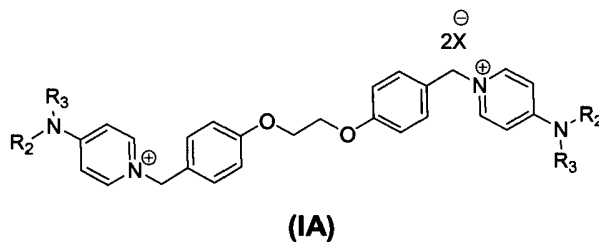
- 15
- cabezas catiónicas derivadas del anillo de piridina
  - cabezas catiónicas derivadas del anillo de quinolina; y
  - restos de quinuclidina

- 3.- Compuesto según reivindicación anterior donde  $R_1$  se selecciona del grupo formado por:

- 20
- cabezas catiónicas derivadas del anillo de piridina sustituido en posición *para* con restos de aminas primarias, secundarias o terciarias de tipo alifático (cíclicas o acíclicas) o aromático como sustituyentes.
  - cabezas catiónicas derivadas del anillo de quinolina convenientemente sustituido en posición 4 con aminas primarias secundarias o terciarias alifáticas (cíclicas o acíclicas), y/o con restos aromáticos; y en posición 5, 6, 7 ó 8, con un sustituyentes  $R_4$  que podría ser H, halógeno, una amina (primaria, secundaria o terciaria) o un -OR donde R = H, alquilo ó aromático; y
- 25

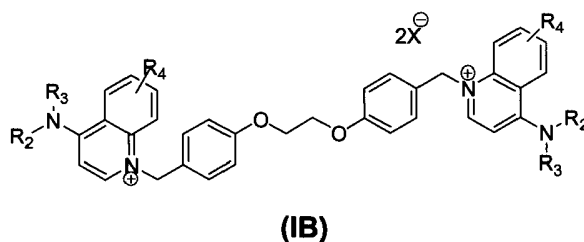
- restos de quinuclidina sustituido en posición 2, 3 ó 4 por  $R_5$  que podría ser H, un halógeno, un hidroxilo -OH o un éter -OR donde R = hidrocarburo alifático ó aromático sustituido o no.

5 3.- Compuesto según reivindicación anterior con fórmula general (IA)



10 Donde  $R_2$  y  $R_3$  se seleccionan del grupo formado por H, hidrocarburos acíclicos de 1 a 8 carbonos, hidrocarburos acíclicos de 5 a 8 carbonos y cabezas aromáticas.  $R_2$  puede ser igual o diferente a  $R_3$  en cada cabeza.

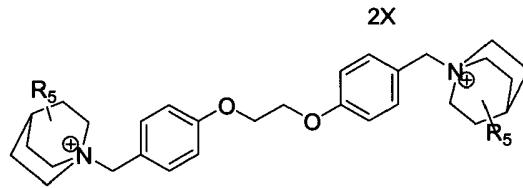
15 4.- Compuesto según reivindicación 3 con fórmula general (IB)



20 Donde  $R_2$  y  $R_3$  se seleccionan del grupo formado por H, hidrocarburos alifáticos de 1 a 8 carbonos, hidrocarburos alifáticos cíclicos de 5 a 8 carbonos y cabezas aromáticas.

25 5.- Compuesto según reivindicación 3 con fórmula general (IC)





(IC)

Dónde  $R_5$  podría ser hidrógeno -H, un halógeno -X, un hidroxilo -OH o un éter -OR donde R = hidrocarburo alifático ó aromático sustituido o no.

5

6. Un compuesto según la reivindicación 4 seleccionado del grupo formado por:

- Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-(dimetilamino)piridinio]. (EB-3D).

10

- Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-(pirrolidino)piridinio]. (EB-3AC).

15 7. Un compuesto según la reivindicación 5 seleccionado del grupo formado por:

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-[metil(fenil)amino]quinolinio]. (EB-3CM).

20

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-[(4-clorofenil)(metil)amino]quinolinio]. (EB-3CC).

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiil bis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[7-cloro-4-[metil(fenil)amino]quinolinio]. (EB-3DM).

25

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[7-cloro-4-[(4-clorofenil)(metil)amino]quinolinio]. (EB-3C).

30

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[7-Cloro4-(1azepanil)quinolinio]. (EB-3DC).

- Dibromuro de 1,1'-[1,2-etanodiilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-(1-pirrolidinil)quinolinio]. (EB-3P).

8. Un compuesto según la reivindicación 6 seleccionado del grupo formado por:

5

- Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-quinuclidinio]. (EB-3Q).

10

- (SS/RR y RS) Dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenillenometileno)]bis[4-(3-hidroxi)quinuclidinio]. (EB-3QO).

9. Procedimiento de preparación de compuestos según reivindicaciones 2 a 8 que comprende la preparación de una disolución del producto intermedio (IV) y la correspondiente piridina, quinolina 4-sustituida o quinucidina en acetonitrilo.

15

10. Procedimiento de preparación del compuesto de la fórmula general (III) que comprende hacer reaccionar una mezcla en de p-hidroxitolueno, 1,2-dibromoetano, NaOH y Etanol utilizando el microondas.

20

11. Procedimiento de preparación del compuesto de la fórmula general (IV) que comprende hacer reaccionar 1,2-bis(p-toliloxi)etano (III), NBS y dibenzilperoxido con en CCl<sub>4</sub> utilizando el microondas.

25

12. Procedimiento de preparación del compuesto de la fórmula general (V) que comprende hacer reaccionar 4,7-dicloroquinolina y el aminoderivado utilizando el microondas.

30

13. Procedimiento de preparación del compuesto de la fórmula general (VI) que comprende hacer reaccionar 4-hidroxiquinolina, cloruro de fosforilo y el aminoderivado correspondiente utilizando el microondas.

35

14. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de un medicamento.

15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de un medicamento antitumoral.
- 5 16. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por la enzima colina cinasa (ChoK).
- 10 17. Uso de un compuesto, según la reivindicación anterior, donde la enfermedad o afección sea cáncer.
- 15 18. Uso del compuesto según reivindicación anterior para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer de cérvix.
- 20 19. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de adenocarcinoma de colon.
- 25 20. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de Leucemia
- 30 21. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de carcinoma mamario
22. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de carcinoma de próstata
23. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de carcinoma no microcítico de pulmón.
24. Uso del compuesto según reivindicación 17, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de hepatoma humano
25. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de al menos uno de los compuestos de Fórmula general (I) o cualquiera de sus tautómeros, estereoisómeros, sales, solvatos,

hidratos o profármacos según reivindicaciones 1 a 8 y al menos un transportador, coadyuvante o vehículo aceptable farmacológicamente.

5



21 N.º solicitud: 201400466

22 Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2014

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | 56 Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | ES 2237332 A1 (CSIC Y UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16-07-2005, todo el documento  | 1-25                       |
| A         | J CAMPOS et al, BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY 2002, vol 10, págs 2215-2231. "Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds", todo el documento | 1-25                       |
| A         | J CAMPOS et al, II Farmaco 2003, vol 58, págs 221-229. "Anticancer bisquaternary heterocyclic compounds: a ras-ional design"   | 1-25                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.07.2014

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D213/74** (2006.01)

**C07D215/42** (2006.01)

**C07D453/02** (2006.01)

**A61K31/4409** (2006.01)

**A61K31/4706** (2006.01)

**A61K31/439** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.07.2014

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-25 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-25 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | ES 2237332 A1 (CSIC Y UNIVERSIDAD DE GRANADA)  | 16.07.2005        |
| D02       | J CAMPOS et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2002, vol 10, págs 2215-2231. "Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds", todo el documento | 2002              |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a los compuestos simétricos de fórmula (I) de la reivindicación 1, siendo el radical R1 el catión del anillo de piridina, quinolina o quinuclidina (reivindicaciones 2-8). Las reivindicaciones 9-13 se refieren al procedimiento para la preparación de los citados compuestos, la reivindicación 25 a la composición farmacéutica que los comprende y las reivindicaciones 14-24 al uso de estos compuestos para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades mediadas por la enzima colina kinasa.

El documento D1 se considera el más próximo del estado de la técnica, divulga compuestos de fórmula (I) (ver reivindicaciones de D1), el documento D2 divulga también sales bicuaternarias simétricas, estos compuestos se diferencian de los de la solicitud en el espaciador de los dos grupos catiónicos, ver reivindicación 6 de D1 y tabla 5 de D2.

Los compuestos de fórmula (I) de la solicitud no se han encontrado divulgados en el estado de la técnica, luego son nuevos; por otra parte se consideran inventivos pues para un técnico en la materia no resulta obvio introducir un átomo de oxígeno entre el anillo de fenilo y el metileno del espaciador y no resulta evidente, sin disponer de los datos experimentales correspondientes, que los nuevos compuestos puedan ser mejores inhibidores de ChoK.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 1-25 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.