



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 303 444**

② Número de solicitud: 200601538

⑤ Int. Cl.:
C07D 313/08 (2006.01)
C07D 327/02 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **24.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

Fecha de la concesión: **18.03.2009**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2009**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real, Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES
Universidad de Jaén**

⑱ Inventor/es: **Campos Rosa, Joaquín;
Espinosa Úbeda, Antonio;
Gallo Mezo, Miguel Ángel;
Gómez Vidal, José Antonio;
Núñez Carretero, María del Carmen;
Aránega Jiménez, Antonia;
Marchal Corrales, Juan Antonio y
Rodríguez Serrano, Fernando**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepin-3-il)purinas con actividad antitumoral.**

㉑ Resumen:
(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepin-3-il)purinas con actividad antitumoral que encuentran aplicación en el tratamiento de tumores en animales y seres humanos, así como un método para la preparación de los compuestos de la invención.

ES 2 303 444 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepin-3-il)purinas con actividad antitumoral.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con compuestos con propiedades antitumorales frente a los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos, así como con un método para la preparación de los compuestos de la invención.

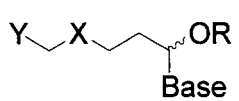
10 **Antecedentes de la invención**

En 2004 en Europa, había una estimación de 2.886.800 casos de cánceres diagnosticados y 1.711.00 de muertes causadas por el cáncer. El tipo de cáncer con mayor incidencia era el de pulmón (13,3% de todos los cánceres), seguido por el colorrectal (13,2%) y el de mama (13%). El cáncer de pulmón era el que produjo el mayor número de muertes (341.800), seguido por el colorrectal (203.700), estómago (137.900) y el de mama (129.900). Con una estimación de 2,9 millones de nuevos casos (54% en hombres y 46% en mujeres) y 1,7 millones de muertes (56% en hombres, 44% en mujeres) cada año, el cáncer sigue siendo un problema de salud pública de primera índole en Europa. Por otra parte, el envejecimiento de la población europea hará que estas cifras, incluso, aumenten, aún cuando los porcentajes por grupos de edad permanezcan constantes [Boyle, P.; Ferlay, J. *Annals of oncology*: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO, **2005**, *16*, 481-488].

En la actualidad, la investigación sobre terapia anticancerosa incluye, de forma muy general, las siguientes estrategias para la supresión farmacológica de fenotipos celulares malignos:

- Terapias de inhibición en la síntesis del ADN: Provocan la muerte celular debido a la detención del metabolismo, crecimiento y proliferación celular (terapias citotóxicas).
- Terapias que producen lesiones en el ADN, capaces de activar los procesos fisiológicos que conducen a la apoptosis.
- Terapias que actúan a nivel de ciclo celular, sobre proteínas reguladoras o efectoras: Esta aproximación busca la detención del ciclo, principalmente en su fase G₁, desde donde la célula puede proceder a su diferenciación. No se trata de producir la muerte celular sino la reversión del fenotipo maligno.

Los antimetabolitos pertenecen al primer grupo de fármacos. Su misión consiste en bloquear la síntesis del ADN mediante la inhibición de enzimas implicadas en su replicación [Gómez-Vidal, J. A.; Campos, J.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H.; Gallo, M. A.; Carrillo, E.; Espinosa, A.; Aránega, A. *Curr. Topics Med. Chem.* **2004**, *4*, 175-202]. Entre ellos, el 5-fluorouracilo (5-FU) se utiliza en el tratamiento de tumores sólidos, especialmente en aquellos del tracto gastrointestinal. Sin embargo, el 5-FU provoca graves efectos tóxicos derivados de su distribución en médula ósea, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central y piel. Con el objeto de aumentar la selectividad de este fármaco por los tejidos tumorales y disminuir así sus efectos colaterales, se han diseñado numerosos derivados en los que se une a fragmentos estructurales que actúan como transportadores hasta el lugar de acción. Entre estos derivados destaca el ftorafur [1-(2-tetrahidrofuranil)-5-fluorouracilo], que es dos veces más potente y cinco veces menos tóxico que el 5-FU. Sin embargo, aún era necesaria una mejora en su selectividad.

		R	X	Y	Base	
50		1	ⁱ Pr	O	CH ₂ OH	5-FU
		2	ⁱ Pr	S	CH ₂ OH	5-FU
		3	Me	O	CH ₂ OTs	5-FU
55		4	Me	O	CH ₂ Cl	5-FU
		5	Me	O	COOMe	5-FU
		6	ⁱ Pr	O	CH=CH ₂	Adenina
60		7	ⁱ Pr	O	CH=CH ₂	Uracilo
		8	ⁱ Pr	O	CH=CH ₂	5-FU
		9	ⁱ Pr	O	CH(OH)CH ₂ OH	5-FU
65		10	Me	O	CH(OH)CH ₂ Cl	5-FU
		11	Me	O	CH(OMe)5FU	5-FU

ES 2 303 444 B2

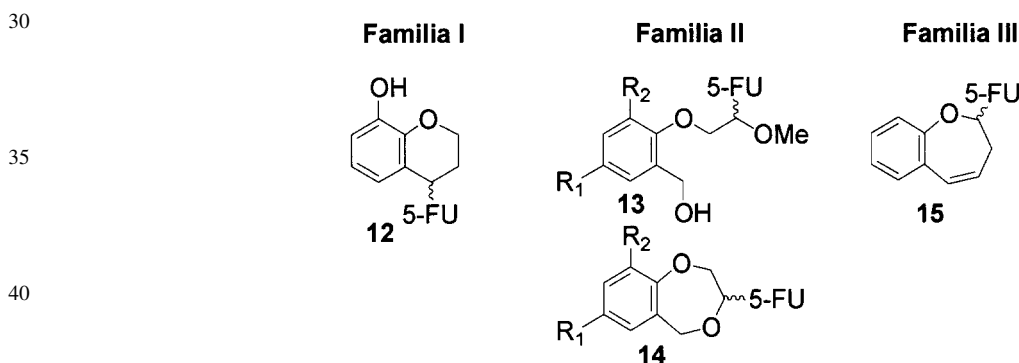
En el año 1996 se publicó la síntesis y las propiedades antiproliferativas de *O,N*-acetales de naturaleza aciclonucleosídica con estructura general de 1-[3-(2-hidroxiethylhetero)-1-alcoxipropil]-5-fluorouracilos (ver compuestos 1 y 2) [Campos, J.; Pineda, M. J.; Gómez, J. A.; Entrena, A.; Trujillo, M. A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8907-8924].

5 Los compuestos 1 y 2 presentaron una actividad *in vitro* superior a la del 5-FU frente a determinadas líneas tumorales. El primero de ellos, con una CI_{50} alrededor de 22 μM , frente a células de carcinoma humano de laringe HEP-2 (aproximadamente dos veces menor que la del 5-FU). El segundo de ellos, con CI_{50} de 9,4, 3,9 y 5,8 μM frente a las líneas tumorales CX-1 (carcinoma de colon humano), MX-1 (carcinoma humano de mama) y LZ-1 (carcinoma humano de pulmón).

15 Los compuestos con el grupo hidroxilo bloqueado, y por tanto no fosforilables, se diseñaron para actuar como profármacos de 5-FU. Su hidrólisis en los tejidos tumorales libera dos sustancias citotóxicas, 5-FU y acroleína. Los ensayos de actividad citotóxica de estos compuestos sobre células HT-29 (carcinoma humano de colon) mostraron como más interesante el compuesto 10 ($CI_{50} = 70 \mu M$) que, aún así, es ocho veces menos activo que el 5-FU. En un estudio sobre la capacidad diferenciadora en cultivos de células RD (rabdomyosarcoma humano), tanto 10 como 5-FU produjeron un incremento de ciertos marcadores de diferenciación (tales como desmina, α -actinina y tropomiosina) más acusado en 10 que, además, mostró menor toxicidad celular que el 5-FU.

20 Una aproximación posterior, consistió en el aumento de la lipofilia mediante la incorporación de anillos aromáticos en determinadas posiciones de estas estructuras [Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467; Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Boulaiz, H.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8017-8026]. Así, se prepararon varias familias de compuestos *O,N*-acetálicos.

25 El incremento de la lipofilia, tuvo como consecuencia una disminución en los valores de CI_{50} frente a células humanas de carcinoma de mama MCF-7, como se desprende de la comparación entre la actividad del compuesto 1, con una CI_{50} superior a 70 μM , y la de los compuestos 13a-d.



Compuestos cíclicos	R_1	R_2	Base	$CI_{50}(\mu M)$	Compuestos abiertos	R_1	R_2	Base	$CI_{50}(\mu M)$
5-FU				2,8	13a	H	H	5-FU	18,5
Ftorafur				3,0	13b	Cl	H	5-FU	18,0
12				69,0	13c	Br	H	5-FU	16,0
14a	H	H	5-FU	7,0	13d	NO ₂	H	5-FU	5,4
14b	H	H	Uracilo	5,0					
14c	OMe	H	5-FU	4,5					
14d	H	OMe	5-FU	22,0					
15	H	H	5-FU	14,0					

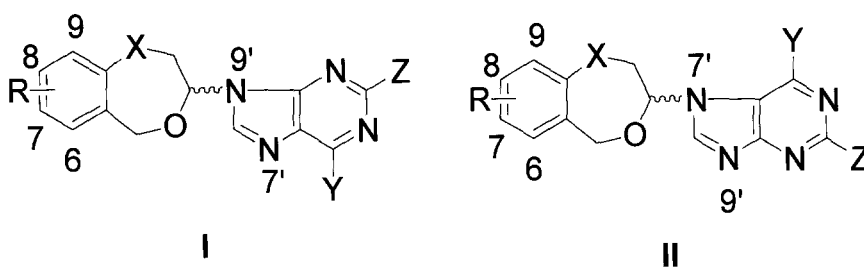
60 Sobre estos productos, se llevaron a cabo estudios de capacidad para inducir apoptosis. El paclitaxel (Taxol[®]), con un 43% de inducción en cultivos celulares de cáncer de mama, es uno de los pocos ejemplos conocidos de inductores de apoptosis ya que la mayoría de los fármacos citotóxicos la provocan únicamente en una pequeña fracción de las células tumorales. Cabe destacar que, entre los compuestos desarrollados, existen algunos que superaron el valor de inducción de apoptosis en cultivos celulares de cáncer de mama del paclitaxel a concentraciones iguales a las de sus CI_{50} s. Los más potentes inductores de apoptosis frente a la línea tumoral MCF-7 de cáncer de mama fueron los compuestos 12 (54,33 y 35,49% a las 24 y 48 h respectivamente), 13a (59,90% a las 24 h), 14d (40,08 y 46,73%), y 15 (57,33 y 51,37%).

Otro hecho muy importante en la actividad de estos compuestos, que indica el avance de la investigación en el grupo hacia terapias no citotóxicas, es su capacidad para acumular células en fases del ciclo celular distintas al 5-FU y su profármaco ftorafur. Éstos últimos retienen las células en fase S, donde es inhibida la enzima timidilato sintasa, mientras que los compuestos 12, 14a-d, y 15 lo hacen en fase G₀/G₁ y 13b o 13c en fase G₂/M (en detrimento de la población en fase S). Esto indica la capacidad de dichos compuestos para ser fármacos *per se* (a excepción de 13d, con un patrón semejante al 5-FU en la detención del ciclo celular).

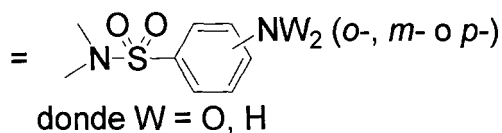
Los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación, que determinadas modificaciones en la estructura de los compuestos descritos en los antecedentes de esta invención, presentan una apreciable mejoría de la actividad antiproliferativa.

Breve descripción de la invención

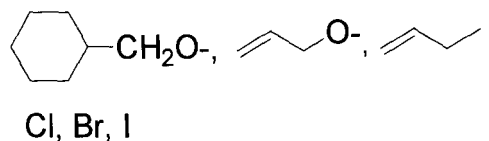
La invención proporciona en su primer objetivo una familia de compuestos que vienen representados, en función de su unión hemiaminámica, por las fórmulas I y/o II:



X = O
= S, SO₂



Y = Bn-, BnV-, PhV-, donde V = O, S



Z = H, Cl

R = grupos electrón-donantes (OH, OR, OMe, NH₂, NHCOR') y electrón-atrayentes (NO₂, CF₃, COR') en posiciones 7' y/o 9' del anillo benzénico fusionado

donde el grupo R puede ser un grupo electrón-donante (OH, OR, OMe, NH₂, NHCOR'), electrónicamente neutro (H, alquilo) o un grupo electrón-atrayente (NO₂, CF₃, COR') en posiciones 7' y/o 9'. Las estructuras se caracterizan por presentar un ciclo de siete miembros, fusionado a un anillo de benceno, con dos heteroátomos en posiciones relativas 1,4 y unido a través de su posición 3 al átomo de nitrógeno en posición 9' (compuesto tipo I) o a través de la posición 7' (compuesto tipo II) de una base púrica. Los compuestos de esta familia presentan niveles muy bajos de toxicidad.

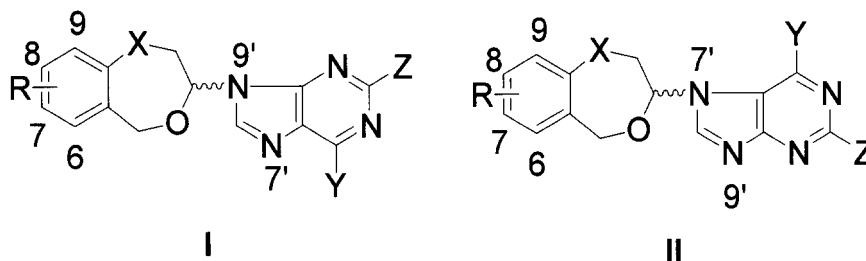
En un segundo objetivo, la invención proporciona el empleo de los compuestos de fórmula I y II en ensayos clínicos sobre pacientes con cáncer.

Un objetivo adicional de la invención consiste en proporcionar formulaciones farmacéuticas que comprendan al menos un compuesto de fórmula I y/o II.

La invención proporciona, en otro objeto, un método para la preparación de los compuestos de fórmula I y/o II.

Descripción detallada de la invención

En su primer objetivo la invención proporciona una familia de compuestos que responden, en función de su unión hemiaminámica, a la fórmula general I y/o II:



donde,

X representa un átomo de oxígeno, azufre o un grupo sulfonilo, un grupo bencensulfanilamino sustituido en posiciones *orto*, *meta* o *para* por un grupo nitro o amino, o un grupo fluorenilmetil carbamato (Fmoc-N_{terciario});

Y representa un radical seleccionado del grupo formado por restos bencilo (mono- o disustituidos), benciloxi (mono- o di-sustituidos), fenoxi (mono- o di-sustituidos), feniltio (mono- o di-sustituidos), ciclohexilmetilén-oxi, aliloxi, alilo, cloro, bromo o yodo;

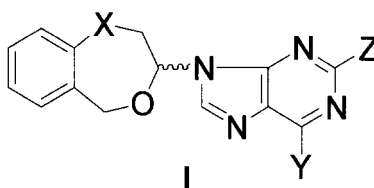
Z representa un hidrógeno o un átomo de cloro;

R representa bien un radical seleccionado del grupo formado por H, alquilo, un grupo electrón-donante como hidroxilo, alcoxilo, amino, acilamino, o un grupo electrón-atrayente como un halógeno, trifluorometilo, acilo, en las posiciones 7' y/o 9' del anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros.

Los compuestos pertenecientes a la familia I y II, además de actuar como agentes antiproliferativos frente a diversas estirpes de cánceres, se caracterizan por presentar niveles de toxicidad mínimos frente a las líneas celulares sanas [línea epitelial de mama normal (MCF-10A) e intestinal de rata (IEC-6)].

Los compuestos tipo I de la invención se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1

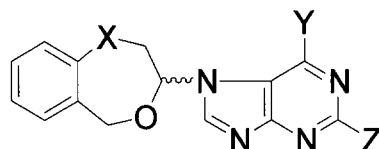


Nº	Código	X	Y	Z
16	MB-90A	O	Cl	H
17	BDM-69C	O	Br	H
18	BDM-185A	O	I	H
19	KS-171C	O	CF ₃	H
20	KS-47A	O	Cl	Cl
21	MN-84D	S	Cl	H
22	MN-92B	SO ₂	Cl	H

ES 2 303 444 B2

Los compuestos tipo II de la invención se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2



II

Nº	Código	X	Y	Z
23	MB-90B	O	Cl	H
24	KS-193B	O	I	H
25	KS-171D	O	CF ₃	H
26	KS-47B	O	Cl	Cl
27	MN-116B	S	Cl	H
28	MN-80C	SO ₂	Cl	H

En un segundo objetivo, la invención proporciona el empleo de los compuestos de fórmula I y/o II en medicina. Concretamente, se reivindican los compuestos de fórmula I y/o II para su uso en medicina. En una realización particular, la invención proporciona los compuestos de fórmula I y/o II para el tratamiento del cáncer, preferentemente de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos.

Por otra parte, se reivindica el empleo de un compuesto de fórmula I y/o II en la elaboración de un medicamento. En una realización particular, los compuestos de fórmula I y/o II se emplean en la elaboración de un medicamento para el cáncer, preferentemente de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos.

En su tercer objetivo, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo al menos un compuesto de fórmula I y/o II. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden contener uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dichas formulaciones puede contener cualquier otro ingrediente activo que tenga propiedades anticancerosas.

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

La invención también proporciona un método para la preparación de los compuestos de fórmula I y II: el procedimiento comprende mezclar el derivado (RS)-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-1,4-benzodiheteroepínico con la base púrica, ácido de Lewis, trimetilclorosilano, 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano en acetonitrilo seco a una temperatura comprendida entre -5 y 5°C en atmósfera de argón, y tras dejar que alcance la suspensión la temperatura ambiente, se calienta la suspensión a una temperatura comprendida entre 40 y 45°C durante 16-24 h. En el procedimiento para la obtención de los (RS)-9- ó 7-(1,1-dioxo-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepin-3-il)-9H- ó -7H-purinas sustituidas se puede llevar a cabo la preparación de las dos formas siguientes: (a) por condensación entre el (RS)-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepino y la purina sustituida, de acuerdo con el procedimiento especificado arriba, y posterior oxidación del átomo de azufre en el compuesto condensado con Oxone®, tal como de detalla en la síntesis del compuesto (RS)-1,1-dioxo-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepino o del compuesto 22, código MN/92B; y (b) por condensación entre el compuesto oxidado previamente como el (RS)-1,1-dioxo-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepino y la purina sustituida.

*Cultivos celulares**Línea celular*

- 5 La línea celular humana derivada de cáncer de mama MCF-7 fue proporcionada por el Dr. N. Olea del Instituto de Biología Tumoral Sánchez Mora del Hospital Universitario de Granada.

Condiciones de cultivo

- 10 Los cultivos de células se realizaron en cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) bajo condiciones de esterilidad. Los frascos de cultivo estériles (Falcons de 25 u 80 cm² de superficie útil) se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera al 5% de CO₂ y 90% de humedad. Durante el cultivo celular, las células tuvieron que ser resemebradas en nuevos Falcons conforme se alcanzaba la saturación, despegándolas de la superficie de los frascos de cultivo mediante una solución de PBS-EDTA (0,02%) o de Tripsina (10x). Después se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos y lavadas
15 dos veces con PBS, resuspendiéndolas en medio de cultivo.

- Para el cultivo se utilizó el medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM) (Gibco, EE UU) (13,37 g de medio base), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow, Reino Unido) en calor húmedo entre 50 y 60°C durante 30 minutos. El medio se tamponó con NaHCO₃ y buffer Hepes (Flow) 1M pH 7,2 y se suplementó con 40
20 mg/L de gentamicina (Antibióticos S. A.), 500 mg/L de ampicilina (Antibióticos S. A.), 20 mL de L-glutamina (Flow) 200 mM y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 mL. Una vez preparado el medio de cultivo, se filtró con filtros Millex estériles de 0,22 μM (Millipore, Francia) y se añadió a los frascos.

Método de congelación celular

- 25 Para la congelación celular, las células se despegaron de la superficie de los Falcons mediante una solución de PBS-EDTA (0,02%) o de Tripsina (10x), centrifugadas a 600 g durante cinco minutos y lavadas dos veces con PBS. El pellet celular se resuspendió en medio de congelación a razón de 0,5 x 10⁶ células por mL siendo introducidas inmediatamente en criotubos y éstos en el congelador a -80°C durante 24 h, siendo almacenadas definitivamente en
30 nitrógeno líquido tras este período.

Medio de congelación: suero fetal bovino (Sigma, S. L.), inactivado en calor húmedo durante 30 minutos, y dime-tilsulfoxido (DMSO).

- 35 *Método de descongelación celular*

- La línea celular MCF-7 criopreservada en nitrógeno líquido se descongeló en calor húmedo. Inmediatamente después, las células se resuspendieron en PBS estéril, siendo centrifugadas a 1500 rpm durante cinco minutos, repitiéndose el proceso dos veces para eliminar los restos de DMSO. El pellet se resuspendió en medio de cultivo previamente
40 filtrado y las células se depositaron en frascos de cultivo.

Modos de realización

- 45 Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración de la presente invención:

- Compuestos 16 [*código MB-90A, (RS)-6-cloro-9-(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodioxepin-3-il)-9H-purina*] y 23 [*código MB-90B, (RS)-6-cloro-7-(2,3-dihidro-5H-1,4-benzodioxepin-3-il)-7H-purina*]: SnCl₄/CH₂Cl₂ (6,66 mL, 3,63 mmoles) en acetonitrilo seco (6 mL) se adiciona con jeringa, bajo atmósfera de argon, a una suspensión de (RS)-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-1,4-benzodioxepino [Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467] (1 g, 5,55 mmoles), 6-cloropurina (857 mg, 5,54 mmoles), que contiene trimetilclorosilano (0,55 mL, 4,35 mmoles) y 1,1,1,3,3,3-hexametilidisilazano (0,88 mL, 4,22 mmoles) en acetonitrilo seco (22 mL) a 0°C. Después de 10 min. a 0°C, la suspensión se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y se calentó a 45°C durante 16 h. Tras enfriamiento, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL), y se añadió NaHCO₃ hasta que el pH fuese neutro. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 mL) y la fase orgánica se seca (Na₂SO₄). Tras filtración, el disolvente se eliminó al rotavapor y el residuo se purifica mediante cromatografía flash utilizando una mezcla de EtOAc/hexano: 6/4 como eluyente. La primera fracción pesó 380 mg (22,6%) con el aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 16, código MB-90A; pf.: 133-134°C. R_f (EtOAc): 0,42. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,78 (s, 1H, H_{pur}); 8,44 (s, 1H, H_{pur}); 7,31 (dt, 1H, J = 1,4, 7,5 Hz, H_{arom}); 7,22 (d, 1H, J = 7,5 Hz, H_{arom}); 7,12 (d, 1H, J = 8,6 Hz, H_{arom}); 7,11 (t, 1H, J = 7,5 Hz, H_{arom}); 6,32 (dt, 1H, J = 2,2, 6,2 Hz, H-3); 4,89 (s, 2H, H-5); 4,62 (dd, 1H, J = 2,2, 13,0 Hz, H-2); 4,43 (dd, 1H, J = 6,2, 13,0 Hz, H-2). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 158,79; 154,67; 152,44; 151,58; 143,88; 137,41; 132,75; 124,38; 129,36; 130,13; 129,36; 84,17; 73,57; 69,10. HR LSIMS (matriz NOBA) calculado para C₁₄H₁₁ClN₄O₂Na (M + Na)⁺: 325,0468; encontrado: 325,0468. Análisis para C₁₄H₁₁ClN₄O₂: Calculado: C 55,55; H 3,66; N 18,51. Encontrado: C 55,63; H 3,80; N 18,46.

- 65 La segunda fracción pesó 290 mg (17,3%) con aspecto de polvo blanco amorfo y se identificó como 23, código MB-90B; pf.: 138-139°C. R_f (EtOAc): 0,17. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,90 (s, 1H, H_{pur}); 8,70 (s, 1H, H_{pur}); 7,31 (dt, 1H, J = 1,6, 7,7 Hz, H_{arom}); 7,22 (d, 1H, J = 7,2 Hz, H_{arom}); 7,13 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H_{arom}); 7,10 (t, 1H, J = 7,5 Hz,

ES 2 303 444 B2

H_{arom}); 6,55 (dd, 1H, *J* = 2,2, 5,2 Hz, H-3); 4,80 (dd, *J* = 9,0, 14,0 Hz, 2H, H-5); 4,66 (dd, 1H, *J* = 2,2, 13,1 Hz, H-2); 4,40 (dd, 1H, *J* = 5,3, 13,0 Hz, H-2). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 162,07; 158,72; 152,98; 147,61; 143,26; 130,32; 130,26; 129,45; 124,66; 120,80; 85,08; 74,09; 68,42. HR LSIMS (matriz NOBA) calculado para C₁₄H₁₁ClN₄O₂Na (M + Na)⁺: 325.0468; encontrado: 325.0468. Análisis para C₁₄H₁₁ClN₄O₂: Calculado: C 55,55; H 3,66; N 18,51.
 5 Encontrado: C 55,43; H 3,90; N 18,86.

Compuesto 17 [código BDM-69C, (*RS*)-6-bromo-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina]: SnCl₄/CH₂Cl₂ (1,16 mL, 1,11 mmoles) en acetonitrilo seco (3 mL) se adiciona con jeringa, bajo atmósfera de argón, a una suspensión de (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepino [Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467] (0,200 g, 1,11 mmoles), 6-bromopurina (0,221 g, 1,11 mmoles), que contiene trimetilclorosilano (143 μL, 1,11 mmoles) y 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (233 μL, 1,11 mmoles) en acetonitrilo seco (3 mL) a 0°C. Después de 10 min. a 0°C, la suspensión se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y se calentó a 45°C durante 24 h. Tras enfriamiento, la mezcla de reacción se neutralizó con una solución acuosa al 5% de NaHCO₃. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) y la fase orgánica se seca (Na₂SO₄). Tras filtración, el disolvente se eliminó al rotavapor y el residuo se purifica mediante cromatografía flash utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH: 9,8/0,2 como eluyente. La fracción pesó 0,063 mg (16,4%) con el aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 17, código BMD-69C; pf: 153-154°C. R_f (CH₂Cl₂/MeOH: 9,5/0,5): 0,56. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,72 (s, 1H, H_{pur}); 8,45 (s, 1H, H_{pur}); 7,31 (dt, 1H, *J* = 1,8, 7,2 Hz, H_{arom}); 7,21 (dd, 1H, *J* = 1,8, 7,2 Hz, H_{arom}); 7,12 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H_{arom}); 7,08 (dt, 1H, *J* = 1,2, 7,2 Hz, H_{arom}); 6,31 (dd, 1H, *J* = 2,4, 6,2 Hz, H-3); 4,89 (s, 2H, H-5); 4,63 (dd, 1H, *J* = 2,4, 13,0 Hz, H-2); 4,43 (dd, 1H, *J* = 6,2, 13,0 Hz, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 158,56; 153,20; 153,13; 150,77; 144,53; 144,40; 135,05; 130,90; 130,13; 125,15; 121,54; 84,97; 74,33; 69,88. HR LSIMS (matriz NOBA) calculado para C₁₄H₁₁BrN₄O₂Na (M + Na)⁺: 368,9963; encontrado: 368,9962. Análisis para C₁₄H₁₁BrN₄O₂: Calculado: C 48,43; H 3,19; N 16,14. Encontrado: C 48,54; H 3,13; N 16,46.
 25

Compuestos 18 [código BDM-185A, (*RS*)-6-iodo-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina] y 24 [código KS-193B, (*RS*)-6-iodo-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina]: SnCl₄/CH₂Cl₂ (4,4 mL, 4,25 mmoles) se adicionan con jeringa, bajo atmósfera de argón, a una suspensión de (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepino [Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467] (0,3 g, 1,7 mmoles), 6-iodopurina [Elion, G. B.; Hitchings, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3508-3510]. (420 mg, 1,7 mmoles), que contiene trimetilclorosilano (218 μL, 1,7 mmoles) y 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (350 μL, 1,7 mmoles) en acetonitrilo seco (5 mL) a 0°C. Después de 10 min. a 0°C, la suspensión se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y se calentó a 45°C durante 20 h. Tras enfriamiento, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL), y se añadió una solución acuosa al 5% de NaHCO₃ hasta que el pH fuese neutro. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (4 x 20 mL) y la fase orgánica se seca (Na₂SO₄). Tras filtración, el disolvente se eliminó al rotavapor y el residuo se purifica mediante cromatografía flash utilizando una mezcla en gradiente de EtOAc/hexano (2/8 → 4/6 → 6/4) como eluyente. La primera fracción pesó 54,5 mg (8,5%) con el aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 18, código BDM-185A; pf: 137-138°C. R_f (EtOAc/hexano: 6/4): 0,41. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (s, 1H, H_{pur}); 8,44 (s, 1H, H_{pur}); 7,30 (dt, 1H, *J* = 1,8, 7,0 Hz, H_{arom}); 7,21 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, H_{arom}); 7,12 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H_{arom}); 7,10 (dt, 1H, *J* = 1,1, 8,3 Hz, H_{arom}); 6,28 (dd, 1H, *J* = 2,3, 6,3 Hz, H-3); 4,88 (s, 2H, H-5); 4,61 (dd, 1H, *J* = 2,3, 13,0 Hz, H-2); 4,41 (dd, 1H, *J* = 6,3, 13,0 Hz, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 158,72; 152,33; 147,39; 143,14; 138,56; 130,11; 130,06; 129,31; 124,30; 122,47; 120,72; 84,11; 73,49; 69,06. Análisis para C₁₄H₁₁I₂N₄O₂: Calculado: C 42,66; H 2,81; N 14,21. Encontrado: C 42,63; H 2,80; N 14,48.
 35

La segunda fracción pesó 95,7 mg (15%) con aspecto de polvo blanco amorfo y se identificó como 24, código KS-193B; pf: 133-134°C. R_f (EtOAc/hexano: 6/4): 0,17. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,90 (s, 1H, H_{pur}); 8,70 (s, 1H, H_{pur}); 7,30 (m, 1H, H_{arom}); 7,20 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H_{arom}); 7,10 (m, 2H, H_{arom}); 6,54 (dd, 1H, *J* = 2,3, 5,3 Hz, H-3); 4,82 (d, 14,0 Hz, 1H, H-5); 4,77 (d, 14,0 Hz, 1H, H-5); 4,66 (dd, 1H, *J* = 2,2, 13,2 Hz, H-2); 4,42 (dd, 1H, *J* = 5,3, 13,2 Hz, H-2). Análisis para C₁₄H₁₁I₂N₄O₂: Calculado: C 42,66; H 2,81; N 14,21. Encontrado: C 42,55; H 2,69; N 14,03.
 50

Otro método para la obtención de 18 [código BDM-185A, (*RS*)-6-iodo-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina]. Se disolvieron la (*RS*)-6-cloro-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina (16, código MB-90A, 0,25 g, 0,88 mmoles), yoduro sódico (2,64 g, 17,6 mmoles) y ácido trifluoroacético (0,34 mL, 4,4 mmoles) en butanona (20 mL) y se dejó esta solución en agitación en el intervalo -40°C y -50°C durante 5 h. A continuación se neutralizó la solución con NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂. Se redujo el yodo con una disolución acuosa saturada de Na₂SO₃ y se lavó la fase orgánica con Na₂SO₄. Se purificó el crudo por cromatografía flash (elución en gradiente con EtOAc/hexano: 1/9 → 2/8 → 3/7 → 7/3). Finalmente se recrystalizó el producto 16, código MB-90A de etanol (0,104 g, 30% de rendimiento).
 55

Otro método para la obtención de 24 [código KS-193B, (*RS*)-6-iodo-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina]. Se disolvieron la (*RS*)-6-cloro-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina (23, código MB-90B, 0,3 g, 1,06 mmoles), yoduro sódico (3,17 g, 21,1 mmoles) y ácido trifluoroacético (0,4 mL, 5,3 mmoles) en butanona (24 mL) y se dejó esta solución en agitación en el intervalo -40°C y -50°C durante 5 h. A continuación se neutralizó la solución con NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂. Se redujo el yodo con una disolución acuosa saturada de Na₂SO₃ y se lavó la fase orgánica con Na₂SO₄. Se purificó el crudo por cromatografía flash (elución en gradiente con EtOAc/hexano: 4/6 → 6/4 → 7/3). Finalmente se recrystalizó el producto 24, código KS-193B de etanol (0,117 g, 28% de rendimiento).
 65

ES 2 303 444 B2

Compuestos 19 [código KS-171C, (*RS*)-6-trifluorometil-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina] y 25 [código KS-171 D, (*RS*)-6-trifluorometil-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina] obtenidos a partir de 18, código BDM-185A: Una mezcla de 18, código BDM-185A, (*RS*)-6-iodo-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina (0,188 g, 0,5 mmoles), trifluorometil-trimetilsilano (0,1 mL, 0,7 mmoles), fluoruro potásico (0,041 g, 0,7 mmoles), yoduro de cobre (I) (0,152 g, 0,8 mmoles), dimetilformamida (0,5 mL) y *N*-metilpirrolidona (0,5 mL) se agitó a 60°C durante 24 h. Después del enfriamiento a temperatura ambiente de la mezcla, los disolventes se eliminaron al rotavapor y se purificó el crudo de la reacción mediante cromatografía flash (elución en gradiente con EtOAc/hexano: 2/8 → 3/7). La primera fracción pesó 80,3 mg (49%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 19; pf: 70-71°C. R_f(EtOAc/hexano = 6/4): 0,43. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 9,10 (s, 1H, H_{pur}); 8,60 (s, 1H, H_{pur}); 7,31 (m, 1H, H_{arom}); 7,23 (m, 1H, H_{arom}); 7,12 (m, 2H, H_{arom}); 6,39 (dd, 1H, *J* = 2,3, 6,2, H-3); 4,93 (d, 1H, *J* = 17,7, H-5); 4,90 (s, 2H, H-5); 4,66 (dd, 1H, *J* = 2,4, 13,0, H-2); 4,44 (dd, 1H, *J* = 6,2, 13,0, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 158,74; 153,20; 152,36; 145,97; 145,50; 130,14; 130,02; 129,34; 124,39; 122,53; 120,75; 84,09; 73,48; 69,17. Análisis para C₁₅H₁₁F₃N₄O₂: Calculado: C 53,58; H 3,30; N 16,66. Encontrado: C 53,42; H 3,59; N 16,42.

La segunda fracción pesó 32,5 mg (20%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 25, código KS-171D; pf: 126-127°C. R_f(EtOAc/hexano = 6/4): 0,34. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 9,10 (s, 1H, H_{pur}); 8,60 (s, 1H, H_{pur}); 7,33 (m, 1H, H_{arom}); 7,23 (m, 1H, H_{arom}); 7,13 (m, 2H, H_{arom}); 6,40 (dd, 1H, *J* = 2,3, 6,2, H-3); 4,91 (dd, 1H, *J* = 3,7, 14,1, H-5); 4,66 (dd, 1H, *J* = 2,3, 13,0, H-2); 4,44 (dd, 1H, *J* = 6,2, 13,0, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 158,78; 153,22; 152,39; 145,95; 145,46; 130,18; 130,06; 129,37; 124,43; 122,55; 120,79; 84,12; 73,54; 69,22. Análisis para C₁₅H₁₁F₃N₄O₂: Calculado: C 53,58; H 3,30; N 16,66. Encontrado: C 53,31; H 3,71; N 16,68.

Compuestos 19 [código KS-171C, (*RS*)-6-trifluorometil-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina] y 25 [código KS-171 D, (*RS*)-6-trifluorometil-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina] obtenidos a partir de 24, código BDM-193B: Una mezcla de 24, código BDM-193B, (*RS*)-6-iodo-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina (0,188 g, 0,5 mmoles), trifluorometil-trimetilsilano (0,1 mL, 0,7 mmoles), fluoruro potásico (0,041 g, 0,7 mmoles), yoduro de cobre (I) (0,152 g, 0,8 mmoles), dimetilformamida (0,5 mL) y *N*-metilpirrolidona (0,5 mL) se agitó a 60°C durante 24 h. Después del enfriamiento a temperatura ambiente de la mezcla, los disolventes se eliminaron al rotavapor y se purificó el crudo de la reacción mediante cromatografía flash (elución en gradiente con EtOAc/hexano: 2/8 → 3/7). La primera fracción pesó 8 mg (4%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 19.

La segunda fracción pesó 24 mg (14%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 25, código KS-171 D.

Compuestos 20 [código KS-47A, (*RS*)-2,6-dicloro-9-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-9*H*-purina] y 26 [código KS-47B, (*RS*)-2,6-dicloro-7-(2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepin-3-il)-7*H*-purina]: SnCl₄/CH₂Cl₂ (2,3 mL, 2,22 mmoles) se adiciona con jeringa, bajo atmósfera de argón, a una suspensión de (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzodioxepino [Saniger, E.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Marchal, J. A.; Suárez, I.; Aránega, A.; Choquesillo, D.; Niclós, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5457-5467] (0,200 g, 1,11 mmoles), 2,6-dicloropurina (210 mg, 1,11 mmoles), que contiene trimetilclorosilano (143 μL, 1,11 mmoles) y 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (2,33 μL, 1,11 mmoles) en acetonitrilo seco (3 mL) a 0°C. Después de 10 min. a 0°C, la suspensión se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y se calentó a 45°C durante 26 h. Tras enfriamiento, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL), y se añadió NaHCO₃ hasta que el pH fuese neutro. La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 mL) y la fase orgánica se secó (Na₂SO₄). Tras filtración, el disolvente se eliminó al rotavapor y el residuo se purificó mediante cromatografía flash utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH: 9,8/0,2 como eluyente. La primera fracción pesó 50 mg (13,4%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 20, código KS-47A; pf: 154-156°C. R_f(CH₂Cl₂/MeOH = 9,8/0,2): 0,42. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 8,43 (s, 1H, H_{pur}); 7,31 (m, 1H, H_{arom}); 7,23 (m, 1H, H_{arom}); 7,12 (m, 2H, H_{arom}); 6,29 (dd, 1H, *J* = 2,3, 6,1, H-3); 4,95 (d, 1H, *J* = 14,1, H-5); 4,95 (d, 1H, *J* = 14,1, H-5); 4,86 (d, 1H, *J* = 14,1, H-5); 4,63 (dd, 1H, *J* = 2,3, 13,1, H-2); 4,34 (dd, 1H, *J* = 6,1, 13,1, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 158,67; 153,51; 152,29; 144,42; 130,78; 130,15; 129,87; 129,32; 124,39; 120,76; 84,11; 73,46; 69,21. Análisis para C₁₄H₁₀Cl₂N₄O₂: Calculado: C 49,87; H 2,99; N 16,62. Encontrado: C 49,93; H 3,11; N 16,67.

La segunda fracción pesó 26 mg (7%) con aspecto de polvo amorfo blanco y se identificó como 26, código KS-47B; pf: 178-180°C. R_f(CH₂Cl₂/MeOH = 9,8/0,2): 0,27. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 8,74 (s, 1H, H_{pur}); 7,33 (m, 1H, H_{pur}); 7,23 (m, 1H, H_{arom}); 7,13 (m, 2H, H_{arom}); 6,50 (dd, 1H, *J* = 2,2, 5,0, H-3); 4,81 (d, 1H, *J* = 14,1, H-5); 4,76 (d, 1H, *J* = 14,1, H-5); 4,65 (dd, 1H, *J* = 2,2, 13,2, H-2); 4,44 (dd, 1H, *J* = 5,0, 13,2, H-2). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): 163,78; 158,68; 153,83; 149,09; 144,04; 130,34; 130,12; 129,48; 124,75; 120,79; 84,98; 73,85; 68,26. Análisis para C₁₄H₁₀Cl₂N₄O₂: Calculado: C 49,87; H 2,99; N 16,62. Encontrado: C 50,03; H 2,89; N 16,72.

Compuesto 21, [código MN-84D, (*RS*)-6-cloro-9-(2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatiepín-3-il)-9*H*-purina]. En un matraz bajo atmósfera de argón se adicionan a temperatura ambiente (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatiepino [Núñez, M. C.; Entrena, A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10363-10369] (0,5 g, 2,55 mmoles), 6-cloropurina (0,394 g, 2,55 mmoles), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (0,53 ml, 2,55 mmoles), trimetilclorosilano (0,33 mL, 2,55 mmoles) y triflato de escandio (1,25 g, 2,55 mmoles) en acetonitrilo anhidro (20 mL) y se calienta la suspensión a 45°C durante 24 h. Una vez que la solución resultante alcance la temperatura ambiente, se neutraliza (NaHCO₃), se concentra, se extrae (CH₂Cl₂) y una vez eliminado el disolvente se purifica mediante cromatografía flash (eluyente CH₂Cl₂/MeOH: 9,8/0,2) obteniéndose 21, código MN-84D con aspecto de sólido blanco amorfo (0,456 g, 56%); pf: 185-187°C. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ

ES 2 303 444 B2

(ppm) 8,76 (s, 1H, H_{pur}); 8,28 (s, 1H, H_{pur}); 7,65 (m, 1H, H_{arom}); 7,36 (m, 3H, H_{arom}); 6,29 (dd, $J = 3,3, 8,1$ Hz, 1H, H-3); 5,18 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H, H-5); 5,01 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H, H-5); 3,27 (m, $J = 6,1$ Hz, 2H, H-2). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 152,23; 151,42; 150,60; 142,79; 141,75; 135,82; 132,84; 131,77; 130,18; 129,20; 128,75; 87,77; 73,93; 39,19. Análisis para C₁₄H₁₁ClN₄O₃S: Calculado: C 52,75; H 3,48; N 17,58. Encontrado: C 52,81; H 3,21; N 17,79.

5

Compuesto 22, [código MN-92B, (*RS*)-6-cloro-9-(1,1-dioxo-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepin-3-il)-9H-purina]: A una solución del compuesto 21, código MN-84D (0,15 g, 0,47 mmoles) en metanol (7 mL), se adiciona gota a gota una solución de Oxone® (2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄, 0,58 g, 0,94 mmoles) en agua (3 mL) y se deja a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido dicho tiempo, se neutraliza con NaHCO₃, se concentra, se suspende en 15 ml de agua y se extrae con CH₂Cl₂. Una vez eliminado el disolvente se purifica mediante cromatografía flash (eluyente CH₂Cl₂/MeOH: 9,8/0,2) obteniéndose 22, código MN-92B con aspecto de sólido blanco (0,165 g, 100%); pf: 230-232°C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 8,77 (s, 1H, H_{pur}); 8,27 (s, 1H, H_{pur}); 8,18 (dd, $J = 1,0, 7,6$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,56 (dt, $J = 1,2, 7,6$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,64 (dt, $J = 1,0, 7,6$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,46 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H_{arom}); 6,66 (dd, $J = 1,5, 10,5$ Hz, 1H, H-3); 5,58 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H, H-5); 5,01 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H, H-5); 4,31 (dd, $J = 10,5, 14,0$ Hz, 1H, H-2); 3,98 (dd, $J = 1,5, 14,0$ Hz, 1H, H-2). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 152,55; 151,85; 150,76; 143,01; 139,32; 135,58; 134,63; 131,95; 131,32; 129,65; 128,43; 83,69; 72,09; 59,97. Análisis para C₁₄H₁₁ClN₄O₃S: Calculado: C 47,94; H 3,16; N 15,97. Encontrado: C 48,05; H 3,24; N 15,80.

10

15

Compuesto 27 [código MN-116B, 6-cloro-7-(2,3-dihidro-5H-1,4-benzoxatíepin-3-il)-7H-purina]. En un matraz bajo atmósfera de argón se adiciona a temperatura ambiente (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepino [Núñez, M. C.; Entrena, A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10363-10369] (0,25 g, 1,28 mmoles), 6-cloropurina (0,22 g, 1,40 mmol), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (0,27 ml, 1,28 mmoles) y trimetilclorosilano (0,16 mL, 1,28 mmoles) en acetonitrilo anhidro (4 mL); esta suspensión se enfría a -25°C y se adiciona gota a gota tetracloruro de estaño en CH₂Cl₂ (1 M, 1,53 mL, 1,28 mmoles) disueltos en 3 mL de acetonitrilo. La suspensión resultante se calienta a 45°C durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo y tras enfriamiento a temperatura ambiente, la solución resultante se neutraliza con NaHCO₃, se concentra, se extrae (CH₂Cl₂) y una vez eliminado el disolvente se purifica mediante cromatografía flash (eluyente CH₂Cl₂/MeOH: 9,9/0,1) obteniéndose 27, código MN-116B con aspecto de sirupo (0,032 g, 8%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 8,89 (s, 1H, H_{pur}); 8,43 (s, 1H, H_{pur}); 7,66 (m, 1H, H_{arom}); 7,35 (m, 3H, H_{arom}); 6,55 (dd, $J = 1,8, 9,4$ Hz, 1H, H-3); 5,18 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H, H-5); 5,02 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H, H-5); 3,33 (dd, $J = 1,8, 14,0$ Hz, 1H, H-2); 3,18 (dd, $J = 9,4, 14,0$ Hz, 1H, H-2). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 162,11; 152,83; 145,97; 142,91; 141,71; 135,42; 133,01; 130,19; 129,25; 128,90; 121,50; 89,36; 73,95; 39,80. Calculado: C 52,75; H 3,48; N 17,58. Encontrado: C 52,59; H 3,78; N 17,41.

20

25

30

Compuesto 28 [código MN-80C, (*RS*)-6-cloro-7-(1,1-dioxo-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepin-3-il)-7H-purina]. En un matraz bajo atmósfera de argón se adicionan a temperatura ambiente (*RS*)-1,1-dióxido-3-metoxi-2,3-dihidro-5H-4,1-benzoxatíepino (0,137 g, 0,60 mmoles), 6-cloropurina (0,101 g, 0,65 mmoles), 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (0,125 mL, 0,60 mmoles) y trimetilclorosilano (0,08 mL, 0,60 mmoles) en acetonitrilo anhidro (2 mL). Esta suspensión se enfría a -25°C y se adicionan gota a gota tetracloruro de estaño en CH₂Cl₂ (1 M, 0,72 mL, 0,72 mmoles) disueltos en acetonitrilo (2 mL). La suspensión se calienta a 45°C durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, la solución resultante se neutraliza (NaHCO₃), se concentra, se extrae (CH₂Cl₂, 3 x 20 mL) y una vez eliminado el disolvente se purifica mediante cromatografía flash (eluyente, CH₂Cl₂/MeOH: 9,8/0,2) obteniéndose 28, código MN-80C con aspecto de sólido blanco amorfo (0,018 g, 9%); pf: 196-197°C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 8,89 (s, 1H, H_{pur}); 8,41 (s, 1H, H_{pur}); 8,13 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,67 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,61 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H_{arom}); 7,43 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H_{arom}); 6,97 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-3); 5,55 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H, H-5); 4,99 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H, H-5); 3,98 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, H-2). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 161,81; 153,16; 145,89; 143,36; 138,93; 135,53; 134,79; 131,28; 129,68; 128,46; 121,50; 84,41; 71,81; 60,60. Análisis para C₁₄H₁₁ClN₄O₃S: Calculado: C 47,94; H 3,16; N 15,97. Encontrado: C 48,04; H 3,11; N 15,77.

35

40

45

50 Tratamiento de la línea celular MCF-7 con los fármacos

Se siguió el siguiente protocolo: las células fueron despegadas de la superficie de los frascos de cultivo con PBS-EDTA (0,02%) o PBS-tripsina (10x) a 37°C, y se lavaron dos veces con PBS a una temperatura entre 0 y 10°C mediante centrifugación a 600 g durante 5 minutos. A continuación se diluyeron en medio Dubelcco's Eagle suplementado con suero fetal bovino hasta obtener cultivos de 5 x 10⁶ células. A partir de este momento se llevó a cabo la inducción con los fármacos añadiendo las concentraciones deseadas de cada uno de ellos, permaneciendo en contacto con las células durante seis días. Se utilizaron como control en cada experimento cultivos paralelos de células MCF-7 sin fármacos. El medio de ambos cultivos, control y los tratados con los fármacos, fue reemplazado cada 48 h.

55

60 Cálculo de las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀)

Tras la inducción durante 6 días con los fármacos, a las concentraciones de 0,5, 1, 3, 5, 10 y 20 μ M, de la línea celular en cultivo, y después de llevar a cabo un ensayo colorimétrico con sulforrodamina-B (SRB) que se especificará más adelante, se procedió a la medida de la absorbancia para una densidad óptica de 492 nm. Se construyeron las gráficas de densidad óptica (D. O.) (eje de ordenada) y concentración (eje de abcisa) de cada uno de los fármacos, y sobre las gráficas se calculó interpolando el valor de la CI₅₀ trazando la vertical de la curva del valor obtenido como media entre los dos valores extremos de la D. O. Se determinaron dos valores para cada punto de la curva, el experimento se repitió dos o tres veces y se estimaron los valores medios. Los resultados se resumen en las Tablas 3 y 4.

65

ES 2 303 444 B2

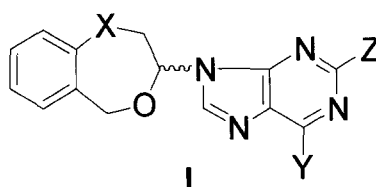
Ensayo colorimétrico

Tras períodos de 6 días de cultivo, las células fueron coloreadas con SRB mediante el siguiente protocolo:

1. El tapiz celular se lavó con PBS al 1% y se incubó con glutaraldehído durante 15-30 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 4°C, lavándose a continuación con PBS y dejándolo secar.
2. Las células así fijadas se tiñeron durante 15 minutos con SRB en ácido acético.
3. Posteriormente se lavó el tapiz con ácido acético y se dejaron secar de nuevo las placas.
4. El colorante fijado sobre las células se solubilizó con una solución de Tris-base con agitación suave.
5. Alícuotas de 100 μL se transfirieron a placas de 96 pocillos y se leyeron en un colorímetro Titertek multiscan.

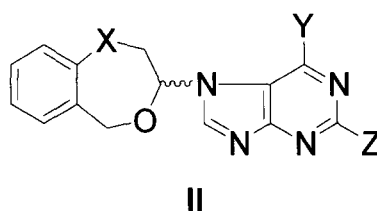
Las Tablas 3 y 4 resumen los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

TABLA 3



Nº	Código	X	Y	Z	Cl ₅₀ (μM)
16	MB-90A	O	Cl	H	4,63 \pm 0,01
17	BDM-69C	O	Br	H	3,43 \pm 0,50
18	BMD-185A	O	I	H	6,75 \pm 0,23
19	KS-171C	O	CF ₃	H	3,21 \pm 0,40
20	KS-47A	O	Cl	Cl	4,40 \pm 0,88
21	MN-84D	S	Cl	H	5,46 \pm 0,02
22	MN-92B	SO ₂	Cl	H	16,53 \pm 1,59

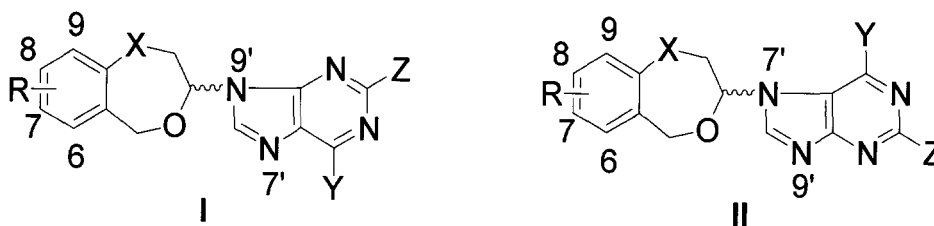
TABLA 4



Nº	Código	X	Y	Z	Cl ₅₀ (μM)
23	MB-90B	O	Cl	H	2,32 \pm 0,17
24	KS-193B	O	I	H	4,01 \pm 0,33
25	KS-171D	O	CF ₃	H	6,75 \pm 0,23
26	KS-47B	O	Cl	Cl	24,94 \pm 1,83
27	MN-116B	S	Cl	H	3,55 \pm 1,10
28	MN-80C	SO ₂	Cl	H	2,58 \pm 0,08

ES 2 303 444 B2

En resumen, la presente invención se refiere a una familia de compuestos que responden, en función de su unión hemiaminámica, a las fórmulas generales I y II:



15 donde,

- X representa un átomo de oxígeno, azufre o un grupo sulfonilo (SO₂), un grupo bencensulfanilamino sustituido en posiciones *orto*, *meta* o *para* por un grupo nitro o amino, o un grupo fluorenilmetil carbamato (FMOC-N_{terciario});
- 20 Y representa un radical seleccionado del grupo formado por restos bencilo (mono- o disustituídos), benciloxi (mono- o di-sustituídos), fenoxi (mono- o di-sustituídos), feniltio (mono- o di-sustituídos), ciclohexilmetilénoxi, aliloxi, alilo, cloro, bromo o yodo;
- Z representa un hidrógeno o un átomo de cloro;
- 25 R representa bien un radical seleccionado del grupo formado por H, alquilo, grupos electrón-donantes como hidroxilo, alcoxilo, amino, acilamino, o grupos electrón-atrayentes como halógenos, trifluorometilo, acilos, en las posiciones 7 y/o 9 del anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros.

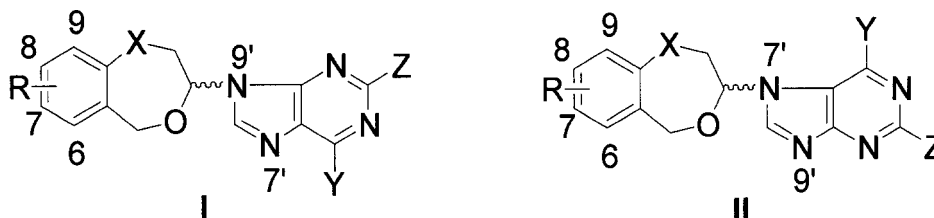
30 Estos compuestos pueden ser componentes activos de de una formulación farmacéutica y utilizarse para el tratamiento de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos o para la elaboración de medicamentos para estos tratamientos.

Estos compuestos se producirían según el procedimiento descrito que comprende las siguientes fases:

- 35 - mezcla del derivado (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzo-diheteroepínico con la base pírca, ácido de Lewis, trimetilclorosilano, 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano en acetonitrilo seco a una temperatura entre -5 y 5°C en atmósfera de argón,
- 40 - Tras dejar que alcance la suspensión la temperatura ambiente, se calienta la suspensión a una temperatura comprendida entre 40-50°C durante 16-24 h. En el procedimiento para la obtención de las (*RS*)-9- ó 7-(1,1-dioxo-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatíepin-3-il)-9*H*- ó -7*H*-purinas sustituidas se puede llevar a cabo la preparación de las dos formas siguientes: (a) por condensación entre el (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatíepino y la purina sustituida, de acuerdo con el procedimiento especificado arriba, y posterior oxidación del átomo de azufre en el compuesto condensado con Oxone® y (b) por condensación entre el compuesto oxidado previamente, como el (*RS*)-1,1-dioxo-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatíepino y la purina sustituida.

REIVINDICACIONES

1. Una familia de compuestos que responden, en función de su unión hemiaminámica, a las fórmulas generales I o II:



donde,

X representa un átomo de oxígeno, azufre o un grupo sulfonilo, un grupo bencensulfanilamino sustituido en posiciones *orto*, o *para* por un grupo nitro o amino, o un grupo fluorenilmetil carbamato (FMOC-N_{terciario}),

Y representa un radical seleccionado del grupo formado por restos bencilo (mono- o disustituidos), benciloxi (mono- o di-sustituidos), fenoxi (mono- o disustituidos), feniltio (mono- o di-sustituidos), ciclohexilmetilénoxi, aliloxi, alilo, cloro, bromo o yodo;

Z representa un hidrógeno o un átomo de cloro;

R representa bien un radical seleccionado del grupo formado por H, alquilo, un grupo electrón-donante tal como hidroxilo, alcoxilo, amino, acilamino, o un grupo electrón-atrayente tal como un átomo de halógeno, un grupo trifluorometilo, acilo, en las posiciones 7' y/o 9' del anillo bencénico fusionado al heterociclo de siete miembros.

2. Una formulación farmacéutica que comprende como ingrediente activo al menos un compuesto definido en la reivindicación 1.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 para el tratamiento de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos.

4. Empleo de un compuesto según la reivindicación 1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de los cánceres de mama, pulmón, colorrectal, páncreas y síndromes mieloproliferativos en animales y seres humanos.

5. Procedimiento para la preparación de un compuesto según la reivindicación 1 que comprende las siguientes fases:

- mezcla del derivado (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-1,4-benzo-diheteroepínico con la base púrica, ácido de Lewis, trimetilclorosilano, 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano en acetonitrilo seco a una temperatura comprendida entre -5 y 5°C en atmósfera de argón,

- Tras dejar que alcance la suspensión la temperatura ambiente, se calienta la suspensión a una temperatura comprendida entre 40-50°C durante 16-24 h.

En el procedimiento para la obtención de las (*RS*)-9- ó 7-(1,1-dioxo-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatiepín-3-il)-9*H*- ó -7*H*-purinas sustituidas se puede llevar a cabo la preparación de las dos formas siguientes: (a) por condensación entre el (*RS*)-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatiepino y la purina sustituida, de acuerdo con el procedimiento especificado arriba, y posterior oxidación del átomo de azufre en el compuesto condensado con Oxone® y (b) por condensación entre el compuesto oxidado previamente, como el (*RS*)-1,1-dioxo-3-metoxi-2,3-dihidro-5*H*-4,1-benzoxatiepino y la purina sustituida.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 303 444

② Nº de solicitud: 200601538

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.05.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SANIGER, E. et al.: "Benzene-fused oxacycles with the 5-fluorouracil moiety: synthesis, antiproliferative activities and apoptosis induction in breast cancer cells". Tetrahedron, 2003, vol. 59 (29), páginas 5457-5467, página 5457 y página 5458, compuestos 5-7.	1-5
A	SANIGER, E. et al.: "Neighbouring-group participation as the key step in the reactivity of acyclic and cyclic salicyl-derived O,O-acetals with 5-fluorouracil. Antiproliferative activity, cell cycle dysregulation and apoptotic induction of new O,N-acetals against breast cancer cells". Tetrahedron, 2003, vol. 59 (40), páginas 8017-8026, página 8018, compuestos 3a-c.	1-5
A	MARCHAL, J.A.: "Growth inhibition, G1-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives". Investigational New Drugs, 2004, vol. 22 (4), páginas 379-389, tabla 1.	1-5
A	ESPINOSA, A. et al.: "Antitumoural properties of benzannelated seven-membered 5-fluorouracil derivatives and related open analogues. Molecular markers for apoptosis and cell cycle dysregulation". Il Farmaco, v005, vol. 60 (2), páginas 91-97, página 92, compuestos 2-4.	1-5

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

15.07.2008

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 313/08 (2006.01)

C07D 327/02 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)