

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 862**

51 Int. Cl.:
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 19/12 (2006.01)
C07H 19/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99935854 .2**
96 Fecha de presentación: **23.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1100512**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2001**

54 Título: **Utilización de compuestos de tioarabinofuranosilo**

30 Prioridad:
23.07.1998 US 93869 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.03.2012

73 Titular/es:
**Southern Research Institute
2000 Ninth Avenue South Birmingham
Alabama 35205, US**

72 Inventor/es:
**SECRIST, John, A., III;
TIWARI, Kamal, N. y
MONTGOMERY, John, A.**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 862 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de compuestos de tioarabinofuranosilo

5 Esta invención recibió el apoyo de la subvención CA-34200 del National Institutes of Health.

Sector técnico

10 La presente invención se refiere al tratamiento de pacientes que sufren cáncer mediante la administración a los mismos de ciertos compuestos de tioarabinofuranosilo. Los compuestos utilizados de acuerdo con la invención han mostrado buena actividad anticancerosa. Los compuestos utilizados de acuerdo con la presente invención, tienen configuración beta, en contraste con la configuración alfa, que ha mostrado actividad anticancerosa. La presente invención se refiere también al procedimiento para la preparación de compuestos utilizados, según la presente invención.

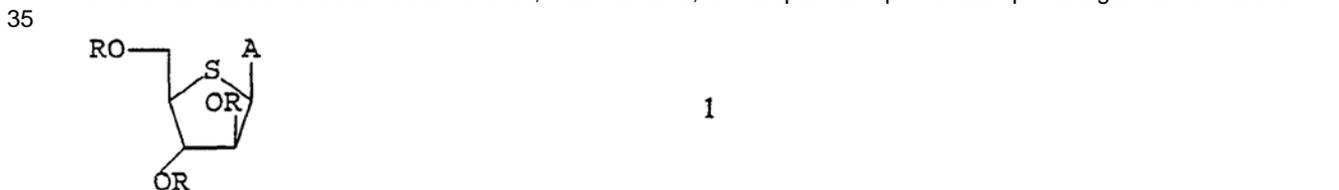
15 **Antecedentes de la invención**

Se ha acumulado una gran cantidad de investigación a lo largo de los años con respecto al desarrollo de tratamientos contra el cáncer para inhibir y destruir las células tumorales. Una parte de esta investigación ha dado como resultado conseguir un determinado éxito al encontrar tratamientos clínicamente aprobados. Sin embargo, los esfuerzos continúan a un ritmo cada vez mayor en vista de la extrema dificultad en el descubrimiento de tratamientos anticancerosos prometedores. Por ejemplo, incluso en el caso de que se encuentre que un compuesto tiene actividad citotóxica, no se puede predecir que sea selectivo contra las células cancerosas.

25 Un compuesto específico que se ha utilizado de manera amplia es la citosina arabinósida, a la que se hace referencia habitualmente como Ara-C.

Resumen de la invención

30 Se ha descubierto, de acuerdo con la presente invención, que algunos compuestos de citosina tioarabinofuranosilo son adecuados como agentes anticancerosos. La presencia de la fracción de tio azúcar hace posible, sorprendentemente conseguir una actividad antitumoral satisfactoria. Más particularmente, la presente invención se refiere al tratamiento de un huésped mamífero que necesita tratamiento anticáncer, por administración al huésped de una cantidad efectiva anticancerosa de, como mínimo, un compuesto representado por la siguiente fórmula 1:



en la que cada uno de R es individualmente H;
A es el grupo que consiste en



X se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, fluoro.

45 También se ha descubierto, de acuerdo con la presente invención, que los compuestos que se han indicado de la fórmula 1 inhiben la replicación de ADN en una célula de mamífero por contacto con la célula con, como mínimo, uno de dichos compuestos.

Los compuestos utilizados, de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar del modo siguiente:

50 A) hacer reaccionar un diarilo de 2,3,5-tri-O-arilo o alquilo-4-xilosa o dialquil ditioacetal, tal como 2,3,5-tri-O-bencil-L-xilosa-dibencilo ditioacetal en presencia de un grupo cedente en el hidroxilo 4 para producir la correspondiente 1,4-ditio-D-arabinofuranosido, tal como bencilo 2,3,5-tri-O-bencil-1, 4-ditio-D-arabinofuranosido;

B) someter el producto de la etapa A) a acidólisis para formar la correspondiente O-acetil-4-tio-D-arabinofuranosa, tal como 2,3,5-tri-O-bencil-1-O-acetil-4-tio-D-arabinofuranosa;

5 C) hacer reaccionar el producto de la etapa B, con una citosina, un compuesto 5- ó 6-aza compuesto, o un derivado adecuadamente bloqueado del mismo formando un compuesto correspondiente 4-tio- α,β -D-arabinofuranosil, tal como, en el caso de la citosina, 1-(2,3,5-tri-O-bencil-4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina;

10 D) convertir el compuesto de la etapa C) por hidrólisis en los correspondientes derivados de tio azúcar tales como 1-(4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina;

E) separar la forma α de la mezcla anomérica de la etapa D) para obtener de esta manera el compuesto deseado de fórmula 1, tal como 1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina.

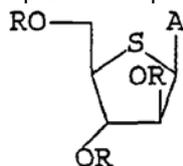
Resumen de los dibujos

15 Las figuras 1a y 1b son gráficos que muestran el metabolismo de 2-deoxicidina, 2'-deoxitiocidina, ara c y tio ara-c con respecto a sus respectivos trifosfatos.

20 La figura 2 es un gráfico que muestra la retención de ara c trifosfato y tio ara c trifosfato en las células CEM.

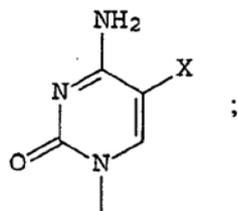
Forma preferente y varias formas para llevar a cabo la invención

25 La presente invención se refiere al tratamiento de un huésped mamífero que necesita tratamiento anticanceroso, que comprende la administración al huésped de una cantidad anticancerosa efectiva de, como mínimo, un compuesto representado por la fórmula 1:



1

siendo R en la fórmula 1 individualmente H-,
A en la fórmula 1 es



30

en la que X es seleccionada del grupo que consiste en hidrógeno y fluoro.

35 Los compuestos utilizados, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, son 1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina y 1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil)-5-fluoro-citosina.

40 La presente invención es adecuada para el tratamiento de huéspedes mamíferos incluyendo los humanos que sufren de cáncer como el melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

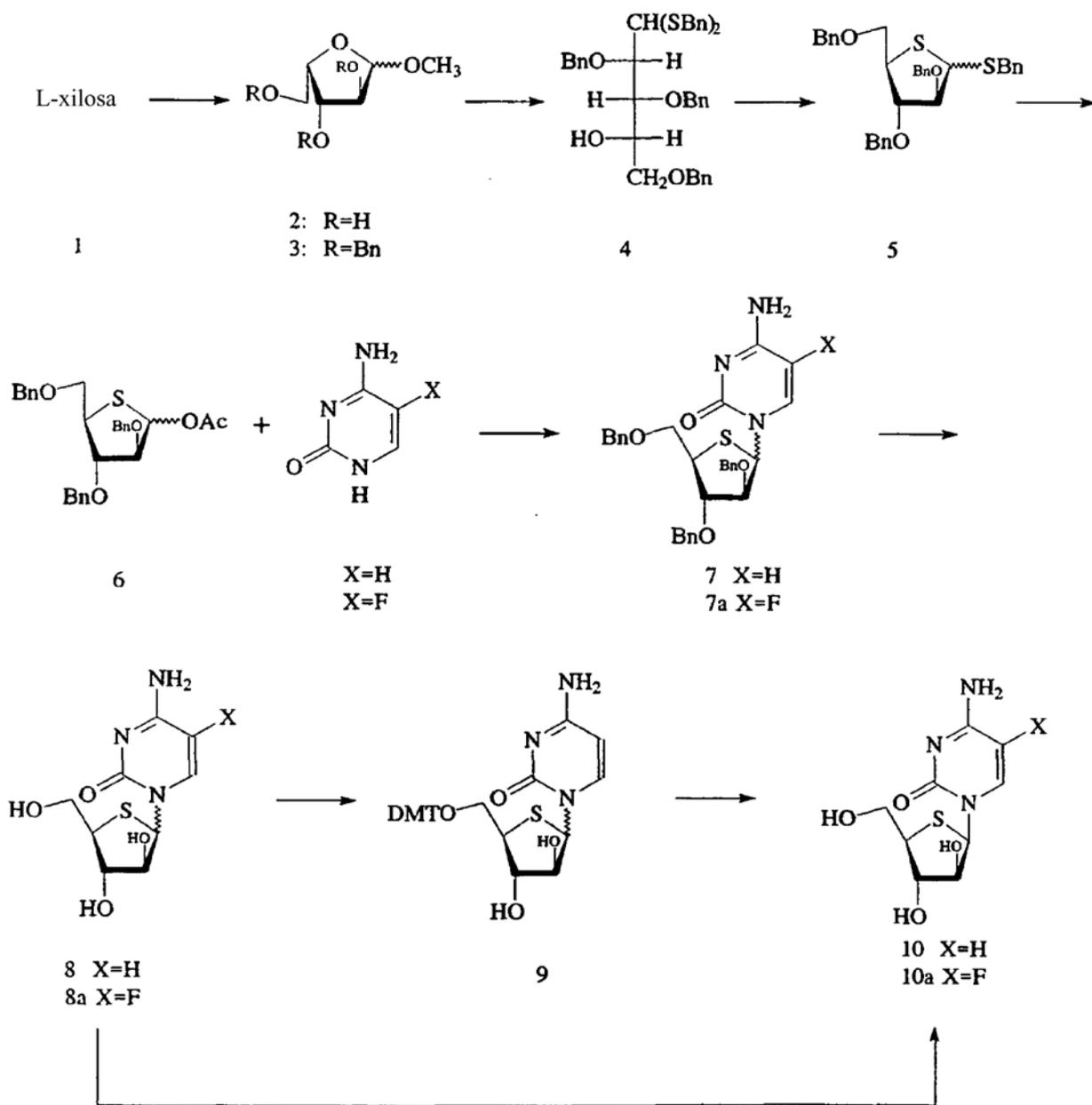
45 Los compuestos utilizados, de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar haciendo reaccionar 2,3,5-tri-O-arilo o diarilo de alquil-4-xilosa o dialquil ditioacetal, tales como 2,3,5-tri-O-bencil-L-xilosa-dibencilo ditioacetal en presencia de un grupo de soporte en posición del hidroxilo 4 para producir el correspondiente 1,4-ditio-D-arabinofuranosido, tal como bencilo 2,3,5-tri-O-bencil-1,4-ditio-D-arabinofuranosido. Esta etapa puede ser llevada a cabo utilizando fosfina, yodo e imidazol. El producto de la etapa anterior es sometido a acidólisis para formar la correspondiente O-acetil-4-tio-D-arabinofuranosa, tal como 2,3,5-tri-O-bencil-1-O-acetil-4-tio-D-arabinofuranosa. Por ejemplo, se puede utilizar el ácido acético en presencia de acetato de mercurio.

50 El producto de la etapa anterior es obligado a reaccionar con una citosina, un compuesto 5- ó 6-aza o un derivado adecuadamente bloqueado del mismo formando el correspondiente compuesto 4-tio- α,β -D-arabinofuranosil tal como, en el caso de la citosina, 1-(2,3,5-tri-O-bencil-4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina. Se incluye, entre los derivados adecuadamente bloqueados, derivados de acilo y trimetilsililados. El compuesto de la etapa anterior es

convertido por hidrólisis en el correspondiente derivado de tio azúcar, tal como 1-(4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina.

La forma α de la mezcla anomérica de la etapa anterior se separa para obtener de esta manera el compuesto deseado de fórmula 1, tal como 1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina.

Se pueden preparar compuestos, según la presente invención, por la secuencia de procedimiento mostrado en el esquema 1 y en los ejemplos 1 y 2 que se describen más adelante, en los que el compuesto preferente, 1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina es ilustrado a efectos de facilitar la comprensión de la secuencia del procedimiento. El precursor utilizado 2,3,5-tio-O-bencil-L-xilosa dibencil ditioacetel, puede ser producido por el proceso descrito por Secrist, III y otros, "The Synthesis and Biological Activity of Certain 4'-Thionucleosides, Nucleosides & Nucleotides, 14 (3-5), 675-686 (1995), cuya materia se incorpora a la descripción actual a título de referencia. El procedimiento de la presente invención prevé un método relativamente eficaz para la producción de cantidades significativas del compuesto deseado. Las técnicas anteriormente conocidas son extremadamente complicadas y no son adecuadas directamente para producir las cantidades deseadas de los compuestos.



La dosis efectiva farmacéuticamente aceptable del compuesto activo de la presente invención a administrar depende de la especie del animal de sangre caliente (mamíferos), del peso corporal, edad y estado del individuo y en la forma de administración.

- 5 La composición farmacéutica puede ser oral, parenteral, en supositorios o en otra forma que suministran los compuestos utilizados en la presente invención al flujo sanguíneo de un mamífero a tratar.

10 Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados por cualesquiera medios convencionales disponibles para su utilización conjuntamente con productos farmacéuticos, ya sea en forma de agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administran con un portador farmacéutico seleccionado en base a la ruta de administración elegida y a la práctica farmacéutica habitual.

15 La dosificación administrada variará, desde luego, dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente específico y su forma y ruta de administración; edad, salud y peso del receptor; la naturaleza y la extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento simultáneo; la frecuencia de tratamiento y efecto deseado. La dosis diaria de ingrediente activo se puede esperar que sea aproximadamente de 0,001 a 1000 miligramos (mg) por kilogramo (kg) de peso corporal, siendo la dosis preferente es 0,1 a 30 mg/kg.

20 Las formas de dosificación (composiciones adecuadas para la administración) contienen típicamente desde 1 mg a 100 mg de ingrediente activo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, el ingrediente activo se encontrará presente ordinariamente en una cantidad aproximada de 0,5 al 95% en peso, basada en el peso total de la composición.

25 El ingrediente activo se puede administrar por vía oral en forma de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas y polvos o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. También se puede administrar por vía parenteral, en forma de dosificación líquida estériles. El ingrediente activo también puede administrarse por vía intranasal (gotas nasales) o por inhalación. Otras formas de dosificación son potencialmente posibles, tales como la administración por vía transdérmica, mediante un parche o un ungüento.

30 Las cápsulas de gelatina contienen el ingrediente activo y portadores en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato magnésico, ácido esteárico y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para preparar tabletas por compresión. Tanto las tabletas como las cápsulas pueden ser fabricadas en forma de productos de liberación continuada para proporcionar la liberación continuada de la medicación en un determinado número de horas. Las tabletas comprimidas pueden estar recubiertas con azúcar o recubiertas con una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger la tableta de la acción de la atmósfera, o pueden tener un recubrimiento entérico para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal.

40 Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden contener colorantes y agentes de sabor para aumentar la aceptación de los pacientes.

45 En general, son portadores adecuados para soluciones parenterales agua, un aceite adecuado, solución salina, dextrosa en solución acuosa (glucosa) y soluciones de azúcares relacionadas y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicoles. Soluciones para la administración parenteral contienen preferentemente una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados y, en caso necesario, sustancias tampón. Son apropiados como agentes estabilizantes agentes antioxidantes tales como bisulfito sódico, sulfito sódico o ácido ascórbico, solos o combinados. También se utilizan ácido cítrico y sus sales así como EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil-o propilparabeno y clorobutanol.

50 Se describen portadores farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, texto de referencia en este campo.

55 Se explicarán en lo siguiente formas para la administración farmacéutica útiles para administración de los compuestos, según la presente invención:

Cápsulas

60 Se prepara un gran número de cápsulas unitarias por llenado de cápsulas de gelatina dura estándar de dos piezas, cada una de ellas con 100 mg de ingrediente activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato magnésico.

Cápsulas de gelatina blanda

5 Se prepara una mezcla de ingredientes activos en un aceite digerible tal como aceite de soja, aceite de semillas de algodón o aceite de oliva y se inyecta por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 µg de ingrediente activo. Las cápsulas se lavan y se secan.

Tabletas

10 Se preparó un gran número de tabletas por procedimientos convencionales, de manera que la unidad de dosificación era de 100 mg de ingrediente activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato magnésico, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón y 98,8 mg de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos apropiados para incrementar el sabor o para retrasar la absorción.

15 Diferentes modificaciones de la invención, además de las que se han mostrado y descrito, serán evidentes para los técnicos en la materia de la descripción anterior. Estas modificaciones están destinadas a quedar comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20 La materia que se ha dado a conocer comprende toda la información que se cree esencial para posibilitar a los técnicos en la materia llevar a la práctica la invención reivindicada. Dado que las aplicaciones indicadas pueden proporcionar información útil, estos materiales citados quedan incorporados en la presente descripción a título de referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos no limitativos se presentan como ilustración adicional de la presente invención.

Ejemplo 1**Preparación de 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil) citosina**

30 **2,3,5-tri-O-bencil-L-xilosa dibencil ditioacetil (4)**. L-xilosa (1,25 g, 167 mmol) se agitó durante 5 horas en 0,5% de cloruro de hidrógeno en metanol (675 mL) a temperatura ambiente y después se neutralizó con Amberlite IRA-400 OH resina de intercambio aniónico. El filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron hasta estado seco y el producto en bruto fue purificado mediante cromatografía de gel de sílice (CHCl₃/MeOH, 92:8) proporcionando 26,2 g de L-xilofuranosido (**2**, 95% de rendimiento) como una mezcla α y β(1:1). MS 164 (M)⁻, 165 (M+H)⁺, 133 (M-OCH₃)⁺.

35 A una solución enfriada en hielo de **2** (10 g, 60,9 mmol) en tetrahidrofurano seco (350 ml) se añadió hidruro sódico (60% dispersión en aceite mineral, 14,8 g, 370 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos bajo atmósfera de N₂. A esta mezcla de reacción se añadió yoduro de tetrabutilamonio sólido (0,36 g, 0,96 mmol) seguido por una adición gota a gota de bromuro de bencilo (36,6 g, 214 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente. Después de la adición de metanol (25 ml) la solución se evaporó a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (ciclohexano/EtOAc, 9:1) facilitando metilo 2,3,5-tri-O-bencil-L-xilofuranosido puro (**3**, 23 g, 87% rendimiento). MS 435 (M+H)⁺, 433 (M-H)⁺, 403 (M-OCH₃)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,38-7,25 (m, 30H, aromático H=s), 4,94 (d, 1H, H-1α, J_{1,2} = 4,3 Hz), 4,87 (d, 1H, H-1β, J_{1,2} = 0,9 Hz), 4,64-4,45 (m, 12H, PhCH₂'s), 4,37 (m, 1H, H-4α), 4,27 (dt, 1H, H-4β, J_{4,5a} = 3,7 Hz, J_{4,5b} = 6,5 Hz, J_{3,4} = 6,2 Hz), 4,17 (t, 1H, H-3α, J_{3,4} = 6,9 Hz, J_{2,3} = 5,6 Hz), 4,07 (dd, 1H, H-3β, J_{3,4} = 6,2 Hz, J_{2,3} = 2,5 Hz), 4,00 (dd, 1H, H-2α, J_{2,3} = 5,6 Hz), 3,95 (t, 1H, H-2β, J_{2,3} = 2,5 Hz), 3,70 (dd, 1H, H-5α, J_{4,5a} = 4,5 Hz, J_{5a,5b} = 10,4 Hz), 3,66 (dd, 1H, H-5αβ, J_{4,5a} = 3,7 Hz, J_{5a,5b} = 10,7 Hz), 3,54 (dd, 1H, H-5β, J_{4,5b} = 7,5 Hz), 3,49 (dd, 1H, H-5β, J_{4,5b} = 6,5 Hz).

50 A una solución de **3** (42 g, 97 mmol) en diclorometano (1000 ml) se añadieron bencil mercaptano (49,6 g, 400 mmol) y cloruro estánico (4,93 g, 18,9 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de neutralización con una solución acuosa al 5% de NaHCO₃ (750 ml), la capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (500 ml). Las capas orgánicas combinadas se evaporaron y se purificó **4** en bruto por cromatografía de gel de sílice (ciclohexano/EtOAc, 99:1) proporcionando **4** (8,53 g, 57%) de suficiente pureza para continuar. MS 657 (M+Li)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,35-7,29 (m, 19H, aromático H=s), 7,19-7,13 (m, 4H, aromático H=s), 7,01-6,96 (m, 2H aromático H=s), 4,86 (d, 1H, PhCHH, J = 11,1 Hz), 4,70 (dos d=s solapados, 2H, PhCHH, PhCHH, J = 11,1 Hz, J = 11,2 Hz), 4,43 (d, 1H, PhCHH, 11,2 Hz), 4,40 (d, 1H, PhCHH, J = 11,9 Hz), 4,36 (d, 1H, PhCHH, J = 11,9 Hz), 4,07 (dd, 1H, H-2, J_{1,2} = 3,0 Hz, J_{2,3} = 7,5 Hz), 3,75-3,67 (m, 4H, dos PhCH₂=s), 3,68 (d, 1H, H-1, J_{1,2} = 3,0 Hz), 3,36-3,25 (m, 2H, H-4, H-5a), 3,15-3,12 (m, 1H, H-5b), 2,22 (d, 1H, 4-OH, J = 6,2 Hz).

60 **2,3,5-tri-O-bencil-1-O-acetil-4-tio-n-arabinofuranosa (6)**. A una solución de **4** (13,0 g, 20 mmol) en 2:1 tolueno/acetonitrilo seco (200 ml) se añadieron trifetilfosfina (15,7 g, 60 mmol), yodo (12,7 g, 50 mmol) e imidazol (5,44 g, 80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 24 horas, después de cuyo periodo de tiempo la solución fue evaporada a estado seco. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (ciclohexano/EtOAc, 4:1) consiguiendo bencil 2,3,5-tri-O-bencil-1,4-ditio-D-arabinofuranosido en forma de jarabe (**5**, 9,0 g, 83%). MS 543 (M+H)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,40-7,20 (m, 20H, aromático H=s), 4,69-4,42 (m, 6H, tres PhCH₂O=s), 4,37 (m, 1H, H-1), 4,20 (m, 2H, H-2, H-3), 3,87 (s, 2H, PhCH₂S-), 3,80 (dd, 1H, H-5a, J_{4,5a} = 7,4 Hz, J_{5a,5b} = 9,3 Hz), 3,55 (dd, 1H, H-5b, J_{4,5b} = 7,1 Hz), 3,47 (m, 1H, H-4), Anal. (C₃₃H₃₄O₃S₂ @ 0,25 H₂O) C, H.

A una suspensión de acetato de mercurio (7,29 g, 22,9 mmol) en ácido acético (96 g) se añadió **5** (5,42 g, 10 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó sucesivamente con agua, NaHCO₃ en solución acuosa saturada y 5% de solución acuosa de KCN. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y acetato de etilo fue concentrada. La cromatografía del producto en bruto utilizando ciclohexano: (98:2) como eluyente proporcionó una mezcla de anómeros α y β (1:1) de **6** (3,73 g, 78%) en forma de jarabe incoloro. MS 479 (M+H)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,35-7,23 (m, 15H, aromático H=s), 6,07 (d, 0,25H, H-1 β , J_{1,2} = 4,0 Hz), 5,98 (d, 0,75H, H-1 α , J_{1,2} = 2,8 Hz), 4,83-4,45 (m, 6H, PhCH₂'s), 4,26 (dd, 0,75H, H-2 α , J_{2,3} = 5,4 Hz), 4,17-4,11 (m, 0,5H, H-2 β , H-3 β), 4,03 (t, 0,75H, H-3 α , J_{3,4} = 6 Hz), 3,80-3,67 (m, 1,25H, H-4 α , H-5 α , H-5 β), 3,53-3,39 (m, 1,75H, H-5 β , H-4 β , H-5 β), 2,06 (s, 3H, CH₃- α y CH₃- β), Anal. (C₂₈H₃₀O₅S @ 0,75 H₂O) C, H.

1-(2,3,5-tri-O-bencil-4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina (7). A una suspensión de 1-O-acetil 2,3,5-tri-O-bencil-4-tio-D-arabinofuranoso (478 mg, 1 mmol) y citosina (111,0 mg, 1 mmol) en acetonitrilo anhidro (25 mmol) se añadieron consecutivamente hexametilidisilazano (HMDS, 162 mg, 1 mmol) y clorotrimetilsilano (TMSCl, 434 mg, 4 mmol), y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 0,5 horas. Esta solución fue enfriada a -78°C. Se añadió sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (267 mg, 1,2 mmol) y la solución resultante se agitó a -78°C durante otras 2,5 h, tras lo cual la reacción fue prácticamente completa. La mezcla se calentó a temperatura ambiente, se concentró en un volumen más reducido (5 mL), se diluyó con cloruro de metileno (50 mL) y luego se lavó con agua (20 mL), seguido de solución saturada de bicarbonato sódico y agua. La capa orgánica fue diluida sobre MgSO₄ y se evaporó a estado seco. El residuo fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice (50 g elución con CHCl₃/MeOH 98:2) consiguiendo **7** (412 mg 77,5%) en forma de jarabe incoloro TLC (95:5 CHCl₃/MeOH) R_f 0,65; MS z/e 536 (M + Li)⁺.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8,22 (d, 1, H-6 β , J = 7,6); (d, 1, H-6 α , J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,38-7,09 (m, 30, aromático H's); 6,65 (d, 1, H-1' β , J_{1',2'} = 5,7 Hz); 6,36 (d, 1, H-1' α , J_{1',2'} = 1,2 Hz); 5,44 (d, 1, H-5' α); 5,26 (d, 1, H-5' β); 4,97-4,33 (multipletes solapados, 12, C₆ H₅ CH₂), 4,26 (dd, 1 H-2' β , J_{2',3'} = 6,8 Hz); 4,22 (m, 1, H-3' α , J_{3',4'} = 1 Hz); 4,16 (dd, 1, H-3' β , J_{3',4'} = 6,4 Hz); 4,13 (m, 1, H-2' α , J_{2',3'} = 1,7 Hz); 3,91 (m, 1, H-4' α); 3,78 (m, 1, H-5' α); 3,73-3,63 (m, 2, H-5' β); 3,55 (m, 1, H-5' α); 3,46 (m, 1, H-4' β).

1-(4-tio- α,β -D-arabinofuranosil) citosina (8). A una solución de tricloruro de boro (solución 1 M) en diclorometano seco (7 mL, 7 mmol) enfriada a -78°C se añadió gota a gota durante un periodo de 30 min una solución del compuesto **7** (265 mg, 0,5 mmol) en diclorometano seco (10 mL). Se continuó la agitación durante una noche a -20°C. El disolvente fue eliminado en vacío y el residuo fue co-evaporado con diclorometano (4 x 20 mL). El residuo fue neutralizado con NaHCO₃ (25 mL) saturado y se lavó con cloroformo (15 mL). La capa acuosa fue aplicada a una columna de intercambio catiónico (H⁺) y se eluyó con agua para eliminar sales y a continuación se eluyó con 1N NH₄OH obteniendo el compuesto deseado **8** (110 mg, 85%) MS z/e 260(M+H)⁺.

¹H NMR (Me₂SO-*d*₆) δ 7,94 (d, 0,67, H-6- β , J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,90 (d, 0,33, H-6 α , J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,17-7,03 (bs, 2, NH's solapados); 6,33 (d, 0,67, H-1' β , J_{1',2'} = 4,6 Hz); 5,86 (d, 0,33, H-1' α , J_{1',2'} = 7,3 Hz); 5,77 (d, 0,33, H-5' α); 5,70 (d, 0,67, H-5' β); 5,61 y 5,59 (dobletes solapados, 1, 2'-OH β , J_{2',2'-OH} = 5,1 Hz, 2'-OH α , J_{2',2'-OH} = 5,9 Hz); 5,47 (d, 0,33, 3'-OH α , J_{3',3'-OH} = 5,1 Hz); 5,38 (d, 0,67, 3'-OH β , J_{3',3'-OH} = 4,2 Hz); 5,08 (t, 0,67, 5'-OH β , J_{5',5'-OH} = 5,4 Hz); 4,90 (t, 0,33, 5'-OH α , J_{5',5'-OH} = 5,2 Hz); 4,00-3,93 (m, 1,67, H-2' α , H-2' β , H-3' β); 3,86-3,76 (m, 1, H-5' α y H-5' β); 3,67-3,55 (m, 1, H-5' β + H-3' α); 3,49-3,33 (m, 0,67, H-4' α , H-5' α); 3,17 (m, 0,67, H-4' β).

1-(5-O-dimetoxitritil-4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina (9). A una solución del compuesto **8** (100 mg, 0,38 mmol) en piridina seca (10 mL) se añadió 4,4'-Dimetoxitritilcloruro (135 mg, 0,6 mmol) y la solución fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue evaporada a su estado seco y el producto en bruto fue disuelto en acetato de etilo (20 mL) y lavado con agua y evaporado a estado seco consiguiendo un sólido que fue purificado en una columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH 98:2) para obtener el compuesto puro **9** (96 mg, 90% basado en una mezcla 1:1 de una mezcla α , β de **8**). MS z/e 568,3 (M+Li)⁺.

¹H NMR (Me₂SO-*d*₆) δ 7,77 (d, 1, H-6, J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,42-7,23 (m, 9, aromático H's); 7,17 (bs, 1, NH); 7,05 (bs, 1, NH); 6,91-6,88 (m, 4, aromático H's); 6,36 (d, 1, H-1', J_{1',2'} = 4,8 Hz); 5,65 (d, 1, H-5); 5,76 (d, 1, 2'-OH, J_{2',2'-OH} = 4,6 Hz); 5,43 (d, 1, 3'-OH, J_{3',3'-OH} = 3,3 Hz); 3,98-3,91 (m, 2, H-2', H-3'); 3,75 (s, 6, OCH₃); 3,39-3,25 (m, B, H-4', H-5').

1-(4-tio- β -D-arabinofuranosil) citosina (10). El compuesto **9** (90 mg, 0,16 mmol) fue tratado con ácido trifluoroacético (22 mg) en cloroformo (5 mL) a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de reacción fue neutralizada con solución acuosa de NaHCO₃ y la capa acuosa fue aplicada sobre una columna de intercambio catiónico que fue eluida en primer lugar con agua para eliminar sal y finalmente con 1N NH₄OH consiguiendo el compuesto **10** (35 mg, 85%), pf 218-220°C (lit' 221-222°C); MS z/e 260(M+H)⁺.

¹H NMR (Me₂SO-*d*₆) δ 7,94 (d, 1, H-6, J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,12 (bs, 1, NH); 7,04 (bs, 1, NH); 6,33 (d, 1, H-1', J_{1',2'} = 4,6 Hz); 5,70 (d, 1, H-5); 5,61 (bd, 1, 2'-OH, J_{2',2'-OH} = 3,1 Hz); 5,38 (bd, 1, 3'-OH, J_{3',3'-OH} = 3,5 Hz); 5,08 (bt, 1, 5'-OH, J_{5',5'-OH} = 4,9 Hz); 4,00-3,93 (m, 2, H-2', H-3'); 3,78 (m, 1, H-5' α); 3,61 (m, 1, H-5' β); 3,16 (m, 1, H-4').

Ejemplo 2**Preparación de 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil)5-fluorocitosina**

5 **1-(2,3,5-tri-O-benzil-4-tio-α,β-D-arabinofuranosil)5-fluorocitosina (7a)**. A una suspensión de 1-O-acetil
 2,3,5-tri-O-benzil-4-tio-D-arabinofuranosa (478 mg, 1 mmol) y citosina (129,0 mg, 1 mmol) en acetonitrilo anhidro
 (25 mmol) se añadieron consecutivamente hexametildisilazano (HMDS, 162 mg, 1 mmol) y clorotrimetilsilano
 (TMSCl, 434 mg, 4 mmol), y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 0,5 horas. Esta solución fue
 10 enfriada a -78°C. Se añadió sulfonato de trimetilsililtrifluorometano (267 mg, 1,2 mmol) y la solución resultante fue
 agitada a -78°C durante otras 2,5 h, después de cuyo tiempo la reacción quedó esencialmente completa. La
 mezcla fue calentada a temperatura ambiente, concentrada hasta un volumen pequeño (5 mL), diluida con cloruro
 de metileno (50 mL) y, a continuación, lavada con agua (20 mL) seguido de una solución saturada de bicarbonato
 sódico y agua. La capa orgánica fue secada sobre MgSO₄ y evaporada a estado seco. El residuo fue purificado
 15 por cromatografía sobre gel de sílice (50 g. elución con CHCl₃/MeOH 98:2) consiguiendo **7** como mezcla 2:1 α,β
 (425,2 mg 80,0%) como jarabe incoloro TLC (95:5 CHCl₃/MeOH R_f 0,65; MS z/e 553 (M+Li)⁻.
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,40 (d, 1, H-6_β, J = 7,6); 8,10 (d, 1, H-6_α, J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,38-7,09 (m, 30, aromático H's); 6,55
 (d, 1, H-1'_β, J_{1',2'} = 5,7 Hz); 6,25 (d, 1, H-1'_α, J_{1',2'} = 1,2 Hz); 4,90 (d, 1, H-5_α); 4,78 (d, 1, H-5_β); 4,30-4,55
 (multipletes solapados, 12, C₆H₅CH₂), 4,15 (dd, 1 H-2'_β, J_{2',3'} = 6,8 Hz); 4,10 (m, 1, H-3'_α, J_{3',4'} = 1 Hz); 3,90 (dd, 1,
 20 H-3'_β, J_{3',4'} = 6,4 Hz); 3,75 (m, 1, H-2'_α, J_{2',3'} = 1,7 Hz); 3,70 (m, 1, H-4'_α); 3,65 (m, 1, H-5'_α); 3,50-3,55 (m, 2, H-5'_β);
 3,45 (m, 1, H-5'_α); 3,40 (m, 1, H-4'_β).

1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil)5-fluorocitosina (10a). A una solución de tricloruro de boro (solución 1 M) en
 diclorometano seco (7 mL, 7 mmol) enfriada a -78°C se añadió gota a gota a lo largo de un periodo de 30 min, una
 25 solución del compuesto **7** (2273 mg, 0,5 mmol) en diclorometano seco (10 mL). Se continuó la agitación durante
 una noche a -20°C, el disolvente fue eliminado en vacío y el residuo fue co-evaporado con diclorometano (4 x 20
 mL). El residuo fue neutralizado con NaHCO₃ saturado (25 mL) y lavado con cloroformo (15 mL). La capa acuosa
 fue aplicada a una columna de intercambio catiónico (H⁺) y eluida con agua para eliminar sales y, a continuación,
 eluida con 1N NH₄OH obteniendo el compuesto deseado **8a** en forma de mezcla 2:1 α,β que, después de
 30 cristalización con agua facilitó **10a** puro (32,2 mg, 25%) MS z/e 278(M+H)⁺.
¹H NMR (Me₂SO-d₆) δ 8,15 (d, 1, H-6, J_{5,6} = 7,5 Hz); 7,75 (bs, 1, NH); 7,50 (bs, 1, NH); 6,25 (d, 1, H-1', J_{1',2'} =
 4,6 Hz); 5,65 (d, 1, H-5); 5,60 (bd, 1, 2'-OH, J_{2',2'-OH} = 3,1 Hz); 5,40 (bd, 1, 3'-OH, J_{3',3'-OH} = 3,5 Hz); 5,20 (bt, 1,
 5'-OH, J_{5',5'-OH} = 4,9 Hz); 4,00-3,90 (m, 2, H-2', H-3'); 3,75 (m, 1, H-5'_a); 3,65 (m, 1, H-5'_b); 3,15 (m, 1, H-4').
¹Ototani, H.; Whistler, R.L. Preparation and Antitumour Activity of 4'-Thio Analogs of
 2,2'-Anhydro-1-β-D-arabinofuran-osylcytosine. J. Med. Chem. 1974, 17, 535-537.

Ejemplo 3

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas in vitro.

Tabla 1

Valores Molares IC ₅₀			
	TioaraC	5-fluorotioaraC	Citosina arabinósido
LOX IMV1 melanoma	7 x 10 ⁻⁶	6 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶
PC-3 próstata	8 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁶
ZR-75-1 mamaria	3 x 10 ⁻⁶	6 x 10 ⁻⁷	4 x 10 ⁻⁷
CAK1-1 renal	3 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁵	6 x 10 ⁻⁷
DLD-1 colon	7 x 10 ⁻⁶	8 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁶
NC1-H23 pulmón	5 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁷
SK-MEL 28 melanoma	7 x 10 ⁻⁶	-	2 x 10 ⁻⁶
SNB-7 (CNS)	1 x 10 ⁻⁶	4 x	2 x 10 ⁻⁷

Las pruebas anteriores fueron llevadas a cabo con una exposición de 72 horas a un compuesto, utilizando el ensayo de Rojo Natural para todas las líneas, excepto SK-MEL 28 que se realizó con el ensayo RSB.

Ejemplo 4

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas in vivo para mostrar la efectividad de los compuestos de la presente invención.

Tabla 2

Respuesta al tratamiento de tumor SC Colon 36										
Tratamiento				Regresión del tumor						
Dosis Mg/Kg	Rt	Programa	Muertes no específicas/total	Número de parciales	Número de completos	Duración médica/alcanse (días)	Supervivencia libre de tumor/total	Días a 3 doblado	Retraso en días (T-C)	
Control	IP	Q4HX2 días 9-17					0/10	10.5		
1-(4-to -β-D-arabino(furanosil) citosina preparada en solución salina; volumen de inyección: 5cc/20g de peso corporal	IP	Q4HX3 días 9-17	0/5	0	4		4/5	>49.0	>38.5	
Palmo-AHA-C (preparado en solución salina/volumen de inyección 5cc/20g peso corporal	IP	Q1DX9 días 9	0/5	0	5	34 6 35-35	4/5	>49.0	>38.5	

Palmo-ARA-C es un pro-medicamento de ARA-C

Tabla 3

Respuesta al tratamiento del tumor SC CAKI-1 Renal										
Tratamiento				Regresión del tumor						
Agente	Dosis Mg/Kg	Rt	Programa	Muertes no específicas/total	Número de parciales	Número de completos	Duración médica/alcanse (días)	Supervivencia libre de tumor/total	Días a 3 doblado	Retraso en días (T-C)
Control		IP	Q4EX 3días 7-15					0/12	9.5	
1-(4-tio -β-D-arabinofuranosil) citosina	16	IP	Q4HX 3días 7-15	1/6	0	5	26.9 16-48	0/6	59.8	50.3
1-(4-tio -β-D-arabinofuranosil) citosina preparada en solución salina; volumen de inyección: 0.5cc/20g de peso corporal	8	IP	Q4HX 3días 7-15	0/6	1	4	12.7 9-18	0/6	50.7	41.2
ARA-C	30	IP	Q4HX 3días 7-15	5/6	0	0		0/6	25.7	16.2 (Tóxico)
ARA-C	20	IP	Q4HX 3días 7-15	5/6	0	0		0/6	15.7	6.2 (Tóxico)
ARA-C citosina preparada en solución salina; volumen de inyección: 0.1cc/10g de peso corporal	13.3	IP	Q4HX 3días 7-15	0/6	0	0		0/6	20.5	11.0
Palmo-ARA-C	45	IP	Q1DX 5días 7	4/6	0	0		0/6	41.2	31.7 (Tóxico)

(continuación tabla 3)

Respuesta al tratamiento del tumor SC CAKI-1 Renal										
Tratamiento					Regresión del tumor					
Agente	Dosis Mg/Kg	Rt	Programa	Muertes no específicas/total	Número de parciales	Número de completos	Duración médica/alcanza (días)	Supervivencia libre de tumor/total	Días a 3 doblado	Retraso en días (T-C)
Palmo-AHA-C (preparado en solución salina/tween 80; volumen de inyección 5cc/20g peso corporal)	22.5	IP	Q1DX 9 días 7	1/6	0	1	9.1 9-9	0/6	36.0	26.5

Tabla 4

Respuesta al tratamiento del tumor SC HCT-116 Colon										
Tratamiento					Regresión del tumor					
Agente	Dosis Mg/Kg	Rt	Programa	Muertes no específicas/total	Número de parciales	Número de completos	Duración médica/alcanse (días)	Supervivencia libre de tumor/total	Días a 3 doblado	Retraso en días (T-C)
Control		IP	Q.4HX 3 días 6-14					0/12	8.9	
1-(4- β -O-arabinofuranosil) citosina	20	IP	Q.4HX 3 días 6-14	0/6	0	6		6/6	>52.0	>43.1
1-(4- β -O-arabinofuranosil) valbena preparada en solución salina; volumen de inyección:0.5cc/20g de peso corporal	13.3	IP	Q.4HX 3 días 6-14	0/6	0	6	23.6 24-24	5/6	>52.0	>43.1
ARA-C	13.3	IP	Q.4HX 3 días 6-14	0/6	0	0		0/6	12.2	3.3
ARA-C preparada en solución salina; volumen de inyección:0.5cc/20g de peso corporal	9	IP	Q.4HX 3 días 6-14	0/6	0	0		0/6	10.9	2.0
Palmo-ARA-C	22.5	IP	Q.1DX 9 días 6	0/6	0	1	24.2 24-24	0/6	24.0	15.1

(continuación tabla 4)

Respuesta al tratamiento del tumor SC HCT-116 Colon										
Tratamiento					Regresión del tumor					
Agente	Dosis Mg/Kg	Rt	Programa	Muertes Specific Deaths/ Total	Número Partial	Número Complete	Duración médica/alcanse (días)	Supervivencia libre de tumor/total	Días a 3 doblado	Retraso en días (T-C)
Control		IP	Q 4HX 3 días 6-14					0/12	8.9	
Palmo-AHA-C (preparado en solución salina + tween 80; de volumen de inyección 0.5cc/20g peso corporal)	15	IP	Q 1DX 9 días 6	0/6	0	0		0/6	14.9	6.0

* Palmo-ARA-C es un pro-medicamento de ARA-C

Tal como se puede apreciar de las pruebas anteriores, en la mayor parte de líneas celulares ARA-C muestra citotoxicidad más elevada en comparación con la de la presente invención, lo que tendería a desaconsejar la utilización de los compuestos de la presente invención como tratamiento de cáncer. No obstante, de modo sorprendente, la 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil) citosina es más potente que ARA-C y más selectiva en la exterminación de células cancerígenas in vivo. Los compuestos utilizados de acuerdo con la presente invención muestran una mejor actividad anticancerígena, junto con una menor toxicidad. Ello puede ser debido al hecho de que la 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil) citosina no es desaminada por citidina deaminasa tan rápidamente como AraC, lo que se muestra a continuación en la tabla 5 utilizando sustancias radio-marcadas. La buena actividad del sustrato de citidina de aminasa con AraC ha sido un problema importante con este medicamento a causa no solamente de que disminuye la media vida del medicamento, sino que también por convertirse en AraUridina que es una sustancia no activa.

Tabla 5

Actividad de la citidina deaminasa determinada por sustratos radiactivos			
Compuesto	K _m	V _{max}	V _{max} /K _m
AraC	147	9	0,06
1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil citosina)	2571	17	0,007

Las siguientes pruebas fueron llevadas a cabo mostrando la capacidad de los compuestos de tioarabinofuranosil, según la presente invención, en inhibir la replicación de ADN en células de mamíferos. En las siguientes pruebas dCyd se refiere a 2'-deoxicidina. TCyd se refiere a tiodeoxicidina, T-araC se refiere a 1-(4-tio(3-D-arabinofuranosil) citosina y Ara-C se refiere a "citosina arabinósido". Los términos "d CTP", "T-d CTP", "ara CTP" y "T ara CTP" se refieren a los correspondientes trifosfatos. El término "dURD" se refiere a 2-deoxiuridina. El término "F-dUrd" se refiere a dioxiuridina fluorada y "F-dUMP" se refiere a monofosfato de deoxiuridina fluorada.

Se hará referencia a las figuras 1a y 1b que muestran el metabolismo de d Cyd, T-d Cyd, ara C y T-ara C con respecto a sus respectivos trifosfatos. En particular, se incubaron células CEM con 2000 nM de [5-³H]T-dCyd, 5 nM [5-³H]araC o 25 nm [5-³H]T-araC durante los tiempos indicados. Se determinó la radiactividad en el pico de 5'-trifosfato utilizando SAX HPLC. Para cada compuesto, la radiactividad en el pico de 5'-trifosfato fue superior al 90% de la radiactividad total eluida de la columna SAX HPLC.

Los resultados de pruebas relativos a la inhibición de crecimiento de células CEM se muestran a continuación en Tabla 6.

Se incubaron células CEM con varias concentraciones de cada compuesto y se determinó el efecto en los números de células mediante un contador Coulter. El IC₅₀ fue determinado a partir de un gráfico del porcentaje de crecimiento de control con respecto a la concentración del medicamento. Los datos presentados son la desviación media y estándar de tres experimentos separados. Las células resistentes a araC se obtuvieron mediante la incubación de células CEM en presencia de 150 nM araC durante aproximadamente 1 mes en cuyo tiempo las células CEM crecieron a velocidades de control.

Tabla 6

Inhibición del crecimiento de células CEM por los análogos de dCyd			
Compuesto	Tipo natural	Resistente a araC	Resistente/WT
IC ₅₀ (nM)			
T-dCyd	2200±1400	7200±7600	3
T-araC	24±9	125±184	5
araC	6±3	800±400	145

Los resultados de las pruebas relativas al metabolismo de células CEM de tipo natural y resistente a araC se muestran a continuación en la tabla 7.

Las células CEM (células de tipo natural o resistentes a araC) se incubaron con 100 nM de [5-³H]dCyd, [5-³H]T-dCyd, [5-³H] araC ó [5-³H]T-araC durante los tiempos indicados. Se determinó la radiactividad en el pico de 5'-trifosfato y la incorporación de radiactividad en la fracción insoluble en ácido (ADN). Para cada compuesto, la cantidad de radiactividad en el pico de 5'-trifosfato fue superior al 90% de la radiactividad total eluida de la columna SAX HPLC.

Tabla 7

Metabolismo de dCyd y sus análogos en células CEM de tipo natural y resistentes a araC

Compuesto	Tiempo de incubación	Tipo de célula	Trifosfato	ADN	Total
	Horas	Pmoles/10 ⁶ cells (porcentaje de WT)			
dCyd	0,25	Resistente WT	2,27 0,021 (0,93)	1,19 0,011 (0,89)	3,46 0,032 (0,91)
T-dCyd	0,25	Resistente WT	0,877 0,036 (4,1)	1,29 0,051 (4,0)	2,17 0,087 (4,0)
araC	1	Resistente WT	14,7 0,19 (1,2)	0,28 0,018 (6,3)	14,98 0,208 (1,4)
T-araC	1	Resistente WT	0,202 0,051 (25)	0,0056 0,0025 (45)	0,2076 0,0535 (26)

5 Los resultados que muestran la fosforilación en extractos CEM libres de células se muestran a continuación en la tabla 8.

10 Un extracto de células en bruto fue preparado a partir de células CEM de tipo natural y resistentes a araC y se determinó la capacidad de fosforilar dCyd, araC y T-araC. Los números entre paréntesis son el número de experimentos llevados a cabo. Las reacciones fueron llevadas a cabo en soluciones que contenían 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM ATP, 7,5 mM MgCl₂, 20 mM NaF, extracto y 1 μm [5-³H]dCyd, [5-³H]araC o [5-³H]T-araC. En varios momentos después del inicio del experimento se retiró una cantidad alícuota de cada volumen de reacción y se colocó en filtros DE-81. Los filtros se lavaron con 1 mM de formato amónico y etanol y se determinó la cantidad de radiactividad de cada filtro. La fosforilación de cada compuesto aumentó de manera lineal con respecto al tiempo. Este ensayo fue verificado por HPLC.

15

Tabla 8

Fosforilación de dCyd, araC y T-araC en extractos CEM libres de células			
Compuesto	Tipo natural	Células CEM resistentes a araC	Resistente/WT
pmoles/mg proteína/minuto			
dCyd	240±33 (3)	3,5±0,2 (3)	1,5
araC	94 (1)	1,2 (1)	1,3
T-araC	0,83 (2)	0,011 (1)	1,3

20 La tabla 9 muestra la actividad de deoxicitidina deaminasa. En particular, la actividad de deoxicitidina deaminasa fue purificada a partir de células Molt-4 tal como ha descrito (Shewach y otros, Mol. Pharmacol. 42: 518-524,1992). Cada uno de los ensayos fue llevado a cabo por duplicado y se determinaron las constantes cinéticas a partir de los gráficos lineales doble-recíproco de 1/velocidad a 1/concentración del sustrato. La línea óptima fue determinada por regresión lineal desde, como mínimo, 5 puntos de dato y el K_m y V_{max} se determinaron a partir de las intercepciones de x e y.

25

Tabla 9

Características de sustrato dCyd, araC y T-araC con actividad dCyd quinasa aislada de células Molt-4

Compuesto	K _m (μM)	relativa V _{max}	V _{max} /K _m
dCyd	1,2	1	0,8
araC	15	0,1	0,006
4'-tio-araC	93	0,46	0,005

30 La tabla 10 que se indica a continuación muestra también la actividad de deoxicitidina deaminasa.

35 La actividad de deoxicitidina deaminasa se purificó a partir de placenta humana y se determinaron el K_m y V_{max} de dCyd, T-dCyd, araC y T-araC. Las reacciones fueron llevadas a cabo en soluciones que contenían fosfato potásico 20 mM (pH 7,4), 100 mM KCl, varias concentraciones de nucleósidos radiomarcados y enzimas. Las reacciones fueron interrumpidas con ácido, el sustrato fue separado del producto por cromatografía de papel y la radiactividad se determinó en cada una. Las constantes cinéticas se determinaron a partir de gráficos lineales doble-recíproco de 1/velocidad a 1/concentración del sustrato. La línea óptima fue determinada por regresión lineal a partir de, como mínimo, 5 puntos de dato y el K_m y V_{max} se determinaron a partir de intercepciones de x e y. Los datos presentados son la desviación media y estándar de tres experimentos separados.

40

Tabla 10

Características de sustrato de dCyd, T-dCyd, araC y T-araC con actividad dCyd deaminasa aislada de placenta humana			
Compuesto	K_m (μ M)	V_{max} (pmoles/mg/min)	V_{max}/K_m
dCyd	$23 \pm 2,7$	$13 \pm 1,5$	0,55
T-dCyd	111 ± 77	37 ± 12	0,33
araC	238 ± 131	14 ± 7	0,058
T-araC	2944 ± 1023	21 ± 6	0,0072

Los resultados de las pruebas de vida media en células CEM se indican a continuación en la tabla 11.

- 5 Después de la incubación de células CEM durante 1 hora con 100 nM de $[5\text{-}^3\text{H}]d\text{Cyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-dCyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]ara\text{C}$ ó $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-araC}$, las células fueron recogidas, lavadas en medio fresco y resuspendidas en medio fresco que no contenía nucleósidos radiomarcados. Se recogieron muestras en varios momentos después de que las células fueron resuspendidas en medio fresco y se determinó la cantidad de radiactividad en el pico de 5'-trifosfato utilizando SAX HPLC. Los datos presentados son la desviación media y estándar de tres experimentos separados.

Tabla 11

Media vida inicial de dCTP, T-dCTP, araCTP y T-araCTP en células CEM	
Nucleótidos	Horas (SD)
dCTP	$0,94 \pm 0,16$
T-dCTP	$1,10 \pm 0,35$
araCTP	$5,31 \pm 0,31$
T-araCTP	$10,8 \pm 1,80$

- 15 Los resultados de pruebas relativas a la retención de araCTP y T-araCTP de células CEM se muestran en la figura 2. Las pruebas se llevaron a cabo de la siguiente manera:

20 Después de la incubación de células CEM durante 1 hora, con 5 nM de $[5\text{-}^3\text{H}]ara\text{C}$ ó 200 nM $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-araC}$, las células se recogieron, se lavaron con medio fresco y se resuspendieron en medio fresco que no contenía nucleósidos radiomarcados. Las muestras fueron recogidas en varios momentos después de que las células fueron resuspendidas en medio fresco y se determinó la cantidad de radiactividad en el pico de 5'-trifosfato utilizando SAX HPLC. En este experimento, habían 0,639 pmoles araCTP/ 10^6 células y 0,246 pmoles de T-araCTP después de 1 hora de incubación con compuesto radiomarcado.

25 Los resultados relacionados con el metabolismo de células CEM se indican a continuación en la tabla 12. En particular, las células CEM fueron incubadas con 100 nM de $[5\text{-}^3\text{H}]d\text{Cyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-dCyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]ara\text{C}$ ó $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-araC}$, durante los tiempos indicados. El metabolismo completo de cada compuesto se determinó: El medio se analizó en cuanto al compuesto original, su forma desaminada utilizando HPLC en fase reversa y H_2O , el extracto soluble en ácido fue analizado por SAX HPLC en cuanto a metabolitos fosforilados y se determinó la incorporación de radiactividad en el material precipitado por ácido (ADN). Toda la radiactividad original fue atribuida en estas fracciones. Para cada compuesto, la cantidad de radiactividad en el pico de 5'-trifosfato fue superior al 90% de la radiactividad total eluyendo de la columna SAX HPLC.

Tabla 12

Metabolismo de dCyd, T-dCyd, araC y T-araC en células CEM							
Nucleósido	Tiempo de incubación (Horas)	de Compuesto original (por ciento del total)	Compuesto desaminado	H_2O	Nucleósido TP	de ADN	
dCyd	1	38	0	55	4	3	
T-dCyd	1	90	0	0	2	8	
araC	1	87	0	0	13	0,4	
T-araC	24	96	0	0	4	0,3	

Los resultados de las pruebas relativos al efecto de la F-dUrd en el metabolismo se indican a continuación en la tabla 13.

- 40 Las células CEM fueron incubadas con 100 nM de $[5\text{-}^3\text{H}]d\text{Cyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-dCyd}$, $[5\text{-}^3\text{H}]ara\text{C}$ ó $[5\text{-}^3\text{H}]T\text{-araC}$ durante los tiempos indicados en presencia o ausencia de 10 μM F-dUrd, que es metabolizado a F-dUMP (un potente inhibidor de timidilato sintetasa). El metabolismo completo de cada compuesto se determinó como se indica en la leyenda de la tabla 12 y se determinó el porcentaje de metabolitos desaminados para cada compuesto. En ausencia de F-dUrd,

el producto de desaminado para dCyd fue $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ debido a la eliminación de $[^3\text{H}]$ en la posición 5 de F-dUMP por timidilato sintetasa. En presencia de F-dUrd, el producto desaminado de dCyd, T-dCyd y araC se encontraba en el medio como dUrd, T-dUrd o araU, respectivamente.

5 **Tabla 13**

Efecto de F-dUrd sobre el metabolismo de dCyd, T-dCyd, araC o T-araC			
Compuesto	F-DUrd (μM)	Tiempo de incubación (horas)	Porcentaje de desaminación
dCyd	0	1	32
dCyd	10	1	22
T-dCyd	0	8	0
T-dCyd	10	8	24
araC	0	8	0
araC	10	8	10
T-araC	0	24	0
T-araC	10	24	0

La siguiente tabla 14 indica resultados de pruebas referentes a los efectos de ADN, ARN y síntesis de proteínas.

- 10 Se incubaron células CEM con 60 μM T-dCyd, 150 nM araC o 750 nM T-araC. Se añadieron precursores de radiomarcado de ADN $[^3\text{H}]\text{dThd}$, ARN ($[^3\text{H}]\text{Urd}$) o proteína ($[^3\text{H}]$ leucina) a cada tratamiento 30 minutos después de la adición de cada compuesto. Las muestras se tomaron 1, 2, 3 y 4 horas después de la adición de los precursores radiomarcados y se determinó la incorporación de radiactividad en ARN, ADN o proteína tal como se ha descrito (Parker y otros, *Biochem. Pharmacol.* 55: 1673-1681, 1998). Cada uno de los números representa el promedio de
15 dos experimentos.

Tabla 14

Efecto de T-dCyd, araC y T-araC en ADN, ARN y síntesis de proteínas			
Compuesto	ADN	ARN	proteína
	Porcentaje de control		
60 μM T-dCyd	38	95	78
150 nM araC	8	96	96
750 Nm T-araC	16	87	72

- 20 Tal como se puede apreciar de lo anterior, los compuestos de tioarobinofuranosilo, según la presente invención, pueden ser utilizados para inhibir la replicación de ADN en células de mamíferos. Estos resultados tienden a sugerir su capacidad como inmunomoduladores, que los hagan adecuados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Esto está soportado adicionalmente por el hecho de que varios análogos de guanosina han demostrado estimular el sistema inmune (Weigle, W.O., *CRD Crit.Rev.Immunol.*, 1987, 7, 285; Lin y otros, *J.Med. Chem.*, 1985, 28, 1194-1198; Reitz y otros, *J.Med. Chem.*, 1994, 37, 3561-3578; Michael y otros, *J.Med. Chem.*, 1993, 36, 3431-3436). Algunas 3- β -ribofuranosiltiazol[4,5-d]pirimidinas han demostrado también tener
25 inmunoadividad significativa, incluyendo proliferación de células del bazo murino y actividad in vivo contra el virus Semliki Forest (Nagahara y otros, *J.Med.Chem.*, 1990, 33, 407-415).

- 30 La anterior descripción de la invención muestra y describe la misma. Además, la materia que se ha dado a conocer muestra y describe no sólo las realizaciones preferentes de la invención, sino que, tal como se ha mencionado anteriormente, se debe comprender que la invención es capaz de utilización en otras diferentes combinaciones, modificaciones y entornos y es capaz de cambios o modificaciones dentro del ámbito del concepto inventivo, tal como se expresa en esta descripción, de acuerdo con la materia dada a conocer y/o la habilidad o conocimientos de
35 la técnica correspondiente. Las realizaciones descritas se destinan además a explicar las mejores formas conocidas de la práctica de la invención y para posibilitar a otros técnicos en la técnica a utilizar la invención en estas u otras realizaciones y con las diferentes modificaciones requeridas por las aplicaciones específicas o utilizaciones de la invención. De acuerdo con ello, la descripción no está destinada a limitar la invención en la forma que se ha dado a conocer. Asimismo, se pretende que las reivindicaciones adjuntas comprenden realizaciones alternativas.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de, como mínimo, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil) 5-fluoro citosina y 1-(4-tio-β-D-arabinofuranosil) citosina para preparar un medicamento para el tratamiento de cáncer en mamíferos, en el que dicho cáncer pertenece al grupo que consiste en melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

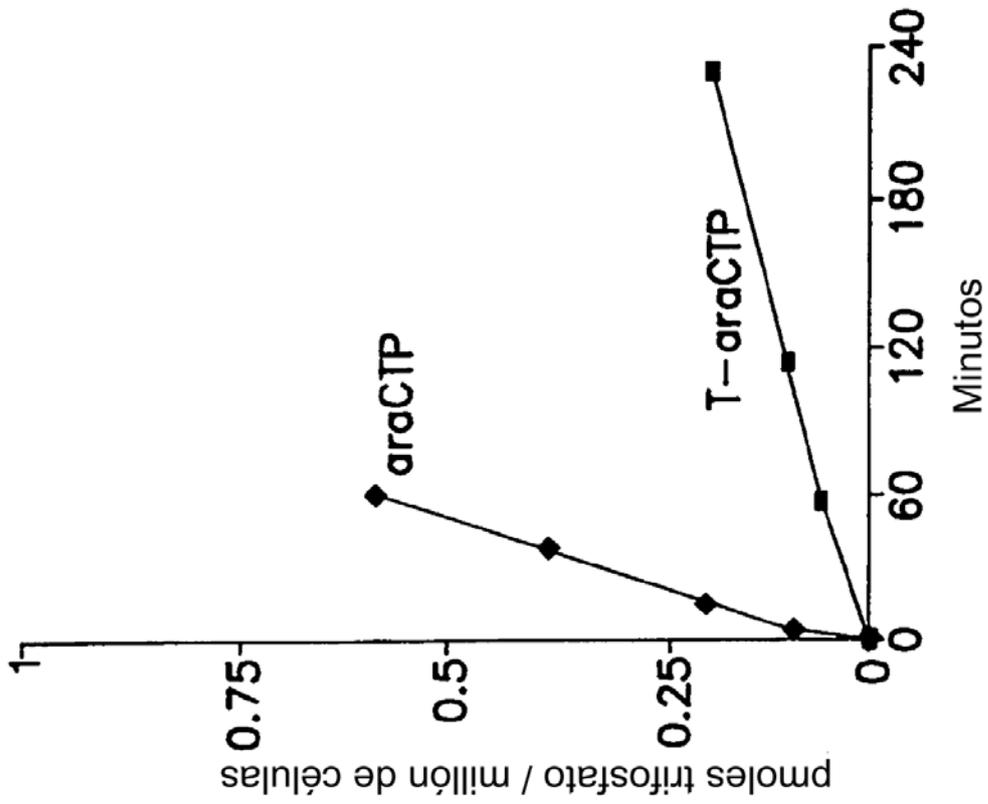


FIG. IB

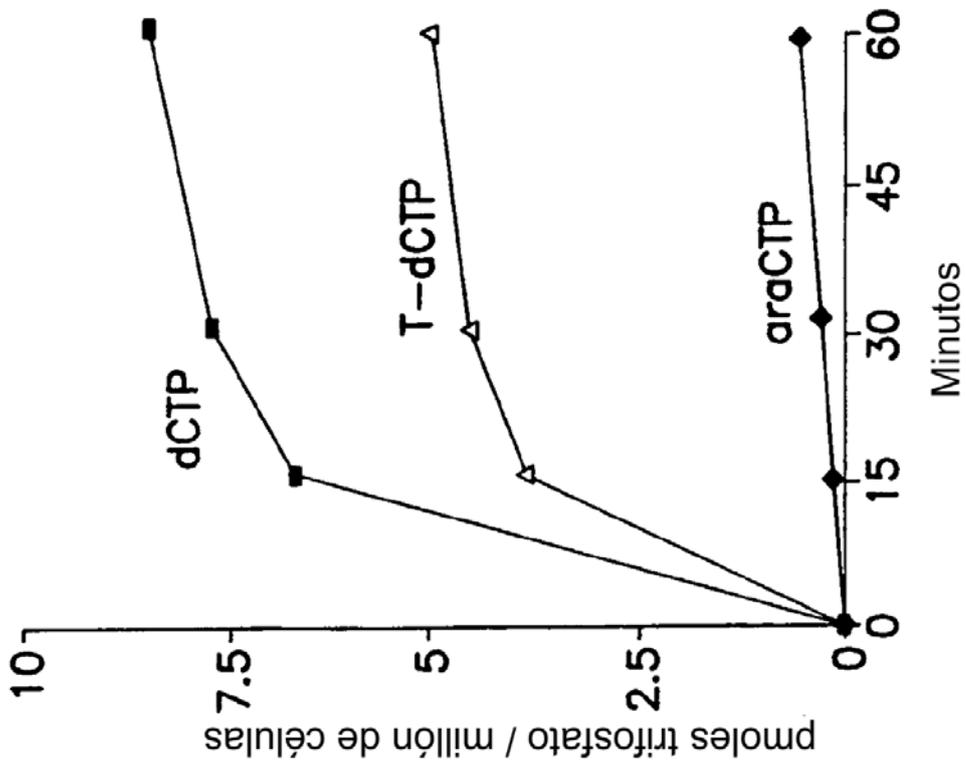


FIG. IA

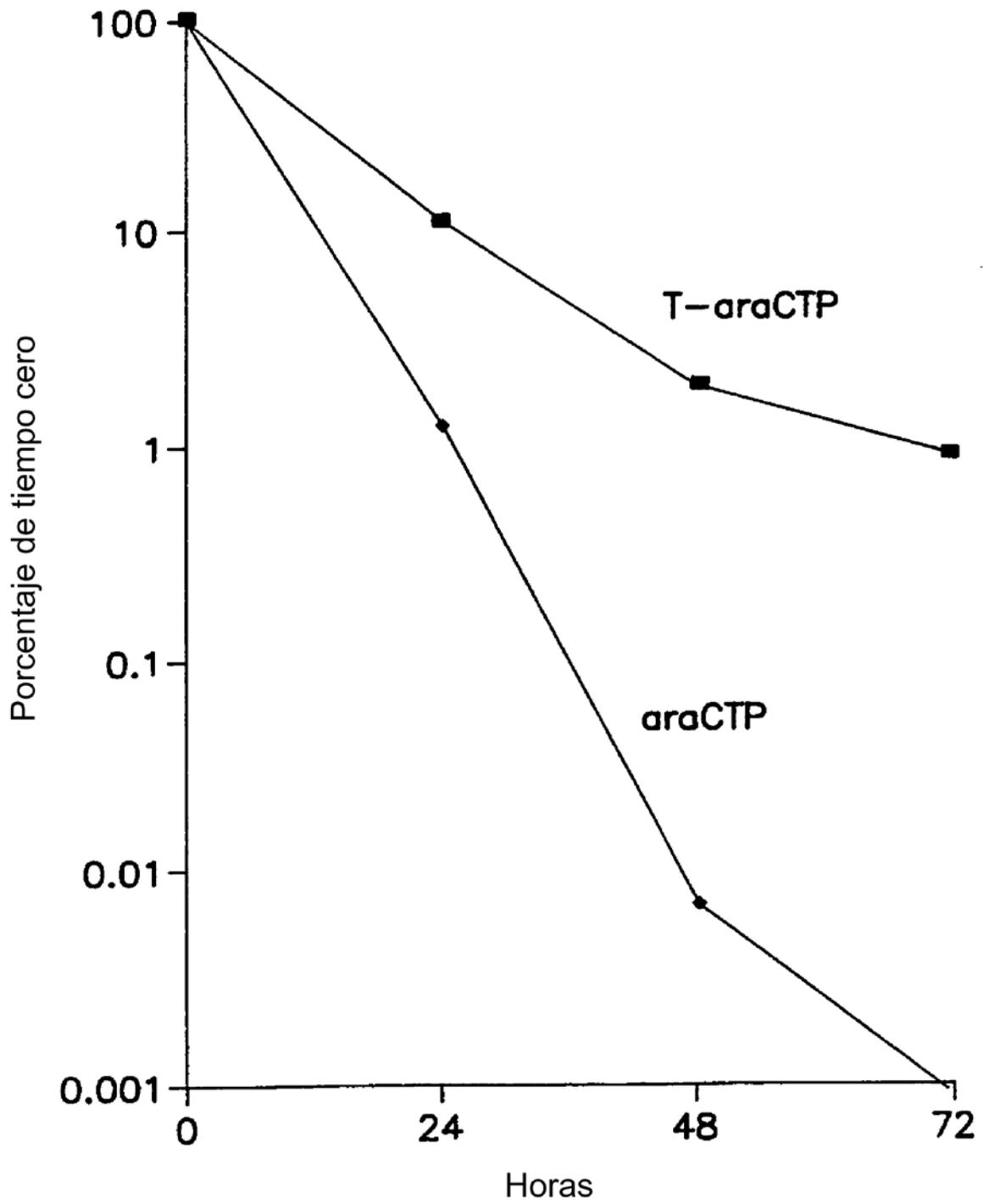


FIG. 2