(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 377 467**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07794933 .7**
(96) Fecha de presentación: **16.05.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2020996**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

(54) Título: **Procedimiento y composiciones para tratar enfermedades hematológicas malignas**

(30) Prioridad:
16.05.2006 US 800983 P
18.07.2006 US 831805 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.03.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.03.2012

(73) Titular/es:
GILEAD SCIENCES, INC.
333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY
CALIFORNIA 94404, US

(72) Inventor/es:
CHONG, Lee, S.;
LEE, William, A.;
RAY, Adrian, S.;
REISER, Hans, C.;
TUMAS, Daniel, B. y
WATKINS, William, J.

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 467 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

Procedimiento y composiciones para tratar enfermedades hematológicas malignas

Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que el ciclopropilPMEDAP N6 ("cpr-PMEDAP") es efectivo en la producción de un efecto antiproliferativo e inductor de diferenciación en cultivos de células *in vitro* contra una variedad de líneas de células tumorales (Naessens et al., "Biochem. Pharmacol. 1999 Jul 15;58(2):311-23). Sin embargo, cuando se emplearon el cpr-PMEDAP y otros compuestos de PMEDAP sustituidos en N6 en un modelo *in vivo* de enfermedad hematológica maligna de ratas endogámicas Sprague-Dawley (Valerianova et al. "Anticancer Res. mayo-junio de 2001; 21(3B):2057-64), los autores concluyeron que los "fosfonatos de nucleósidos acíclicos sustituidos en la posición 6 del anillo de 2,6-diaminopurina no parecen ser fármacos prometedores para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas" debido a su "alto grado de toxicidad".

Se han divulgado diversos bis- y mono-ésteres amidato de aminoácido de cpr-PMEDAP (y su uso como agentes antiproliferativos). Ver el documento WO 05/066189. El documento WO 02/08241 divulga un procedimiento para seleccionar profármacos análogos a nucleótido de metoxifosfonato que son útiles para tratar enfermedades hematológicas malignas con toxicidad reducida.

Las enfermedades hematológicas malignas se definen ampliamente como trastornos proliferativos de células sanguíneas y/o sus progenitores, en donde estas células proliferan fuera de control. Anatómicamente, las enfermedades hematológicas malignas se dividen en dos grupos principales: linfomas – masas malignas de células linfoides, principalmente pero no exclusivamente en ganglios linfáticos y leucemias – neoplasmas derivados típicamente de células linfoides y mieloides y que afectan principalmente la médula ósea y la sangre periférica. Los linfomas pueden subdividirse en la enfermedad de Hodgkin y en linfoma No Hodgkin (NHL). El último grupo comprende varias entidades definidas que pueden distinguirse clínicamente (por ejemplo, linfoma agresivo, linfoma indolente), histológicamente (por ejemplo, linfoma folicular, linfoma de células de manto) o basado en el origen de la célula maligna (por ejemplo, linfocito B, linfocito T). Las leucemias y enfermedades malignas relacionadas incluyen leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y leucemia linfocítica crónica (CLL). Otras enfermedades hematológicas malignas incluyen las discrasias de células de plasma, incluyendo el mieloma múltiple, y los síndromes mielodisplásicos.

Aunque la introducción de agentes novedosos tales como el imatinib (Gleevec®), bortezomib (Velcade®) y rituximab (Rituxin®) ha mejorado el resultado de muchas enfermedades hematológicas malignas, persiste una necesidad médica no cubierta de sustancias terapéuticas novedosas que sean eficaces. Por ejemplo, existe una necesidad médica no cubierta para pacientes que sufren de NHL refractarios al tratamiento o con recaída, dado que la incidencia de NHL ha aumentado sustancialmente en los Estados Unidos durante las últimas cinco décadas.

Las leucemias tienen menores cantidades de pacientes. Sin embargo, persiste una necesidad médica no cubierta, por ejemplo, para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (AML) y de la leucemia linfocítica crónica (CLL), como lo ilustran las bajas tasas de supervivencia de 5 años.

Existe la necesidad de agentes antimetabólicos multiespecíficos o ampliamente activos con una ventana terapéutica mejorada por encima de modalidades de tratamiento existentes, que puedan utilizarse ya sea como monoterapia independiente o en combinación con otros terapéuticos. La mayoría de los antimetabolitos interfieren con las enzimas involucradas en la síntesis de ADN, tal como las enzimas relacionadas con la biosíntesis de timidina o de purina, y/o están incorporados en ADN recientemente sintetizado. Los análogos de nucleobase, nucleósido y nucleótido son una clase importante de fármacos citotóxicos efectivos, y son ampliamente utilizados para el tratamiento de leucemias y linfomas. Algunos de estos agentes, 5-fluorouracilo, capecitabina y especialmente gemcitabina, también se utilizan para el tratamiento de tumores sólidos. Tres análogos de adenosina, fludarabina, cladribina y clofarabina se indican para CLL, leucemia de célula pilosa y ALL pediátrico, respectivamente. El análogo de purina, que es la pentostatina (2'-desoxicoformicina), un inhibidor de adenosindesaminasa, tiene actividad clínica contra las enfermedades malignas linfoides. La nelarabina es un profármaco del análogo de desoxiguanosina ara-G, que es resistente al catabolismo mediante fosforilasa de nucleósido de purina y ha demostrado actividad contra enfermedades malignas de células T; entre los análogos de pirimidina, ha sido evaluada la citarabina (ara-C); ésta es activa en un número de enfermedades hematológicas malignas y es uno de los agentes utilizados en el tratamiento de leucemia mielógena aguda.

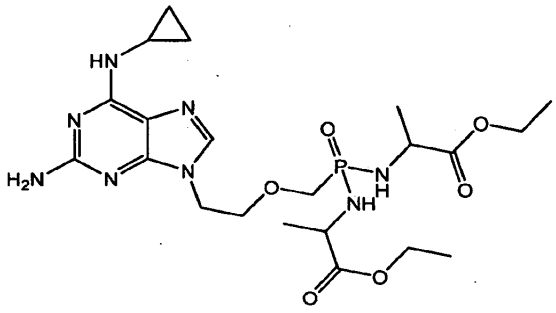
Sin embargo, las terapias existentes tienen limitaciones en relación a seguridad, eficacia y facilidad de uso, por ejemplo. No es poco común que los tratamientos sean inicialmente exitosos, y que luego las enfermedades hematológicas malignas reaparezcan frecuentemente con el tiempo.

Por lo tanto, persiste una necesidad de nucleósidos/nucleótidos novedosos con una ventana terapéutica mejorada y/o utilidad complementaria con respecto a los compuestos existentes en esta clase.

Los solicitantes buscaron un compuesto adecuado para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas con un valor de PK y carga mejorados, ventana terapéutica mejorada y/o menor resistencia a fármacos. En particular

se deseaba identificar un compuesto que se concentre en células sanguíneas, en particular PBMC. Se esperaba que concentrar el compuesto en estas células objetivo ampliara la ventana terapéutica reduciendo la exposición de los otros tejidos del paciente al compuesto.

El documento WO 05/066189 divulga un compuesto que tiene la estructura 1:



(1)

La presente invención se refiere al compuesto 1. También se refiere al diastereómero del mismo, en el cual el aminoácido bis sustituido sobre el átomo de fósforo en un aminoácido L, así como también dicho diastereómero está sustancialmente libre de aminoácido D.

Hasta ahora, los compuestos de la formula 1 se han empleado como la base libre. Sin embargo, los solicitantes determinaron que la base libre no es comercialmente óptima para formulación en forma de dosis por ser higroscópica. Adecuadamente, los solicitantes buscaron una forma de compuesto 1 que pudiera facilitar el proceso de fabricación para formas de dosificación terapéuticas.

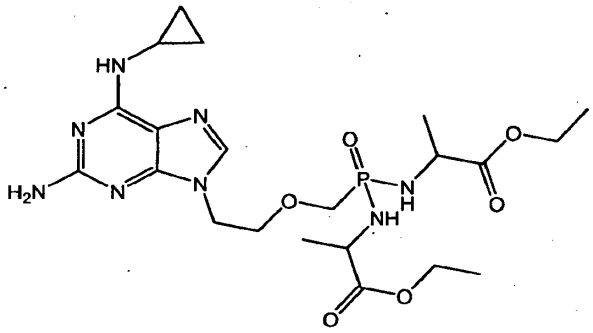
Sumario de la invención

Los solicitantes descubrieron que la naturaleza del éster de alquilo en el grupo carboxilo del éster de aminoácido de la clase de compuestos de bisamidato cpr-PMEDAP es instrumental para la distribución preferencial del compuesto en PBMC. Inesperadamente se descubrió que administrar el éster de bis(etilo) (es decir, el compuesto 1) daba como resultado una distribución altamente preferencial de cpr-PMEDAP en los PBMC en comparación con el plasma. La distribución fue mucho mayor a la obtenida con el por lo demás estrechamente relacionado éster de bis(isopropilo). Además, se determinó que las sales de ácido orgánico del compuesto 1 fueron menos higroscópicas que la base libre, facilitando así la fabricación de productos que contienen al compuesto 1. Finalmente, se determinó que la estabilidad de estas sales (particularmente en formulaciones parenterales) se mejoró incluyendo un carbohidrato en las formulaciones.

De acuerdo con esto, una realización de la presente invención es una sal de ácido orgánico del compuesto 1 y/o sus tautómeros y solvatos.

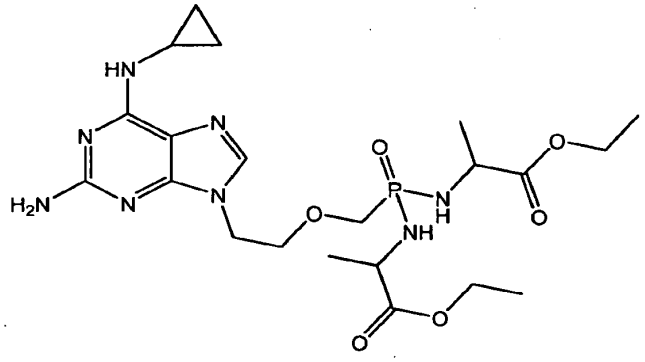
Otra realización de la presente invención es una composición que comprende (a) una sal de ácido orgánico del compuesto 1 y/o sus tautómeros y solvatos y (b) un carbohidrato, mediante lo cual se mejora la estabilidad de almacenamiento de la sal.

Otra realización de la presente invención es un procedimiento para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad hematológica maligna, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto



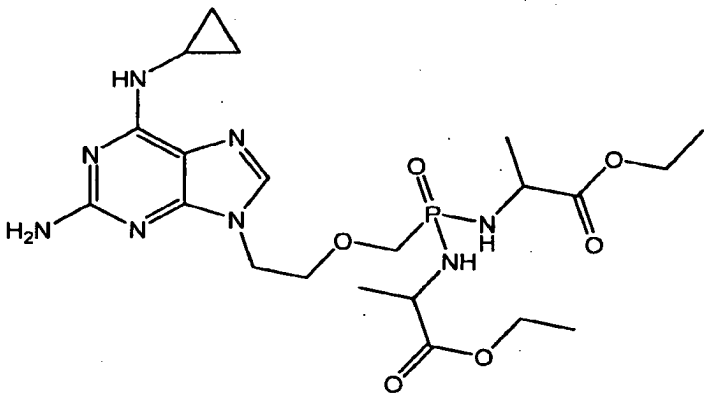
y/o sus sales, tautómeros y solvatos.

Una realización adicional de la presente invención es una combinación que comprende el compuesto



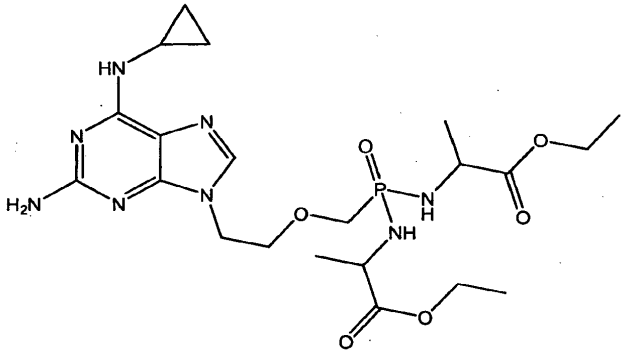
y/o sus sales, tautómeros y solvatos en un envase adecuado para utilizarse en la administración parenteral del compuesto.

Una realización adicional de la presente invención es un procedimiento que comprende preparar una sal de ácido orgánico del compuesto



y un carbohidrato en una solución acuosa estéril, y almacenar dicha solución durante un periodo mayor que aproximadamente una hora.

Una realización adicional de la presente invención es una composición envasada que incluye una solución acuosa estéril de un carbohidrato y una sal de ácido orgánico del compuesto



conjuntamente con una divulgación (por ejemplo, una inserción para el paciente) de que la solución opcionalmente se almacena durante un periodo superior a aproximadamente 1 hora.

Los ácidos orgánicos adecuados para preparar las sales de la presente invención típicamente son compuestos que contienen al menos un grupo carboxilo, incluyendo aminoácidos (de origen natural o sintéticos), tales como ácido glutámico y ácido aspártico, y ácidos alquil C_{1-16} y aril C_{6-16} y heteroaril C_{4-16} carboxílicos, tales como los ácidos

acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, glutárico, tartárico, cítrico, fumárico, succínico, málico, maleico, hidroximaleico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinámico, salicílico, y ácidos 2-fenoxibenzoicos, conjuntamente con cualquier derivado (excluyendo a los ésteres donde ningún carboxilo permanece libre) de los mismos que tenga la misma raíz (por ejemplo, “ácido acetoacético”) que se describen en la tabla “Physical Constants of Organic Compounds" p. 3-12 a 3-523 Merck Index 74a. Ed. 1993. Los ácidos orgánicos dicarboxílicos son de particular interés. Emplear más de un ácido orgánico en combinación se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Las sales se preparan de forma análoga al procedimiento mostrado en el ejemplo 1, a continuación.

Típicamente, la relación molar de ácido orgánico con respecto al compuesto 1 es de aproximadamente 1:1. Sin embargo, la proporción puede ser tan grande como 1 mol de compuesto 1 con respecto al número de grupos ácidos en el caso de ácidos poliorgánicos, por ejemplo, una relación de 2:1 del compuesto 1 con respecto a sal para una sal de ácido dicarboxílico. Sin embargo, la relación es variable, bajando hasta 1:1 o menor, dependiendo del enriquecimiento de la funcionalidad ácida y su grado de sustitución con funcionalidades ácidas.

Las formulaciones adecuadas del compuesto 1, ya sea para uso veterinario o humano, opcionalmente comprenden uno o más portadores aceptables. Los portadores deben ser “aceptables” en el sentido de que sean compatibles con los otros ingredientes de la formulación y fisiológicamente inocuos para el paciente.

Las formulaciones opcionalmente contendrán excipientes tales como aquellos expuestos en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients” (1986). Los excipientes opcionalmente incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, carbohidratos tales como dextrina, manitol o dextrosa, tampones (por ejemplo, citrato), sales metálicas alcalinas, deslizante, agentes espesantes y otras sustancias que se encuentran convencionalmente en comprimidos, cápsulas, soluciones u otras composiciones adecuadas o dirigidas para uso terapéutico. Típicamente, las formulaciones no contendrán excipientes convencionales de formación de comprimido, dado que generalmente se formulan para uso parenteral. Idealmente, las formulaciones serán estériles. Además, las preparaciones parenterales serán sustancialmente isotónicas. El pH de las formulaciones opcionalmente varía desde aproximadamente 5-10, normalmente aproximadamente 6-9, típicamente de aproximadamente 5-6.

Las soluciones parenterales (estériles acuosas) de las sales de ácido orgánico del compuesto 1 comprenden opcionalmente una cantidad estabilizante de carbohidrato, típicamente un sacárido (mono, di o polisacáridos), glucósidos o alcohol de azúcar (alditoles). Los polisacáridos deben ser biodegradables con la inyección o infusión parenteral e incluyen dextrinas y almidones, típicamente de 3 a 10 unidades. Los carbohidratos representativos incluyen hexosas, aldosas, aldohexosas, aldotriosas (por ejemplo, gliceraldehído), aldotetrosas (por ejemplo, eritrosa), aldopentosas (por ejemplo, arabinosa), cetosas, cetohexosa (por ejemplo, fructosa), cetopentosas (por ejemplo, ribulosa), maltosa, sucrosa, lactosa, sacarosa, ribosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. De interés particular son los carbohidratos utilizados convencionalmente en formulaciones parenterales, por ejemplo manitol o dextrosa. El carácter óptico del carbohidrato no es crítico, pero es deseable que la configuración sea tal que el carbohidrato sea biodegradable con la administración parenteral. Por ejemplo, 5% de dextrosa (por peso de solución; pH de aproximadamente 4.2, no tamponada) permite almacenamiento de compuesto 1 de succinato a 40º C durante 60 horas sin degradación significativa. Por otra parte, el almacenamiento en soluciones tamponadas a pH 2, 7 y 9 bajo las mismas condiciones llevan a una degradación sustancial del compuesto 1: aproximadamente 100%, 18% y 76% en peso, respectivamente.

La cantidad estabilizante de carbohidrato es variable y dependerá de las condiciones de almacenamiento esperadas y la vida útil deseada, de la elección de tampón, del pH, de la cantidad de compuesto 1 y otros factores que apreciarán los expertos en la técnica. Generalmente se utilizará aproximadamente de 0,5% a 5% en peso de solución. Típicamente, la cantidad óptima de carbohidrato se determinará mediante experimentación rutinaria, pero la cantidad generalmente no superará (junto con tampones, cloruro de sodio y similares) una cantidad que proporcione isotonicidad a la solución. Sin embargo, los concentrados hiperisotónicos son aceptables, si se espera diluir la composición parenteral antes o durante la infusión. La solución parenteral opcionalmente se tampona (típicamente con tampón de citrato) a un pH de aproximadamente 4 a 6.

La presencia del carbohidrato estabiliza las sales del compuesto 1 en solución acuosa para el almacenamiento (incluyendo el tiempo de administración) de al menos aproximadamente 60 horas, hasta 1 semana, 1 mes o un año, o cualquier periodo intermedio, dependiendo de los factores antes mencionados para la concentración de carbohidrato, por ejemplo, la temperatura de almacenamiento y similares.

Las composiciones terapéuticas opcionalmente se administran por vías parenterales (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural) dado que estas son las más convenientes para el tratamiento de enfermedades malignas. Las infusiones intravenosas son generalmente el procedimiento de administración preferido.

Las formulaciones se presentan en envases de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas selladas, viales o bolsas flexibles de infusión. Los envases opcionalmente serán de vidrio o plástico rígido, pero típicamente se utilizarán envases semirrígidos o flexibles, fabricados a partir de poliolefinas (polietileno) o cloruro de polivinilo plastificado. El envase típicamente es de una sola cámara. Estos envases tienen al menos un puerto integral estéril para facilitar la entrada estéril al envase de un dispositivo para tener acceso a los contenidos (generalmente jeringas

o un dispositivo perforador de equipo intravenoso). El puerto proporciona acceso estéril para solución solubilizante (si se requiere) y egreso de soluciones parenterales. Un receptáculo superior (generalmente de poliolefina) se proporciona opcionalmente para el envase.

La formulación se encuentra presente dentro del envase como una solución o en forma seca. Si se almacena en una forma sustancialmente anhidra, por ejemplo, liofilizado, la formulación requerirá solamente la adición de un portador líquido estéril, como por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de usarla. Las soluciones incluyen agentes para establecer tonicidad, tales como cloruro de sodio o un azúcar, tal como manitol o dextrosa. Una ventaja inesperada del carbohidrato o azúcar es un aumento en la estabilidad de la sal del compuesto 1 en soluciones acuosas almacenadas. Los envases se llenan con solución estéril o se llenan y luego se esterilizan, por ejemplo mediante calor o agentes químicos, de acuerdo con procesos conocidos. En general, se llena un envase flexible con una solución estéril de la formulación y luego se liofiliza opcionalmente. La tecnología adecuada para producir los productos de envase de la presente invención se encuentran en Avis et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications vols. 1 y 3 (1984).

Los envases parenterales contendrán una dosis diaria o subdosis unitaria diaria del compuesto 1 como se describe a continuación, o una fracción apropiada de ellos.

El compuesto 1, las sales de ácido orgánico del compuesto 1, o soluciones acuosas de este, estabilizadas mediante carbohidrato, se emplean opcionalmente para tratar cualquier neoplasma, incluyendo no solamente enfermedades hematológicas malignas, sino también tumores sólidos de todos los tipos, por ejemplo, de cabeza y cuello, pulmón, riñón, hígado, hueso, cerebro y similares, particularmente de cáncer y displasia uterino y cervical, melanoma y cáncer de mama, colon, próstata, pulmón (de células pequeñas y de células no pequeñas) y páncreas.

Las formulaciones de la presente invención se administran ya sea como monoterapia o en combinación con otros agentes para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas. La formulación de la presente invención opcionalmente se administra al paciente sustancialmente al mismo tiempo como otro (s) agente (s) antineoplásico (s), o el agente (s), se combina (n) con la formulación de la presente invención, y luego se administra simultáneamente al paciente. Los agentes antineoplásicos típicos, útiles con el compuesto 1 (ya sea combinados con éste en cantidades terapéuticamente efectivas o administrado simultáneamente) incluyen cualquiera de los terapéuticos empleados actualmente en el tratamiento de enfermedades malignas, incluyendo los utilizados para enfermedades hematológicas malignas que se mencionan en los antecedentes de la invención antes expuestos. Estos agentes acompañantes se administran (a) sustancialmente al mismo tiempo pero por vías de administración diferentes, (b) se combinan con la formulación de la presente invención y se administran simultáneamente, o (c) se administran durante periodos alternativos (por ejemplo, durante un periodo de descanso del tratamiento con el compuesto 1). En general, si se utiliza en combinación, la formulación de la presente invención se combina terapéuticamente con otro agente antineoplásico, elegido de una clase distinta, como por ejemplo un anticuerpo monoclonal.

El tratamiento de NHL típicamente incluye ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y rituximab. Si se utiliza en combinación, el compuesto 1 se administra en un curso terapéutico junto con, o en sustitución de, uno o más de los agentes antes mencionados. El compuesto 1 puede también administrarse en combinación con el rituximab. Para la terapia de CLL, se administra el compuesto 1, ya sea como monoterapia o en combinación con otros agentes, tales como ciclofosfamida y/o rituximab. Otros agentes teraupéuticos adecuados para utilizarse con el compuesto 1 incluyen etoposido, melfalán, nitrosurea, busulfan, complejos de platino, alquilantes no clásicos tales como procarbazina, antimetabolitos tales como folato, purinas, análogos de adenosina, análogos de pirimidina, alcaloides de vinca y similares.

En base a las observaciones de toxicología de una sola dosis en perros, es razonable asumir que una dosis del compuesto 1 de entre 1 mg/kg/día y 3 mg/kg o mayor, hasta aproximadamente 10 mg/kg/día sería eficaz en perros (cuando se utilice una sal de ácido orgánico del compuesto 1, la dosis se ajustaría para tener en cuenta el peso adicional de la sal). Asumiendo que el perfil PK del compuesto en seres humanos sea similar al observado en perros, los hallazgos a la fecha sugieren una dosis eficaz en seres humanos del compuesto 1 (corregida para área de superficie por los factores de 0,54) de entre 0,54 mg/kg IV y 1,62 mg/kg IV o mayor, administrada como una sola dosis con administraciones repetidas de aproximadamente 1 a 14 días, generalmente semanalmente o cada dos semanas, típicamente semanalmente para 2 dosis, dependiendo de la condición del paciente y tolerancia a la infusión, entre otros factores. Dado que debería esperarse una variación considerable en dosis adecuadas, debido a la naturaleza única de los cánceres individuales, la condición del paciente, la tolerancia del paciente y otros aspectos conocidos para el oncólogo común, el rango de dosis efectivas será mayor al modelo experimental central. Por esta razón, se espera que un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,5 a 5,4 mg/kg/día sea adecuado. Una sola dosis es adecuada, pero se prevé que los ciclos múltiples de dosis sean típicos, con un periodo de descanso de aproximadamente 10 a 30, generalmente de 23 días entre ciclos, nuevamente dependiendo de la condición del paciente y la tolerancia al terapéutico, como será evidente para alguien con conocimientos ordinarios en la materia.

Toda la bibliografía y citas de patentes antes mencionadas se incorporan aquí expresamente por referencia. La invención se ha descrito con suficiente detalle para permitir a una persona con conocimientos ordinarios en la materia preparar y utilizar la invención estipulada en las siguientes reivindicaciones. Los siguientes son ejemplos de

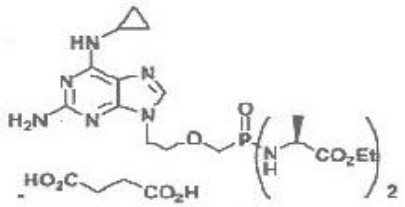
la presente invención, y no deben ser considerados como límites a la misma.

Ejemplo 1

Una mezcla de cPrPMEDAP (1,64 g, 5 mmol), éster de Ala-etilo, HCl (4,62 g, 30 mmol) y TEA (8,36 ml, 60 mmol) se trató con 10 ml de piridina anhidra, y se calentó a 60º C para alcanzar una solución homogénea. Se agregó una solución de Aldritiol-2 (7,78 g, 35 mmol) y trifenilfosfina (9,18 g, 35 mmol) en 10 ml de piridina anhidra. La mezcla resultante se calentó a 60º C durante la noche. Después de enfriarla, la solución de color amarillo brillante se vertió dentro de bicarbonato de sodio acuoso saturado, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución salina, luego se secó sobre sulfato de sodio. Después de retirar el solvente, el residuo crudo se purificó por medio de cromatografía ultrarrápida, utilizando acetato de etilo al 100%, y luego cambiando a MeOH/DCM al 10 a 15% para diluir el producto deseado (1,12 g, rendimiento 43%).

<u>Formación de sal succinato:</u>

El profármaco neutro (2,60 g) se disolvió en una solución de ácido succínico (583 g) en etanol (15 ml). Siguiendo a la adición de 50% v/v de n-heptano/etanol (20 ml), la sal deseada se aisló mediante filtración (2,26 g; Punto de Fusión 130º C).

Estructura química	
Fórmula molecular	$C_{21}H_{35}N_8O_6P.C_4H_6O_4$
Peso molecular	526,53
Peso de la fórmula	644,61
Apariencia física	Polvo blanco
Punto de fusión	130ºC
Solubilidad	>39 mg/ml (pH 4,2 - 4,7)

Ejemplo 2

La Tabla 1 muestra la CE_{50} antiproliferación del compuesto 1 y sus metabolitos, cpr-PMEDAP (9-(2-fosfonilmetoxietil)-N^6-ciclopropil-2,6-diaminopurina), PMEG (9-(2-fosfonilmetoxietil)guanina), y PMEDAP (9-(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina). También se sometió a prueba una variedad de compuestos que se utilizan para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo un inhibidor de la ADN polimerasa (ara-C), inhibidores de la ADN polimerasa/ribonucleótido reductasa (cladribina, clofarabina, fludarabina, gemcitabina), e inhibidor de la adenosina desaminasa (desoxicoformicina), un inhibidor de metilación de ADN (decitabina), un alquilante de ADN (doxorubicina) y un inhibidor de mitosis (vincristina). Todos los compuestos, con la excepción de la doxorubicina y la vincristina son análogos de nucleósidos; el ara-C, gemcitabina y decitabina son análogos de citosina y el resto son análogos de adenosina. El cpr-PMEDAP y el PMEG pueden considerarse análogos de adenosina y guanosina, respectivamente. Se probaron los compuestos utilizando linfoblastos humanos y caninos (estimulados con una fitohemaglutina mitógena de célula T (PHA) o un mitógeno de célula B de ombú (PWM)), dos líneas de células linfoides derivadas de pacientes con leucemia linfocítica aguda (CEM y Molt- 4), dos líneas de células mieloides derivadas de pacientes con leucemia mielógena aguda (KG-1 y HL-60), dos líneas celulares de linfoides B derivadas de linfoma de Burkitt (Daudi y Raji), una célula linfoide de linfoma no de Hodgkin (RL), una línea de células T de linfoma T cutáneo (PM-1), y una línea celular monocítica de linfoma histiocítico (U937).

El compuesto 1 mostró actividad antiproliferativo en una variedad de linfoblastos y líneas celulares de leucemia/linfoma. Su intervalo de CE_{50} es de entre 27 y 1043 nM, similar al de la clofarabina (25-418 nM) y ara-C (23-1820 nM), dos análogos de nucleósido comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas. Entre otros nucleósidos, la gemcitabina fue la más potente (3,4 a 18 nM) y la desoxicoformicina fue la más potente (> 200.000 nM). Entre todos los compuestos, la vincristina (0,6 a 5,3 nM) mostró la potencia más alta. No existió diferencia significativa entre la actividad del compuesto 1 en células humanas y su actividad en células caninas. Además, no se observó diferencia entre los blastos de PHA (predominantemente células T) y los blastos PWM (predominantemente células B) o entre líneas celulares linfoides T y B. Por esta razón, a diferencia de otro análogo de guanosina, la nelarabina, que solamente es efectivo contra los linfomas de células T, el compuesto 1 puede ser efectivo tanto en linfomas de células T como B.

En la mayoría de los tipos celulares probados, el cpr-PMEDAP, que es el producto hidrolizado del compuesto 1, fue significativamente menos potente que el compuesto 1, lo que sugiere que el profármaco de fosforamidata mejoró la entrada del fármaco en las células, y que el grupo del profármaco se segmentó dentro de las células. El PMEG, que es el producto desaminado del cpr-PMEDAP se mostró significativamente más potente que el producto dialquilado PMEDAP, consistente con la hipótesis de que la molécula activa para actividad antiproliferativo del compuesto 1 es PMEGpp.

Tabla 1. CE_{50} antiproliferación (nM) en linfoblastos humanos, linfoblastos caninos y líneas celulares humanas obtenidas de pacientes con leucemia/linfoma

	Blasto de PHA (células T humanas)	Blasto de PWM (células B humanas)	Blasto de PHA (células T caninas)	Blasto de PWM (células B caninas)	CEM (linfoide T)	Molt 4 (linfoide T)	KG-1](Mieloide)
Compuesto 1	135	42	30	14	156	27,3	1043
GS-8369 (cpr-PMEDAP)	2348	N.D	N.D	N.D.	2217	1473	1109
PMEG	1679	N.D	N.D	N.D	5195	1739	2928
PMEDAP	8953	N.D	N.D	N.D	19874	27896	7633
Ara-C (Citarabina)	1820	N.D	N.D	N.D	143	23	56
Gemcitabina	9.6	N.D	N.D	N.D	21	8,5	5,7
Clofarabina	62	126	146	93	418	25	60

(continuación)

Cladribina	**296**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**1167**	**74**	**89**
Fludarabina desfosfatada	**1102**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**>40.000**	**1550**	**4518**
Desoxicoformicina (pentostasina)	**>200.000**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**>200,000**	**>200,000**
Decitabina	**204**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**3004**	**580**	**83**
Doxorubicina	**7,6**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**N.D**	**1,2**	**28**
Vincristina	**2,4**	**0,9**	**0,9**	**0,9***	**2**	**0,4**	**3,2**

	HL-60 (Mieloide)	RL (linfoide B)	Daudi (linfoide B)	Raji (linfoide B)	PM-1 (linfoide T)	U937 (Monocítico)
Compuesto 1	214	78	27	89*	125	394
GS-8369 (cpr-PMEDAP)	1608	N.D	1838		6725	4478
PMEG	3918	N.D	994	2724	4022	4009
PMEDAP	21667	N.D	14045	24899	22732	24445
Ara-C (Citarabina)	212	610	209	23	194	38

(continuación)

Gemcitabina	8,6	18	6	3,4	16	31
Clofarabina	73	49,5	221	19,4	145	37
Cladribina	50*	4	525	12	40	20
Fludarabina desfosfatada	1768	N.D	N.D	N.D	12857	300
Desoxi coformicina (pentostasina)	>200.000	N.D	N.D	N.D	N.D	>200.000
Decitabina	3831	N.D	N.D	N.D	>20.000	77
Doxorubicina	24	25	3,8	8,6	29,5	13
Vincristina	2	1,4	0,6	2,5	5,3	2,8

Los linfoblastos PHA se generaron mediante incubación de las células sanguíneas mononucleares (PBMC) con PHA mitógeno de células T (1 µg/ml) durante 3 días, seguida de incubación con 10 U/ml de interleucina-2 durante 4 días más. Los linfoblastos de PWM se generaron mediante incubación de células B (purificadas a partir de PBMC, utilizando perlas magnéticas conjugadas en CD19) con PWM (20 µg/ml) durante 7 días.

Los linfoblastos (150.000 células por pocillo de microtitulación) y líneas celulares de leucemia/linfoma (30.000 células por pocillo) fueron incubados con diluciones en serie de 5 veces de los compuestos durante 3 días. Se llevó a cabo un estudio BrdU como sigue: los linfoblastos se incubaron con diluciones en serie de 5 veces de compuestos en placas para microtitulación (150.000 células por pocillo) durante 3 días. El día 3, se marcaron las células con 10 µM de BrdU durante 3 horas, y la cantidad de BrdU que se incorporó en el ADN celular se cuantificó por medio de un Estudio Inmunosorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Alternativamente, las células se incubaron con 1 mg/ml de reactivo XTT (hidrato de ácido 3,3'-[1[(fenilamino) carbonil]-3,4-tetrazolio]-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico de sodio) y PMS al 1% (metosulfato de fenazina) durante 2 horas, y se cuantificó el cambio de color (la dehidrogenasa mitocondrial reduce el XTT de color amarillo a sal de formazano de color naranja). Los datos experimentales se utilizaron para generar curvas sigmoidales de respuesta a la dosis y se calcularon valores de concentración efectiva del 50% (CE_{50}) utilizando el software GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, Estados Unidos). Los estudios se repitieron de 2 a 20 veces, hasta que el error estándar de la media (SEM) quedó por debajo del 50% del valor de la media.

En la mayoría de los casos, los estudios se repitieron de 2 a 20 veces, hasta que el SEM quedó por debajo del 50% del valor de la media.

*Datos de las variables (SEM > 0,5 promedio de CE_{50}), N.D; no se realizó.

Ejemplo 3

Distribución de profármacos entre PBMC y Plasma en Perros

Los perros se administraron en diversos profármacos de cpr-PMEDAP como 0,2 mg/kg en infusiones intravenosas de 30 minutos. Los profármacos 1 a 4 son monoamidatos (el fósforo también se sustituyó con fenoxi), mientras que los dos compuestos fueron bis(amidatos). Los compuestos A y B fueron enantiómeros sustancialmente aislados en el centro quiral del átomo de fósforo, mientra que el monoAlatBU fue el racemato en este sitio. El isómero L fue alanina.

*La sangre se recogió en EDTA de potasio y se separó mediante centrifugación. Las células sanguíneas mononucleares primarias (PBMC) se recogieron utilizando tubos de CPT (citrato de sodio).

*Para el análisis, las muestras de plasma se precipitaron mediante la adición de 100 µL de acetonitrilo que contenían patrones internos (D4AP y TDF) a 100 µl de plasma para análisis de profármaco. Después de la precipitación de proteína por centrifugación, se transfirieron 100 µl a otro tubo para secarse y luego reconstituirse en 100 µl de agua con 0,2% de ácido fórmico. Se inyectó una alícuota de 20 µl dentro de la columna para análisis LC/MS/MS. El análisis se realizó utilizando una columna Synergi Fusion-RP 80A de 4 µm, de 150x2.0 mm (Fenomenex) y un gradiente lineal de etapas múltiples de 0,5 a 99% de acetonitrilo en presencia de 0,2% de ácido fórmico a 0,25 ml/min. Los analitos se detectaron utilizando un espectrómetro de masa Sciex API-4000, mediante ionización de electropulverización en modo MRM positivo. Las muestras se analizaron por GS-327260, -8369, -0573 y -0438.

*Las muestras de PBMC se lisaron en MeOH al 70%. Se utilizaron alícuotas separadas de células de cada punto de tiempo resuspendidas en 100% de suero para establecer las cantidades de células en cada muestra. Las muestras celulares se normalizaron $15x10^6$ células por muestra. Se observaron grados variables de hemólisis. Un 70% de MeOH que contenía material celular extraído se dividió en dos formas para análisis directo y defosforilación y se secaron por separado.

*Después del secado, las muestras para análisis directo se volvieron a suspender en acetonitrilo al 20% que contenía patrones internos (TDF y D4AP) y se analizaron para GS-327260, -8369. Se inyectaron 20 µl para análisis de LC/MS/MS utilizando una columna Synergi Hydro-RP (Phenomenex) 80A de 4 µm de 50x2,0 mm (Fenomenex) y un gradiente lineal de etapas múltiples de 0 a 95% de acetonitrilo en presencia de ácido fórmico al 0,2% a 1,0 ml/min. Los analitos se detectaron utilizando un espectrómetro de masa Sciex API-4000, mediante ionización por electropulverización en modo MRM positivo.

*Después del secado, se trató a las mezclas para defosforilación con 1U de fosfatasa intestinal de ternera (fosfotasa alcalina, Sigma) durante 2 h en un tampón proporcionado por el fabricante. Las muestras se ajustaron entonces a acetonitrilo al 60% secado y resuspendido en acetonitrilo al 60% que contenía patrones internos (TDF y D4AP) y se analizaron para detectar cpr-PMEDAP como se describe para el análisis de PBMC directo.

Tabla: Comparación de exposición de plasma y PBMC a cpr-PMEDAP (CPMEDAP) después de la administración del profármaco a un perro Beagle mediante infusión intravenosa de 30 minutos.

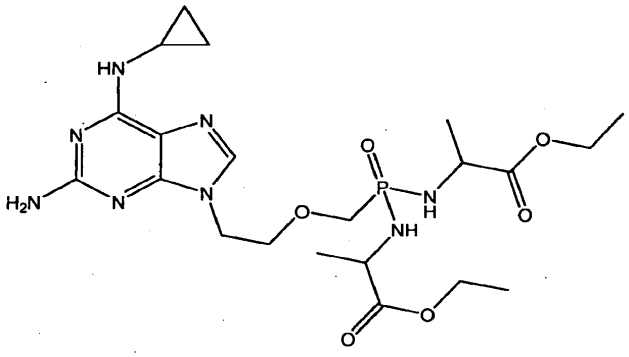
Compuesto nº	Profármaco	CPMEDAP en plasma AUC_{0-24}(nM h)	PBMC CPMEDAP AUC_{0-24}(nM h)	Proporción PBMC respecto a plasma
1	MonoAlaiPr	538±181	9,179±450	17
2	MonoAlatBu	144±77	1,790±468	12
3	MonoAlatBu(A)	78±34	1,453±1412	19
4	MonoAlatBu(B)	BLOQ[a]	ND[b]	ND
5	BisAlaiPr	4,470±2,040	5,380±1,320	1,2
CPMEDAP	BisAlaEth	59±38	7,550±3,450	130

[a]BLOQ = Por debajo del límite inferior de cuantificación. Para CPMEDAP en plasma este valor fue de 20 nM.

[b]ND = No determinado. No se recolectaron muestras de PBMC para la administración del compuesto 4

REIVINDICACIONES

1. Una sal de ácido orgánico del compuesto



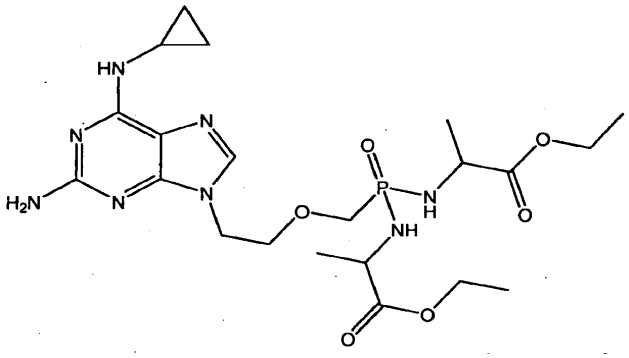
y/o sus tautómeros y solvatos.

2. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el ácido orgánico es ácido succínico.

3. Una solución acuosa estéril que contiene la sal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y un carbohidrato.

4. El uso de la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para preparar una composición farmacéutica para tratar un neoplasma.

5. Una combinación que comprende (a) un envase adecuado para un producto farmacéutico parenteral y colocado en él (b) una dosis terapéuticamente efectiva del compuesto



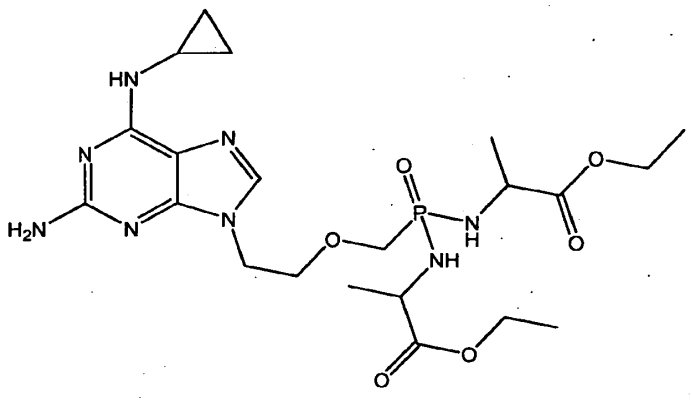
6. La combinación de la reivindicación 5 en la que el compuesto se encuentra en una solución acuosa sustancialmente isotónica.

7. La combinación de la reivindicación 5 en la que el ácido orgánico es ácido succínico.

8. La combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en la que el envase comprende un puerto estéril

9. La combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en la que el envase es un vial o una bolsa flexible.

10. El uso del compuesto



y/o sus sales, tautómeros y solvatos para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad hematológica maligna.

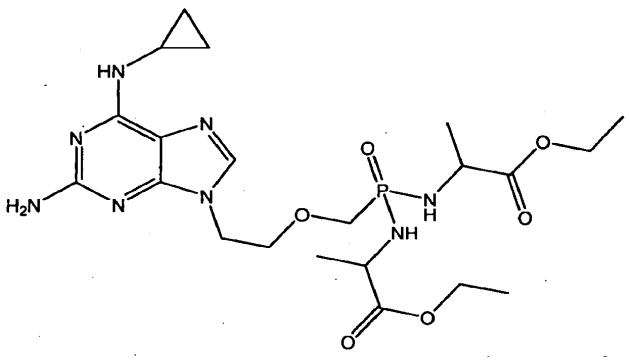
11. El uso de la reivindicación 10 en el que la enfermedad hematológica maligna es mieloma múltiple o síndrome mielodisplásico.

12. El uso de la reivindicación 10 en el que la enfermedad hematológica maligna es una leucemia o un linfoma.

13. El uso de la reivindicación 10 en el que se usa una sal de ácido orgánico del compuesto.

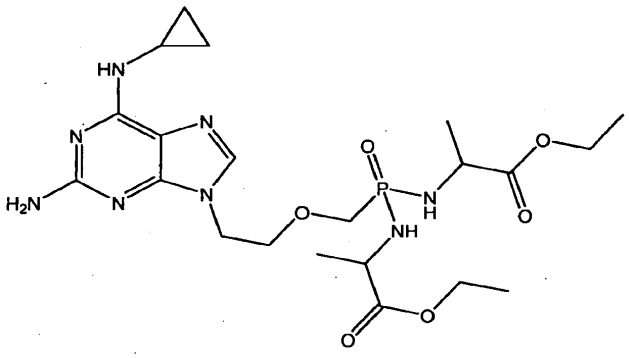
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en el que la composición es para administración parenteral.

15. Una composición que comprende el compuesto



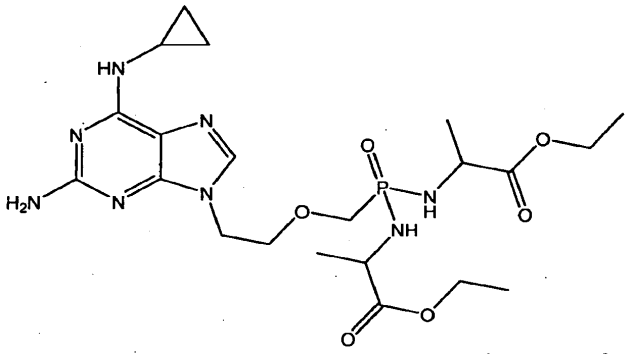
y/o sus sales, tautómeros y solvatos, y al menos otro agente útil en el tratamiento de una enfermedad hematológica maligna.

16. Un procedimiento que comprende preparar una sal de ácido orgánico del compuesto



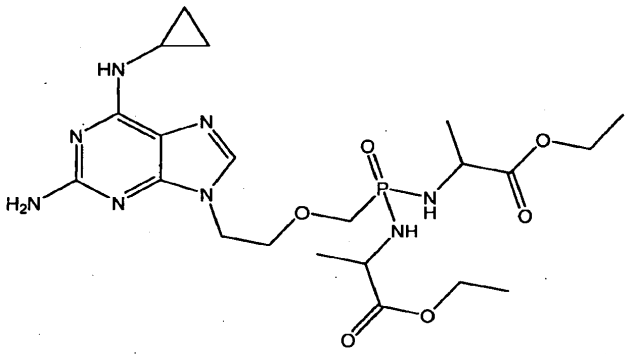
y un carbohidrato en una solución acuosa estéril, y almacenar dicha solución durante un periodo mayor de aproximadamente una hora.

17. Una composición envasada que comprende una solución acuosa estéril de (a) un carbohidrato y (b) una sal de ácido orgánico del compuesto



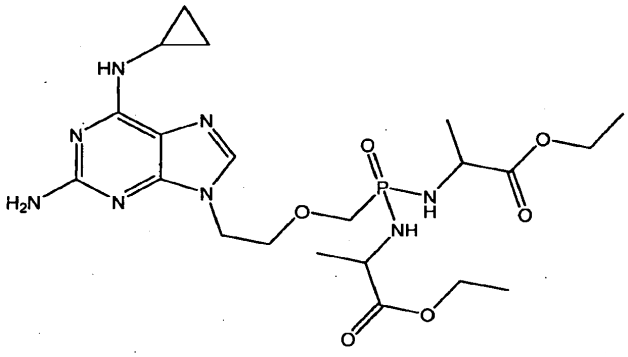
y/o sus tautómeros y solvatos, junto con la descripción de que la solución opcionalmente se almacena durante un periodo superior a aproximadamente 1 hora.

18. Una sal del ácido orgánico del compuesto



y/o sus sales, tautómeros y solvatos para su uso en un procedimiento de tratamiento de un neoplasma.

19. El compuesto



y/o sus sales, tautómeros y solvatos para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad hematológica maligna.