

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 011**

51 Int. Cl.:
C07H 19/04 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08840633 .5**
96 Fecha de presentación: **16.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2207786**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2010**

54 Título: **2'-fluoro-2'-desoxitetrahidrouridinas como inhibidores de la citidina desaminasa**

30 Prioridad:
16.10.2007 US 980397 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2012

73 Titular/es:
EISAI INC.
100 TICE BOULEVARD
WOODCLIFF LAKE, NJ 07677, US

72 Inventor/es:
HAMILTON, Gregory S.;
TSUKAMOTO, Takashi;
FERRARIS, Dana V.;
DUVALL, Bridget y
LAPIDUS, Rena

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 011 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

2'-fluoro-2'-desoxitetrahidrouridinas como inhibidores de la citidina desaminasa

La solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EEUU nº 60/980.397, presentada el 16 de octubre de 2007, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia.

5 Campo de la invención

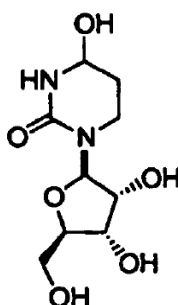
La presente invención proporciona ciertos compuestos derivados de tetrahidrouridina que son inhibidores de la enzima citidina desaminasa, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, y métodos para preparar y utilizar dichos compuestos.

Antecedentes

10 Las enzimas adenosina desaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) y citidina desaminasa (CDA, EC 3.5.4.5) actúan para desaminar los nucleósidos de aminopurina y aminopirimidina naturales, respectivamente, en seres humanos y otros organismos. También pueden convertir fármacos basados en nucleósidos activos en los metabolitos inactivos. Por ejemplo, el fármaco de nucleósido de purina arabinosiladenina (fludarabina, ara-A) es desaminado por ADA; el compuesto resultante, con el grupo amino de origen reemplazado por hidroxilo, es inactivo como agente antitumoral comparado con el compuesto de origen. De forma similar, el fármaco antileucemia arabinosilcitosina (citarabina, ara-C) es degradado metabólicamente por CDA para producir arabinosiluracilo inactivo.

La CDA es un componente de la vía de rescate de pirimidina. Convierte la citidina y la desoxicitidina en uridina y desoxiuridina, respectivamente, mediante una desaminación hidrolítica (Arch. Biochem. Biophys., 1991, 290, 285-292; Methods Enzymol., 1978, 51, 401-407; Biochem. J., 1967, 104, 7P). También desamina una serie de análogos de citosina sintéticos que son fármacos útiles desde el punto de vista clínico, tales como ara-C mencionado anteriormente (Cancer Chemother. Pharmacol., 1998, 42, 373-378; Cancer Res., 1989, 49, 3015-3019; Antiviral Chem. Chemother., 1990, 1, 255-262). La conversión de los compuestos de citosina en los derivados de uridina habitualmente confiere la pérdida de actividad terapéutica o la adición de efectos secundarios. También se ha demostrado que los cánceres que adquieren resistencia a fármacos de análogos de citosina a menudo sobreexpresan la CDA (Leuk Res., 1990, 14, 751-754). Las células leucémicas que expresan un alto nivel de CDA pueden manifestar resistencia a antimetabolitos de citosina y, con ello, se limita la actividad antineoplásica de dichos productos terapéuticos (Biochem. Pharmacol., 1993, 45, 1857-1861). Por tanto, los inhibidores de CDA podrían ser adyuvantes útiles en la quimioterapia de combinación.

Desde hace varios años se sabe que la tetrahidrouridina (THU) es un inhibidor de la citidina desaminasa.

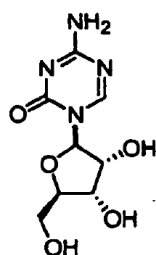


30

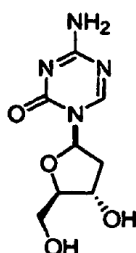
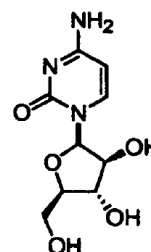
Tetrahidrouridina (THU)

Diversos informes han sugerido que una coadministración con THU aumenta la eficacia y la actividad oral de fármacos basados en citidina. Se ha demostrado que la THU potencia la actividad oral del agente antileucémico 5-azacitidina en ratones leucémicos L1210 (Cancer Chemotherapy Reports, 1975, 59, 459-465). La combinación de THU y 5-azacitidina también se ha estudiado en un modelo de anemia falciforme de babuino (Am. J. Hematol., 1985, 18, 283-288), y en pacientes humanos con anemia falciforme en combinación con 5-azacitidina administrada por vía oral (Blood, 1985, 66, 527-532).

35



5-azacitidina

5-aza-2'-desoxicitidina
(decitabina)

ara-C

También se ha demostrado que la THU potencia la eficacia oral de ara-C en ratones leucémicos L1210 (Cancer Research, 1970, 30, 2166; Cancer Invest., 1987, 5, (4), 293-299), y en ratones que portan tumores (Cancer Treat. Rep., 1977, 61, 1355-1364). Se ha investigado la combinación de ara-c administrada por vía intravenosa con THU administrada por vía intravenosa en varios estudios clínicos en seres humanos (Cancer Res., 1988, 48, 1337-1342). En particular, se han realizado estudios de combinación en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia mieloide crónica (CML) (Leukemia, 1991, 5, 991-998; Cancer Chemother. Pharmacol., 1993, 31, 481-484).

La 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) es un agente antineoplásico para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS), con utilidad potencial también para el tratamiento de AML y CML. Al igual que otros fármacos con base de citidina, su biodisponibilidad oral y su eficacia están limitadas por la desactivación por CDA. Se ha demostrado que la THU mejora la potencia de la decitabina en un modelo de enfermedad falciforme en babuinos (Am. J. Hematol., 1985, 18, 283-288). Además, se ha demostrado que otro inhibidor de CDA conocido, la zebularina, potencia la eficacia de la decitabina en ratones con leucemia L1210 (Anticancer Drugs, 2005, 16, 301-308).

La gemcitabina, otro fármaco antineoplásico con base de citidina, también se ha estudiado junto con inhibidores de CDA (Biochem. Pharmacol., 1993, 45, 1857-1861). Se ha demostrado con la coadministración con THU altera la farmacocinética y la biodisponibilidad de la gemcitabina en ratones (Abstr. 1556, 2007 AACR Annual Meeting, abril 14-18, 2007, Los Angeles, CA; Clin. Cancer Res., 2008, 14, 3529-3535).

La 5-fluoro-2'-desoxicitidina (florocitidina, FdCyd) es otro fármaco anticáncer con base de citidina que es un inhibidor de la ADN metiltransferasa. Se ha estudiado la modulación de su metabolismo y su farmacocinética por THU en ratones (Clin. Cancer Res., 2006, 12, 7483-7491; Cancer Chemother. Pharm., 2008, 62, 363-368).

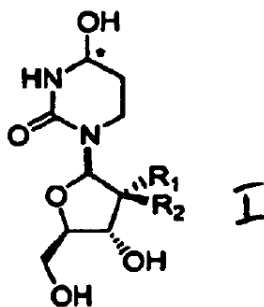
Los resultados de los estudios mencionados anteriormente sugieren que existe una utilidad terapéutica en la administración de inhibidores de CDA junto con fármacos con base de citidina, tales como ara-C, decitabina, 5-azacitidina y otros. Sin embargo, inhibidores tempranos de CDA, tales como THU, tienen inconvenientes que incluyen inestabilidad frente a ácidos (J. Med. Chem., 1986, 29, 2351) y baja biodisponibilidad (J. Clin. Pharmacol., 1978, 18, 259).

Por tanto, existe una necesidad en curso de nuevos y potentes inhibidores de CDA terapéuticamente útiles.

Breve resumen de la invención

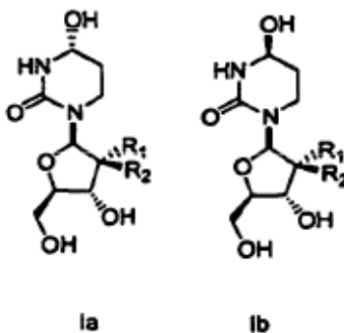
La presente invención proporciona ciertos compuestos derivados de tetrahidouridina, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, y métodos para preparar y utilizar dichos compuestos. Los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención pueden proporcionar ciertos beneficios. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones de la invención pueden inhibir la actividad de la enzima CDA y/o potenciar la semivida, la biodisponibilidad y/o la eficacia de fármacos que son sustratos para la CDA. Además, los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención pueden mostrar una solubilidad acuosa, estabilidad química, niveles de absorción del fármaco, niveles de toxicidad, caducidad, reproducibilidad en la fabricación y la formulación, y eficacia terapéutica mejorados.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I:

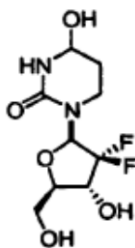


5 o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica o un método de uso descritos pueden comprender un compuesto con una configuración (R), con una configuración (S), o una mezcla de configuraciones (R) y (S).

En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I tiene la estereoquímica de la a o lb:



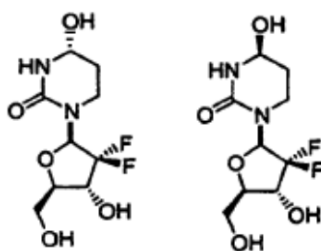
En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I es el compuesto 1 o su sal farmacéuticamente aceptable:



10

Compuesto 1

En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 1a, 1b, y sus sales farmacéuticamente aceptables.



Compuesto 1a Compuesto 1b

Puesto que los compuestos de la invención pueden poseer al menos un centro quiral, pueden existir en forma de enantiómeros, diastereómeros, mezclas racémicas, mezclas no racémicas u otros estereoisómeros. La presente invención incluye todos estos posibles isómeros, así como los isómeros geométricos y los tautómeros.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- 5 (i) una cantidad eficaz de un compuesto de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa; y
- (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica también comprende una cantidad eficaz de al menos otro agente terapéutico, tal como un fármaco sustrato de CDA o un agente quimioterapéutico.

- 10 La "cantidad eficaz" del compuesto de la invención puede variar del 0,1% en peso a aproximadamente 100% en peso. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto es del 0,1% al 20% en p/p. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es del 1-10% en p/p. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es del 2-5% en p/p.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para la administración en una forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) la administración oral, por ejemplo, bebidas (por ejemplo, disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (por ejemplo, los dirigidos a la absorción bucal, sublingual y sistémica), comprimidos oblongos, píldoras grandes, polvos, gránulos, pastas para la aplicación a la lengua, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de gelatina blanda, pulverizados bucales, trociscos, pastillas para chupar, gránulos, jarabes, suspensiones, elixires, líquidos, emulsiones y microemulsiones; (2) la administración parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma, por ejemplo, de una disolución o una suspensión estéril; (3) la aplicación tópica, por ejemplo en forma de una crema, ungüento, parche, almohadilla o pulverizado aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo en forma de un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la liberación inmediata, sostenida o controlada.
- 20

- 25 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración oral. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración oral en forma sólida.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para inhibir la citidina desaminasa, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

- 30 Otra realización de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la presente invención en un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite:
- (i) una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa; y
- (ii) un fármaco sustrato de CDA, que incluye pero no se limita a cada realización expresa descrita en la presente.

- 35 En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

- 40 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cánceres hematológicos y cánceres sólidos. En otras realizaciones, el cáncer hematológico se selecciona de MDS y leucemia. En otras realizaciones, el cáncer sólido se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de pulmón no microcítico, y cáncer de mama. En otras realizaciones, la leucemia es la leucemia mieloide aguda (AML) o la leucemia mieloide crónica (CML).

- 45 Otra realización de la presente invención se refiere a un método para inhibir la degradación de un fármaco sustrato de CDA por la citidina desaminasa, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa, a un sujeto que está sometido a un tratamiento con el fármaco sustrato de CDA. El fármaco sustrato de CDA incluye pero no se limita a cada realización expresa descrita en la presente.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia inducida por decitabina en el modelo de linfoma de ratón L1210.

- 50 La figura 2 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1a sobre la supervivencia inducida por decitabina en

el modelo de linfoma de ratón L1210.

La figura 3 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia inducida por Ara-C (200 mg/kg) en el modelo L1210.

5 La figura 4 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia inducida por Ara-C (100 mg/kg) en el modelo L1210.

La figura 5 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia inducida por Ara-C (50 mg/kg) en el modelo L1210.

La figura 6 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la supervivencia inducida por Ara-C (25 mg/kg) en el modelo L1210.

10 La figura 7 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto 1 sobre la reducción del volumen tumoral inducida por gemcitabina en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano A2780 en ratón.

La figura 8 es un diagrama ORTEP de la estructura cristalina del compuesto 1a.

La figura 9 es la estructura de RMN de ^1H de THU en D_2O .

15 La figura 10 es la estructura de RMN de ^1H de THU en D_2O , en presencia de ácido trifluoroacético, en diferentes momentos.

La figura 11 es la estructura de RMN de ^1H del compuesto 1a en D_2O .

La figura 12 es la estructura de RMN de ^1H del compuesto 1a en D_2O , en presencia de ácido trifluoroacético, en diferentes momentos.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona ciertos compuestos derivados de tetrahidouridina, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, y métodos para preparar y utilizar dichos compuestos. Los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención pueden proporcionar ciertos beneficios. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones de la invención pueden inhibir la actividad de la enzima CDA y/o potenciar la semivida, la biodisponibilidad y/o la eficacia de fármacos que son sustratos para la CDA. Además, los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención pueden mostrar una solubilidad acuosa, estabilidad química, niveles de absorción del fármaco, niveles de toxicidad, caducidad, reproducibilidad en la fabricación y la formulación, y eficacia terapéutica mejorados.

Definiciones

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones se aplican las siguientes definiciones.

30 Tal como se emplea en la descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares “el/la” y “un/una” incluyen los referentes plurales, a menos que el contenido imponga claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a que una composición farmacéutica comprende “un compuesto” puede incluir dos o más compuestos.

35 Un “fármaco sustrato de CDA” se refiere a un fármaco que puede ser desaminado por la CDA. Los ejemplos no limitantes de un sustrato de CDA incluyen análogos de citidina, tales como decitabina, 5-azacitidina, gemcitabina, ara-C, troxacitabina, tezacitabina, 5'-fluoro-2'-desoxicitidina, y citoclor.

Una “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad requerida para producir un efecto deseado (por ejemplo, potenciar la semivida, la biodisponibilidad o la eficacia de un fármaco sustrato de CDA, tratar el cáncer en un sujeto, inhibir la citidina desaminasa en un sujeto, o inhibir la degradación de un fármaco sustrato de CDA por la citidina desaminasa).

40 La “semivida” se refiere al periodo de tiempo requerido para que la concentración o la cantidad de un compuesto en un sujeto se reduzca exactamente a la mitad de una concentración o una cantidad dadas.

45 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a las propiedades y/o las sustancias que son aceptables para el paciente desde el punto de vista farmacológico y/o toxicológico, y/o para el químico farmacéutico fabricante desde el punto de vista físico y/o químico con respecto a la composición, la formulación, la estabilidad, la aceptación por el paciente, la biodisponibilidad y la compatibilidad con otros ingredientes.

Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” puede significar cualquier sustancia, que en sí misma no es un agente terapéutico, que se emplea como portador, diluyente, ligante y/o vehículo para el transporte de un agente terapéutico a un sujeto, o que se añade a una composición farmacéutica para mejorar su manipulación o sus propiedades de conservación, o para permitir o facilitar la formación de un compuesto o de una composición en una forma de

dosificación unitaria para la administración. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son muy conocidos en las técnicas farmacéuticas y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa (por ejemplo, 20ª ed., 2000), y Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C. (por ejemplo, 1ª, 2ª y 3ª eds., 1986, 1994 y 2000, respectivamente). Tal como saben los expertos en la técnica, los excipientes pueden proporcionar una diversidad de funciones, y pueden describirse como agentes humectantes, agentes tamponantes, agentes suspensores, agentes lubricantes, emulgentes, disgregantes, absorbentes, conservantes, tensioactivos, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, e hidroxipropilcelulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como mantequilla de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) disolución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones con pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de ácido o de base de un compuesto de la invención, poseyendo dicha sal la actividad farmacológica deseada y no siendo biológicamente indeseable ni indeseable de otra forma. La sal puede formarse con ácidos que incluyen, sin limitación, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Los ejemplos de una sal de base incluyen, sin limitación, sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos, tales como arginina y lisina. En algunas realizaciones, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes que incluyen haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de aralquilo, tales como bromuros de fenetilo.

Una "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosificación unitaria para sujetos humanos u otros sujetos animales. Cada forma de dosificación unitaria puede contener una cantidad predeterminada de una sustancia activa (por ejemplo, un compuesto o una composición de la invención, un fármaco sustrato de CDA y/u otro agente terapéutico) calculada para producir un efecto deseado.

"Isómeros" se refiere a compuestos que tienen el mismo número y tipo de átomos y, por tanto, el mismo peso molecular, pero se diferencian con respecto a la disposición o la configuración de los átomos.

"Estereoisómeros" se refiere a isómeros que se diferencian sólo en la disposición de los átomos en el espacio.

"Diastereoisómeros" se refiere a estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí.

"Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros que son imágenes especulares entre sí no superponibles. Los enantiómeros incluyen isómeros "enantioméricamente puros" que comprenden sustancialmente un único enantiómero, por ejemplo, mayor o igual que 90%, 92%, 95%, 98%, o 99%, o igual a 100% de un único enantiómero.

"Epímeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que tienen diferentes configuraciones sólo en uno de varios centros estereogénicos.

"Racémico" se refiere a una mezcla que contiene partes iguales de enantiómeros individuales.

"No racémico" se refiere a una mezcla que contiene partes desiguales de enantiómeros individuales. Una mezcla no racémica puede estar enriquecida en la configuración R o S e incluye, sin limitación, mezclas de enantiómeros R a S o de enantiómeros S a R de aproximadamente 50/50, aproximadamente 60/40 y aproximadamente 70/30.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o la circunstancia descrita a continuación puede o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que el acontecimiento o la circunstancia ocurre y casos en que no ocurre. Por ejemplo, un alquilo que esté "opcionalmente sustituido" incluye un alquilo que no está sustituido y un alquilo que está sustituido.

Un "sujeto" se refiere a una célula o a un tejido, *in vitro* o *in vivo*, un animal o un ser humano. Un sujeto animal o humano también puede denominarse un "paciente".

Un "animal" se refiere a un organismo vivo que tiene sensaciones y el poder de movimiento voluntario, y que

requiere para su existencia oxígeno y comida orgánica.

Un “mamífero” se refiere a un animal vertebrado de sangre caliente con pelo. Los ejemplos incluyen, sin limitación, miembros de la especie humana, de especies equinas, porcinas, bovinas, murinas, caninas o felinas.

5 “Tratar”, en referencia a una enfermedad, un trastorno o una afección, se refiere a: (i) inhibir una enfermedad, un trastorno o una afección, por ejemplo, detener su desarrollo; y/o (ii) aliviar una enfermedad, un trastorno o una afección, por ejemplo, provocando la regresión de los síntomas clínicos.

“Prevenir”, en referencia a una enfermedad, un trastorno o una afección, se refiere a prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección, por ejemplo, provocando que no se desarrollen los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección.

10 “Cáncer” se refiere a un crecimiento anómalo de células que tienden a proliferar de una manera incontrolada y, en algunos casos, a metastatizar (propagarse). Los tipos de cánceres específicos incluyen, sin limitación, los cánceres identificados en la publicación n° US 2006/0014949 y los siguientes:

- cardíacos: sarcoma (por ejemplo, angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma y similares), mixoma, rhabdomyoma, fibroma, lipoma y teratoma;

15 - de pulmón: carcinoma broncogénico (por ejemplo, de células escamosas, microcítico indiferenciado, macrocítico indiferenciado, adenocarcinoma y similares), carcinoma alveolar (por ejemplo, bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma;

20 - gastrointestinal: esófago (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, linfoma y similares), estómago (por ejemplo, carcinoma, linfoma, leiomyosarcoma y similares), páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma y similares), intestino delgado (por ejemplo, adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma y similares), intestino grueso (por ejemplo, adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma y similares);

25 - tracto genitourinario: riñón (por ejemplo, adenocarcinoma, nefroblastoma de tumor de Wilm, linfoma, leucemia, y similares), vejiga y uretra (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma y similares), próstata (por ejemplo, adenocarcinoma, sarcoma), testículo (por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma y similares);

30 - hígado: hepatoma (por ejemplo, carcinoma hepatocelular y similares), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma;

- hueso: sarcoma osteogénico (por ejemplo, osteosarcoma y similares), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (por ejemplo, sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, cordoma de tumor de células gigantes maligno, osteosarcoma (por ejemplo exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes;

35 - sistema nervioso: cráneo (por ejemplo, osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformante y similares), meninges (por ejemplo, meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis y similares), cerebro (por ejemplo, astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos y similares), médula espinal (por ejemplo, neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma y similares);

40 - ginecológico: útero (por ejemplo, carcinoma endometrial y similares), cérvix (por ejemplo, carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral y similares), ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma inclassificado], tumores de células tecales-granulosas, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno y similares), vulva (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma y similares), vagina (por ejemplo, carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides [rhabdomyosarcoma embrionario], de trompas de Falopio (carcinoma) y similares);

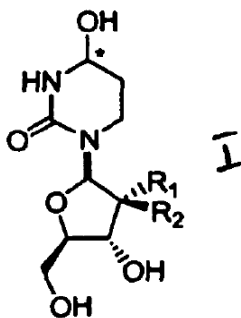
45 - hematológico: sangre (por ejemplo, leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico y similares), enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano;

50 - piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares de nevi displásico, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis y similares; y

- glándulas adrenales: neuroblastoma.

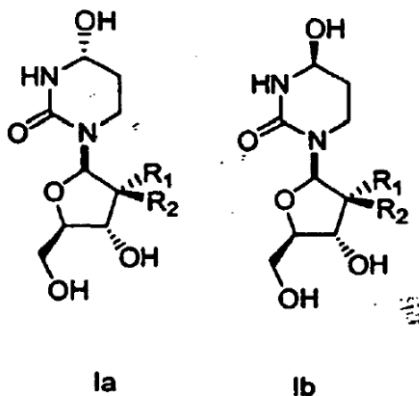
Compuestos

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:

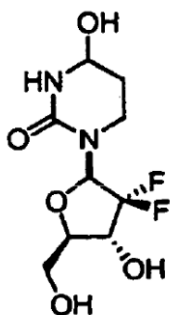


- 5 o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R_1 y R_2 son flúor. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica o un método de uso descritos pueden comprender un compuesto con una configuración (R), con una configuración (S), o una mezcla de configuraciones (R) y (S).

En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I tiene la estereoquímica de la o Ib:

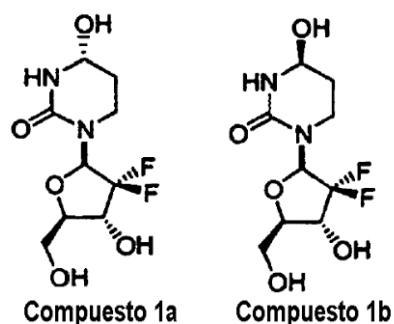


- 10 En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I es el compuesto 1 o su sal farmacéuticamente aceptable:



Compuesto 1

En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 1a, 1b, y sus sales farmacéuticamente aceptables.



Puesto que los compuestos de la invención pueden poseer al menos un centro quiral, pueden existir en forma de enantiómeros, diastereómeros, mezclas racémicas, mezclas no racémicas u otros estereoisómeros. La presente invención incluye todos estos posibles isómeros, así como los isómeros geométricos y los tautómeros.

- 5 Los estereoisómeros pueden prepararse o aislarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, los diastereoisómeros pueden separarse mediante métodos de separación físicos, tales como cristalización fraccionaria y técnicas cromatográficas, y los enantiómeros pueden separarse entre sí mediante la cristalización selectiva de las sales diastereoméricas con ácidos o bases ópticamente activos, o mediante cromatografía quiral. Los estereoisómeros puros también pueden prepararse de forma sintética a partir de materiales de partida estereoquímicamente puros adecuados, o utilizando reacciones estereoselectivas.

Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- (i) una cantidad eficaz de un compuesto de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa; y
- 15 (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica también comprende una cantidad eficaz de al menos otro agente terapéutico, tal como un fármaco sustrato de CDA o un agente quimioterapéutico.

- El fármaco sustrato de CDA puede ser cualquier fármaco que pueda ser desamidado por CDA. Los ejemplos no limitantes de un sustrato de CDA incluyen citosina y análogos de citosina, tales como decitabina, 5-azacitidina, gemcitabina, ara-C, troxacitabina, tezacitabina, 5'-fluoro-2'-desoxicitidina, citoclor, y los compuestos descritos en la publicación US nº 2006/0014949. En algunas realizaciones, el fármaco sustrato de CDA es decitabina. En otras realizaciones, el fármaco sustrato de CDA es 5-azacitidina. En otras realizaciones, el fármaco sustrato de CDA es gemcitabina. En otras realizaciones, el fármaco sustrato de CDA es ara-C.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación:

- 25 - agentes alquilantes (por ejemplo, doxorubicina, ciclofosfamida, estramustina, carmustina, mitomicina, bleomicin y similares);
- antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, nelarabina, fludarabina, metotrexato y similares);
- agentes platinizantes (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y similares);
- 30 - inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, topotecano, irinotecano, etopósido y similares);
- agentes de tubulina (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, vinblastina, vincristina, otros taxanos, epotilonas, y similares);
- inhibidores de la señalización (por ejemplo, inhibidores de quinasas, anticuerpos, inhibidores de farnesiltransferasa, y similares); y
- 35 - otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, tamoxifeno, agentes antimitóticos, tales como inhibidores de quinasas de tipo polo o inhibidores de aurora quinasas, y similares).

La "cantidad eficaz" del compuesto de la invención puede variar del 0,1% en peso a aproximadamente 100% en peso. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto es del 0,1% al 20% en p/p. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es del 1-10% en p/p. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es del 2-5% en p/p.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para la administración en una forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) la administración oral, por ejemplo, bebidas (por ejemplo, disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (por ejemplo, los dirigidos a la absorción bucal, sublingual y sistémica), comprimidos oblongos, píldoras grandes, polvos, gránulos, pastas para la aplicación a la lengua, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de gelatina blanda, pulverizados bucales, trociscos, pastillas para chupar, gránulos, jarabes, suspensiones, elixires, líquidos, emulsiones y microemulsiones; (2) la administración parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma, por ejemplo, de una disolución o una suspensión estéril; (3) la aplicación tópica, por ejemplo en forma de una crema, ungüento, parche, almohadilla o pulverizado aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo en forma de un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la liberación inmediata, sostenida o controlada.

10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración oral. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración oral en forma sólida.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse utilizando materiales y técnicas conocidos que pueden incluir, pero no se limitan a mezclar y/o combinar el compuesto de la invención con el excipiente farmacéuticamente aceptable y el agente o agentes terapéuticos opcionales.

Métodos

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para inhibir la citidina desaminasa, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la presente invención en un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite:

25 (i) una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa; y

(ii) un fármaco sustrato de CDA, que incluye pero no se limita a cada realización expresa descrita en la presente.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

30 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cánceres hematológicos y cánceres sólidos. En otras realizaciones, el cáncer hematológico se selecciona de MDS y leucemia. En otras realizaciones, el cáncer sólido se selecciona de cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de pulmón no microcítico, y cáncer de mama. En otras realizaciones, la leucemia es la leucemia mieloide aguda (AML) o la leucemia mieloide crónica (CML).

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para inhibir la degradación de un fármaco sustrato de CDA por la citidina desaminasa, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención según se describe en la presente, que incluye pero no se limita a cada realización expresa, a un sujeto que está sometido a un tratamiento con el fármaco sustrato de CDA. El fármaco sustrato de CDA incluye pero no se limita a cada realización expresa descrita en la presente.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

40 La administración del compuesto o de la composición de la invención puede realizarse a través de cualquier vía aceptada conocida por los expertos en la técnica. por ejemplo por vía oral, parenteral, mediante un pulverizado para inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, intraocular, intrapulmonar, o mediante un depósito implantado. La expresión "por vía parenteral" incluye, sin limitación, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, mediante inyección intraósea, y mediante técnicas de infusión.

45 Puede utilizarse cualquier régimen de administración conocido por los expertos en la técnica para regular el ritmo y la secuencia de la administración del fármaco, y puede repetirse si es necesario para realizar un tratamiento en los métodos de la invención. Por ejemplo, el compuesto o la composición de la invención pueden administrarse 1, 2, 3 o 4 veces diarias, en una única dosis, en múltiples dosis discretas o en una infusión continua.

50 El compuesto o la composición de la invención pueden administrarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de la administración del fármaco sustrato de CDA. El régimen de administración puede incluir un pretratamiento y/o coadministración con al menos otro agente terapéutico. En este caso, el compuesto o la composición de la invención, el fármaco sustrato de CDA y al menos otro agente terapéutico pueden administrarse de modo simultáneo, por separado o de modo secuencial.

Los ejemplos de regímenes de administración incluyen, sin limitación:

- la administración de cada compuesto, composición, fármaco sustrato de CDA y/o agente terapéutico de una manera secuencial; y

5 - la coadministración de cada compuesto, composición, fármaco sustrato de CDA y/o agente terapéutico de una manera sustancialmente simultánea (por ejemplo, en una forma de dosificación unitaria individual) o en múltiples formas de dosificación unitaria separadas para cada compuesto, composición, fármaco sustrato de CDA y/o agente terapéutico.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que la “cantidad eficaz” o “nivel de dosis” dependerá de diversos factores, tales como la vía de administración concreta, el régimen de administración, el compuesto y la composición seleccionados, y la enfermedad concreta y el paciente concreto que se está tratando. Por ejemplo, el nivel de dosis apropiado puede variar dependiendo de la actividad, la velocidad de excreción y la posible toxicidad del compuesto o de la composición específicos utilizados; la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del paciente que se está tratando; la frecuencia de la administración; el otro u otros agentes terapéuticos que se están coadministrando; y el tipo y la gravedad de la enfermedad.

15 La presente invención contempla unos niveles de dosis del orden de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10.000 mg/kg/d. En algunas realizaciones, el nivel de dosis es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mg/kg/d. En otras realizaciones, el nivel de dosis es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg/d. En otras realizaciones, el nivel de dosis es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg/d. En otras realizaciones, el nivel de dosis es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg/kg/d. Los niveles de dosis apropiados, la vía de administración, y el régimen de administración pueden ser determinados por los expertos en la
20 técnica utilizando técnicas conocidas.

Será evidente para los expertos en la técnica que las realizaciones específicas de la presente invención pueden dirigirse a uno, a alguno o a todos los aspectos indicados anteriormente, así como a otros aspectos, y pueden incluir una, alguna o todas las realizaciones indicadas anteriormente y a continuación, así como a otras realizaciones.

25 En otros puntos que no sean los ejemplos de trabajo, o cuando se indique de otra manera, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. utilizados en la descripción y en las reivindicaciones, están modificados por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, dichos números son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que quieren obtenerse mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe considerarse a la luz del número de dígitos significativos y de las técnicas de redondeo habituales.
30

Aunque los parámetros e intervalos numéricos que indican el alcance amplio de la invención son aproximaciones, los valores numéricos indicados en los ejemplos de trabajo se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene de forma inherente ciertos errores que surgen siempre de la desviación estándar que existe en sus respectivas mediciones de ensayo.

35 Ejemplos

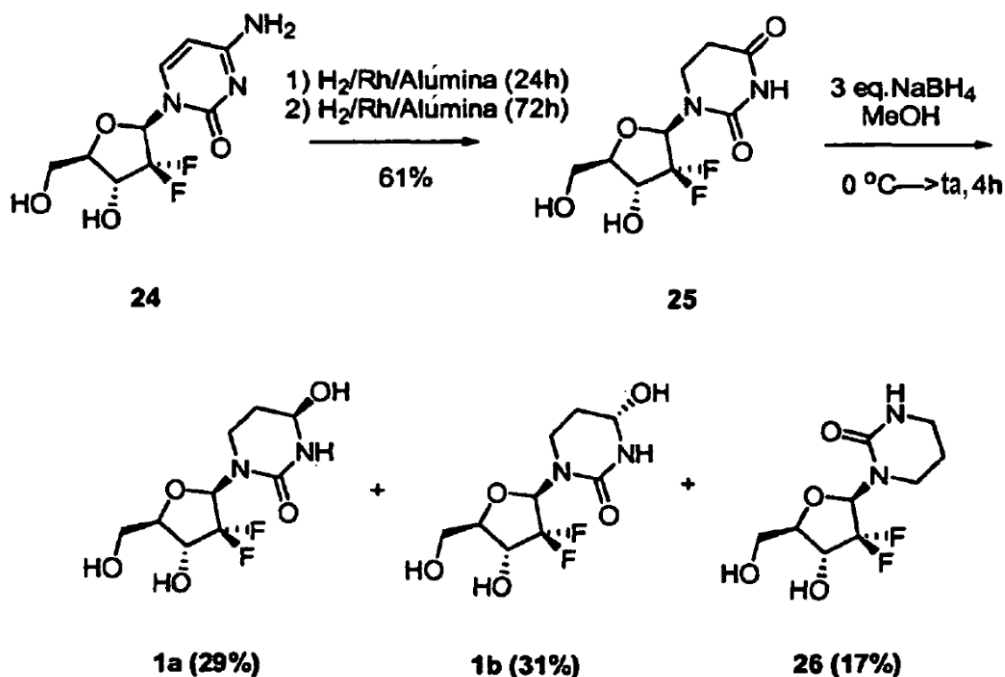
Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención y no pretenden ser limitaciones.

Síntesis de compuestos

40 El compuesto de la invención puede prepararse según se describe en la presente y/o mediante la aplicación o la adaptación de métodos conocidos. Los expertos en la técnica apreciarán que uno o más de los reactivos, etapas y/o condiciones descritos en los esquemas de reacción pueden requerir un ajuste para alojar otros sustituyentes en R₁ y R₂.

Ejemplo 1:

Esquema 1. Síntesis de derivados de difluorotetrahidrouridina (compuestos 1a y 1b)



5 **2',2'-difluorodihidrouridina (DFDHU, 25).** Se disuelve gemcitabina **24** (3,0 g, 11,4 mmol) en H₂O (50 ml). Se añade rodio sobre alúmina (900 mg) a la disolución y la mezcla se hidrogena durante la noche a 275,79 kPa. Al día siguiente la mezcla se filtra, el agua se retira al vacío y el sólido pegajoso resultante se disuelve de nuevo en H₂O. Se añade rodio sobre alúmina a la disolución (900 mg) y el material se hidrogena durante la noche a 275,79 kPa. El rodio se retira mediante filtración y el filtrado resultante se concentra para producir una mezcla bruta de difluorodihidrouridina (**5**, DFDHU) y aproximadamente 10% de difluorotetrahidrouridina **1a** y **1b** (DFTHU). La mezcla bruta se purifica en una HPLC en fase inversa (fase inversa C₁₈ a CH₃CN al 5%/H₂O) para producir 1,84 g (61%, 14,5 minutos) de DFDHU **25** y 175 mg (17%, **1a**, 9,5 minutos, y **1b**, 13,9 minutos) de los epímeros de DFTHU. La configuración absoluta de C-4 para el compuesto **1a** se determina mediante difracción de rayos X de un solo cristal, y es coherente con los precedentes bibliográficos sobre la estructura cristalina de la citidina desaminasa complejada con un único epímero de tetrahidrouridina. RMN de ¹H de **5**: 6,00 (dd, 1H), 4,20 (q, 1H), 3,92-3,72 (m, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 2,68 (t, 2H).

10 **2',2'-difluorotetrahidrouridina (DFTHU, 1a y 1b).** Se disuelve DFDHU **25** (1,2 g, 4,9 mmol) en 30 ml de MeOH y se enfría hasta 0 °C. Se añade borohidruro de sodio (540 mg, 14,6 mmol) de forma discontinua a la disolución, y la reacción se calienta lentamente hasta la temperatura ambiente. Después de 4 horas de agitación a temperatura ambiente (ta), el MeOH se retira al vacío y el residuo se disuelve en 15 ml de H₂O. La disolución se neutraliza con HCl 2,0 N hasta pH 7. La disolución entonces se purifica a través de una HPLC preparativa (fase inversa C₁₈ a CH₃CN al 5%/H₂O). Las sales salen a los 5,2 minutos. Un pico es aparente a los 7,5 minutos (12%). Un epímero de la DFTHU **1a** sale a los 9,5 minutos (350, 29%). El otro epímero **1b** sale a los 14,3 minutos (370 mg, 31%). El producto desoxigenado **26** eluye a los 17 minutos (200 mg, 17%).

25 **1a:** RMN de ¹H (D₂O, 9,5 minutos): 6,03 (dd, 1H), 5,04 (sa, 1H), 4,20 (q, 1H), 3,90-3,71 (m, 3H), 3,53 (dt, 1H), 3,30 (dt, 1H), 1,92-1,75 (m, 2H). Anal. calc. para C₉H₁₄N₂O₅F₂ (0,15 H₂O): C, 39,90; H, 5,32; N, 10,34. Encontrado: C, 39,87; H, 5,41; N, 10,26.

30 **1b:** RMN de ¹H (D₂O, 14,3 minutos): 5,97 (dd, 1H), 5,03 (ta, 1H), 4,16 (q, 1H), 3,91-3,68 (m, 3H), 3,41 (dt, 1H), 3,20 (dt, 1H), 1,95-1,80 (m, 2H). Anal. calc. para C₉H₁₄N₂O₅F₂ (0,60 H₂O): C, 38,74; H, 5,49; N, 10,04. Encontrado: C, 38,55; H, 5,36; N, 9,87.

26: RMN de ¹H (D₂O) δ5,99 (dd, J = 15 Hz, 6 Hz, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,75 (m, 2H), 3,42 (m, 1H), 3,21 (t, J = 6 Hz, 2H), 3,18 (m, 1H), 1,86 (m, 2H).

Ejemplo 2: Actividad enzimática de CDA

Puede demostrarse la capacidad de los compuestos de la invención para inhibir la actividad enzimática de CDA

utilizando el siguiente método de ensayo.

El procedimiento para determinar la actividad enzimática de CDA se basa en metodologías publicadas (por ejemplo, Cacciamani, T. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 1991, 290, 285-292; Cohen R. *et al.*, J. Biol. Chem., 1971, 246, 7566-7568; Vincenzetti S. *et al.*, Protein Expr. Purif., 1996, 8, 247-253). El ensayo sigue el cambio en la absorbancia a 286 nm de la desaminación catalizada por CDA de la citidina para formar uridina. La reacción se realiza en tampón fosfato de potasio (pH 7,4, 20 mM, que contiene DTT 1 mM) en un volumen total de 200 μ l en un formato de placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción final contiene citidina (50 μ M) y CDA humana recombinante purificada. La enzima purificada se diluye para producir un cambio en la absorbancia de aproximadamente 2 unidades de miliabsorbancia/minuto. Las mediciones en la línea de base del cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo se realizan antes de la adición de CDA para asegurarse de que no exista cambio en la absorbancia en ausencia de CDA. Después de la adición de CDA se controla el cambio en la absorbancia durante 20-30 minutos. Cuando están presentes inhibidores potenciales, se ensayan ocho concentraciones de cada en el intervalo de 0,1 nM-1 mM para obtener valores de CI_{50} . La pendiente del cambio de absorbancia a lo largo del tiempo para muestras que contienen citidina y CDA pero sin inhibidor (totales) se normaliza a 100%. La actividad enzimática de CDA que queda en presencia de un compuesto expresada como porcentaje de actividad total se resta del 100% para obtener el porcentaje de inhibición a concentraciones variables de compuesto.

Utilizando el ensayo descrito anteriormente se evalúa la potencia inhibidora de los compuestos **1**. Los valores de CI_{50} de los compuestos se indican en la tabla 1. "1a" y "1b" indican estereoisómeros individuales; "1" indica una mezcla epimérica.

Tabla 1. Potencia inhibidora de los compuestos de ensayo

Compuesto	CI_{50} (nM)
1a	400 \pm 60
1b	5000 \pm 1000
1	400 \pm 60

Potenciación de la eficacia de fármacos sustrato de CDA

Puede demostrarse la capacidad de los compuestos de la invención para potenciar la eficacia de fármacos sustratos de CDA en el modelo de linfoma de ratón L1210.

Ejemplo 3: El efecto del inhibidor de CDA, compuesto 1, sobre la supervivencia inducida por decitabina (0,1 mg/kg) en el modelo de supervivencia de L1210

Métodos

Treinta ratones hembra CD2F1 de 6-7 semanas se separaron aleatoriamente en 6 grupos:

Grupo nº	
1	L1210 i.v. y vehículo + vehículo p.o. x 2 durante 4 días
2	L1210 i.v. y vehículo + compuesto 1 10 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
3	L1210 i.v. y vehículo + decitabina 0,1 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
4	L1210 i.v. y compuesto 1 1 mg/kg + decitabina 0,1 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
5	L1210 i.v. y compuesto 1 10 mg/kg + decitabina 0,1 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
6	L1210 i.v. y vehículo + decitabina 0,1 mg/kg i.p. x 2 durante 4 días

Inyección intravenosa (i.v.) de L1210: Antes del experimento, se realizan al menos 3 pases de células L1210 en ratones hembra CD2F1. Los ratones reciben inyecciones intraperitoneales (i.p.) con líquido de ascitis de L1210 una semana antes del sacrificio con CO₂. Cada ratón se coloca sobre la espalda, la superficie de la barriga se limpia con toallitas de alcohol y se realiza una pequeña incisión en su cavidad peritoneal. Se inyectan en la cavidad peritoneal 2 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 2,1% enfriada en hielo, en disolución salina. El fluido se extrae de la cavidad, se traslada con una jeringa de 3 cc 18G a un tubo estéril limpio y se mantiene en hielo. El fluido se diluye 1:10 en BSA al 2,1% en disolución salina y se añade una gota de zap-o-globina a 2 ml del líquido de ascitis diluido.

El líquido de ascitis diluido (diluido de nuevo 1:10) se cuenta en un hematocitómetro y se calcula el número de células/ml. Una disolución madre de líquido de ascitis en disolución BSA se diluye hasta 1×10^4 células/0,1 ml. Los ratones se inyectan con 0,1 ml de la disolución de células con una aguja 27G.

5 **Preparación de la disolución de dosis:** Cuando resulte apropiado, los ratones se dosifican con un vehículo o con el compuesto 1 p.o. 30 minutos antes de la decitabina.

El compuesto 1 se prepara a 1 mg/ml en disolución salina con tampón fosfato (PBS) y después se diluye hasta 0,1 mg/ml en PBS para la dosis menor.

La decitabina se prepara como una disolución madre 1 mg/ml en PBS y se diluye de forma apropiada para lograr una disolución de dosificación de 0,01 y 0,02 mg/ml.

10 **Esquema de dosificación:** La decitabina se prepara fresca dos veces al día. Todas las disoluciones de dosis se conservan en hielo durante la dosificación. Los ratones se dosifican i.p. o por vía oral (p.o.) dos veces diarias (con un intervalo de 8 horas) durante 4 días consecutivos. El esquema de dosificación final y las dosis totales de decitabina y compuesto 1 se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Esquema de dosificación

Grupo nº	Fármaco	Dosis de decitabina (vía administrada)	Dosis acumulada de decitabina	Dosis del compuesto 1	Dosis acumulada del compuesto 1
1	Vehículo	Vehículo	0 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
2	Compuesto 1	Vehículo	0 mg/kg	10 mg/kg	80 mg/kg
3	Decitabina	0,1 mg/kg p.o.	0,8 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
4	Decitabina/compuesto 1	0,1 mg/kg p.o.	0,8 mg/kg	1 mg/kg	40 mg/kg
5	Decitabina/compuesto 1	0,1 mg/kg p.o.	0,8 mg/kg	10 mg/kg	80 mg/kg
6	Decitabina	0,1 mg/kg i.p.	0,8 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg

15 **Supervivencia y autopsia:** Los ratones se observan para la supervivencia y se pesan a diario (de lunes a viernes) durante la duración del estudio (30 días). Los ratones muertos se someten a una autopsia y se observa la presencia de tumores en los órganos. Las muertes por tumor se determinan mediante unos pesos del hígado mayores que 1,6 g y un pesos del bazo mayores que 150 mg según Covey *et al.*, Eur. J. Cancer Oncol., 1985.

20 Los ratones dosificados con decitabina o decitabina más compuesto 1 viven más tiempo que los ratones dosificados con control de vehículo o sólo compuesto 1 (figura 1 y tabla 3; $p < 0,05$). Se observa una tendencia a una respuesta a la dosis con el compuesto 1 en combinación con decitabina.

La decitabina (0,1 mg/kg) p.o. es menos eficaz que decitabina 0,1 mg/kg i.p., pero no es significativamente diferente (tabla 3; figura 1, $p = 0,052$).

25 La coadministración del compuesto 1 10 mg/kg con decitabina 0,1 mg/kg p.o. potencia significativamente la supervivencia comparado con decitabina 0,1 mg/kg p.o. sola ($p = 0,0031$) y decitabina 0,1 mg/kg i.p. ($p = 0,016$; tabla 3, figura 1). La coadministración del compuesto 1 1 mg/kg con decitabina 0,1 mg/kg p.o. potencia significativamente la supervivencia comparado con decitabina 0,1 mg/kg p.o. sola ($p = 0,0031$), pero no comparado con decitabina 0,1 mg/kg i.p. ($p = 0,13$; tabla 3, figura 1).

30 La tabla 3 lista la supervivencia media de cada grupo de tratamiento y el porcentaje de ATV (aumento en el tiempo de vida) comparado con el grupo con vehículo. Todos los grupos tratados viven significativamente más que los controles con vehículo y los grupos con inhibidor de CDA solo ($p < 0,05$).

35 La tabla 3 lista los pesos de los hígados y de los bazos de los ratones tras la autopsia. Todos los ratones, excepto un ratón con decitabina 0,1 mg/kg i.p., perecieron por una muerte relacionada con la "carga tumoral", según indican unos pesos del hígado mayores que 1 g y unos pesos del bazo mayores que 80 mg (Covey *et al.*, *supra*). Los pesos del hígado y del bazo de 3 ratones control fueron de $0,97 \pm 0,08$ g, y $0,08 \pm 0,02$ g. Se registran las observaciones generales acerca del aspecto global de las cavidades peritoneal y torácica.

Tabla 3. Efecto de la decitabina y del compuesto **1** sobre la supervivencia y los pesos del hígado y del bazo en el modelo de supervivencia IV L1210

Grupo nº	Células L1210	Supervivencia media (días) ± DE	*% ATV (aumento en el tiempo de vida)	Peso medio del hígado (g) ± DE	Peso medio del bazo (g) ± DE
1	1 x 10 ⁴	7,40 ± 0,55	n/a	1,81 ± 0,13	0,31 ± 0,05
2	1 x 10 ⁴	7,40 ± 0,55	0,00	1,99 ± 0,22	0,39 ± 0,07
3	1 x 10 ⁴	10,6 ± 0,56	43,24	2,05 ± 0,17	0,33 ± 0,06
4	1 x 10 ⁴	12,8 ± 0,45	72,97	2,03 ± 0,08	0,29 ± 0,03
5	1 x 10 ⁴	14,2 ± 0,45	91,89	2,02 ± 0,27	0,29 ± 0,07

5 * % ATV = $\frac{\text{supervivencia media del experimento (días)} - \text{supervivencia media del control (días)}}{\text{supervivencia media del control (días)}} \times 100$

La figura 1 es una gráfica que muestra el efecto del compuesto **1** sobre la supervivencia inducida por decitabina (DAC) en el modelo de linfoma de ratón L1210.

Ejemplo 4: El efecto del inhibidor de CDA, compuesto 1a, sobre la supervivencia inducida por decitabina (0,1 mg/kg) en el modelo de supervivencia L1210

10 El compuesto **1a** se evalúa en el modelo L1210 siguiendo el protocolo del ejemplo 3. Los ratones dosificados con decitabina ("DAC") y con DAC más el compuesto **1a** viven más tiempo que los que reciben control con vehículo y sólo inhibidor de CDA (figura 2; p<0,05). En combinación con DAC, el compuesto **1a** 10 mg/kg es más eficaz para extender la supervivencia que las dosis menores.

15 **Ejemplo 5: El efecto del inhibidor de CDA, compuesto 1, sobre la supervivencia inducida por citarabina (ara-C) en el modelo de supervivencia L1210**

Cincuenta ratones hembra CD2F1 de 6-7 semanas se separaron aleatoriamente en 10 grupos (N = 5 ratones/grupo):

Grupo nº	
1	L1210 i.v. y veh. + veh. (PBS) p.o. x 2 durante 4 días
2	L1210 i.v. y veh. + Ara-C 200 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
3	L1210 i.v. y veh. + Ara-C 100 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
4	L1210 i.v. y veh. + Ara-C 50 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
5	L1210 i.v. y veh. + Ara-C 25 mg/kg p.o. x 2 durante 4 días
6	L1210 i.v. y comp. 1 10 mg/kg + Ara-C 200 mg/kg x 2 durante 4 días
7	L1210 i.v. y comp. 1 10 mg/kg + Ara-C 100 mg/kg x 2 durante 4 días
8	L1210 i.v. y comp. 1 10 mg/kg + Ara-C 50 mg/kg x 2 durante 4 días
9	L1210 i.v. y comp. 1 10 mg/kg + Ara-C 25 mg/kg x 2 durante 4 días
10	L1210 i.v. y comp. 1 10 mg/kg + veh. p.o. x 2 durante 4 días

20 **Inyección IV de L1210:** Ratones hembra CD2F1 se inyectaron i.p. con líquido de ascitis de L1210 una semana antes del sacrificio (CO₂). Se realizan al menos 3 pases de células L1210 *in vivo* antes del experimento. El ratón se coloca sobre la espalda, la superficie de la barriga se limpia con toallitas de alcohol y se realiza una pequeña incisión en su cavidad peritoneal. Se inyectan en la cavidad 2 ml de BSA al 2,1% enfiada en hielo, en disolución salina, y después se extrae el fluido, se traslada con una jeringa de 3 cc 18G a un tubo estéril limpio y se mantiene en hielo. El fluido se diluye 1:10 en BSA al 2,1% en disolución salina y se añade una gota de zap-o-globina a 2 ml del líquido de ascitis diluido. El líquido de ascitis diluido (diluido de nuevo 1:10) se cuenta en un hematocitómetro y se calcula el

número de células/ml. Una disolución madre de líquido de ascitis en disolución BSA se diluye hasta 1×10^4 células/0,1 ml. Los ratones se inyectan con 0,1 ml de la disolución de células con una aguja 27G. Todas las inyecciones i.v. se realizan en aproximadamente 50 minutos.

5 **Preparación de la disolución de dosis:** Cuando resulte apropiado, los ratones se dosifican con un vehículo o con el compuesto **1** p.o. 30 minutos antes de Ara-C. El compuesto **1** se prepara a 1 mg/ml en PBS y Ara-C se prepara a disolución madre 20 mg/ml en PBS y después se diluyen de forma apropiada para las dosis menores.

10 **Esquema de dosificación:** El compuesto **1** se prepara al comienzo del estudio y se conserva a 4 °C. Ara-C se prepara fresco dos veces al día. Todas las disoluciones se conservan en hielo durante la dosificación. Los ratones se dosifican por vía oral dos veces diarias (con un intervalo de 8 horas) durante 4 días consecutivos. El esquema de dosificación final y las dosis totales de Ara-C y compuesto **1** se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Esquema de dosificación

Grupo nº	Fármaco	Dosis de Ara-C (vía administrada)	Dosis acumulada de Ara-C	Dosis del compuesto 1	Dosis acumulada del compuesto 1
1	Vehículo	Vehículo	0 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
2	Compuesto 1	Vehículo	0 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg
3	Ara-C	200 mg/kg p.o	800 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
4	Ara-C	100 mg/kg p.o	400 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
5	Ara-C	50 mg/kg p.o	200 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
6	Ara-C	25 mg/kg p.o.	100 mg/kg	Vehículo	0 mg/kg
7	Ara-C	200 mg/kg p.o	800 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg
8	Ara-C	100 mg/kg p.o	400 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg
9	Ara-C	50 mg/kg p.o	200 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg
10	Ara-C	25 mg/kg p.o.	100 mg/kg	10 mg/kg	40 mg/kg

15 **Supervivencia y autopsia:** Los ratones se observan para la supervivencia y se pesan a diario (de lunes a viernes) durante la duración del estudio (45 días). Los ratones muertos se someten a una autopsia y se observa la presencia de tumores en los órganos. Las muertes por tumor se determinan mediante unos pesos del hígado mayores que 1,6 g y un pesos del bazo mayores que 150 mg según Covey *et al.*, *supra*.

Los ratones dosificados sólo con Ara-C (50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg) y con Ara-C más compuesto **1** viven tiempo que los ratones dosificados con control de vehículo y inhibidor de CDA solo (figuras 4-7, $p < 0,05$). El compuesto **1** solo no tiene efecto sobre la supervivencia comparado con los controles de vehículo (figura 4).

20 Ara-C 25 mg/kg solo no tiene efecto en la extensión de la supervivencia comparado con ratones tratados con vehículo y compuesto **1** 10 mg/kg. Ara-C 50, 100 y 200 mg/kg aumenta significativamente la supervivencia (días) de una manera dependiente de la dosis, comparado con los ratones en el grupo control. La coadministración de compuesto **1** 10 mg/kg con Ara-C p.o. aumenta significativamente la supervivencia, comparado con el tiempo de supervivencia de ratones tratados con la misma dosis de Ara-C solo (figuras 4-7).

25 **Ejemplo 6: Efecto del compuesto 1 sobre la reducción del volumen tumoral inducida por gemcitabina en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano A2780 en ratón**

30 Se ensaya la eficacia oral de la gemcitabina en combinación con el compuesto **1** en el xenoinjerto de cáncer de ovario humano A2780. Ratones hembra NCr nu/nu de 5-6 semanas se implantan por vía subcutánea con fragmentos tumorales de 30 a 60 mg. En el día 11, cuando los tumores tienen aproximadamente 200 mm³, el tratamiento comienza como se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de dosificación

Grupos	Tratamiento	Programa de gemcitabina	Programa del compuesto 1
1	Vehículo (disolución salina)	p.o.: q3dx4	
2	Compuesto 1		p.o. 10 mg/kg; q3dx4
3	Gemcitabina	p.o. 10 mg/kg; q3dx4	
4	Gemcitabina/Compuesto 1*	p.o. 10 mg/kg; q3dx4	p.o. 10 mg/kg; q3dx4
5	Gemcitabina	p.o. 30 mg/kg; q3dx4	
6	Gemcitabina/Compuesto 1*	p.o. 30 mg/kg; q3dx4	p.o. 10 mg/kg; q3dx4

* El compuesto 1 se dosifica aproximadamente 30 min antes de la gemcitabina.

5 El volumen tumoral se sigue a lo largo del experimento. El volumen tumoral se mide tres veces a la semana. La carga tumoral ($\text{mg} = \text{mm}^3$) se calcula a partir de mediciones con calibrador mediante la fórmula para el volumen de un elipsoide prolato $(L \times A^2)/2$, siendo L y A las respectivas mediciones de longitud ortogonal y anchura (mm).

10 Los principales criterios de valoración utilizados para evaluar la eficacia en el modelo de A2780 son las regresiones tumorales completa y parcial, el retraso en el crecimiento tumoral, y el número de supervivientes exentos de tumores al final del estudio. Una respuesta completa (RC) se define como una disminución en el tamaño del tumor hasta un tamaño indetectable ($<50 \text{ mm}^3$). Una respuesta parcial (RP) se define como una disminución $>50\%$ en la masa tumoral desde un tamaño tumoral de partida. Un tumor que alcanza una RC o RP durante el estudio pero que comienza a crecer de nuevo sigue considerándose como una RC o RP. La supervivencia exenta de tumores (SET) al final del estudio se define como sin tumores detectables ($<50 \text{ mm}^3$) al final del estudio (día 74). El retraso en el crecimiento tumoral (RCT) se define en este experimento como la mediana del número de días hasta alcanzar 750 mm^3 para el grupo de tratamiento comparado con el grupo control.

15 La administración oral de gemcitabina 10 mg/kg p.o. q3dx4 no es muy eficaz en este modelo, con un retraso en el crecimiento tumoral de 6,1 días (no es estadísticamente significativo), sin RC, RP ni supervivientes exentos de tumores al final del experimento en el día 74. Cuando se dosifica gemcitabina 10 mg/kg en combinación con el compuesto 1 se observa un retraso significativo en el crecimiento tumoral comparado con este misma dosis de gemcitabina sola (19,2 días; $p < 0,05$ comparado con gemcitabina sola), con 75% de tumores que muestran RC, pero sin SET al final del experimento. En la figura 8 (volumen tumoral frente a tiempo (días) después del inicio del tratamiento), resulta evidente que el compuesto 1 por sí solo no tiene efecto sobre el crecimiento tumoral, mientras que el tratamiento de combinación con el compuesto 1 y gemcitabina es más eficaz que la gemcitabina por sí sola.

20 La administración oral de gemcitabina 30 mg/kg p.o. q3dx4 es eficaz para producir un retraso en el crecimiento tumoral estadísticamente significativo de 22 días con 63% de RC pero sin SET. La quimioterapia de combinación con gemcitabina (30 mg/kg p.o.) más compuesto 1 produce un retraso en el crecimiento tumoral estadísticamente significativo de >57 días, y 100% de RC y una incidencia del 50% de SET en el día 74 de fin del experimento.

Tabla 6. Efecto del tratamiento de combinación de gemcitabina y compuesto 1 sobre el retraso en el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de ovario A2780

Tratamiento	RCT	Valor p
Control sin tratar	NA	
Compuesto 1 10 mg/kg	0,4 días	
Gemcitabina 10 mg/kg	6,1 días	
Gemcitabina 10 mg/kg + compuesto 1	19,2 días	$<0,05$ comparado con sólo gemcitabina 10 mg/kg
Gemcitabina 30 mg/kg	22 días	$<0,05$ comparado con el control sin tratar
Gemcitabina 30 mg/kg + compuesto 1	>57 días	$<0,05$ comparado con sólo gemcitabina 30 mg/kg

Ejemplo 7: Caracterización en estado sólido del compuesto 1a**Recogida de datos**

5 Un prisma de cristal incoloro del compuesto **1a** ($F_2O_5N_2C_9H_{14}$) que tiene una dimensionas aproximadas de 0,48 x 0,43 x 0,32 mm se monta en un asa. Todas las mediciones se realizan en un detector de áreas de formación de imágenes de placas Rigaku RAXIS SPIDER con radiación Cu-K α monocromática de grafito.

La indexación se realiza a partir de 5 oscilaciones que se exponen durante 60 segundos. La distancia del cristal al detector es de 127,40 mm.

Las constantes celulares y una matriz de orientación para la recogida de datos se corresponden con una célula trigonal primitiva (grupo de Laue: -3m) con dimensiones:

10 $a = 9,78961(18) \text{ \AA}$

$c = 20,4588(7) \text{ \AA}$

$V = 1698,02(7) \text{ \AA}^3$

15 Para $Z = 6$ y F.W. = 268,22, la densidad calculada es de 1,574 g/cm³. Basándose en las ausencias sistemáticas de: 0,001: $1 \pm 3n$ y la disolución satisfactoria y el refinamiento de la estructura, se determina que el grupo espaciador es: P3₁21 (n° 152).

20 Los datos se recogen a una temperatura de -123 ± 1 °C hasta un valor 2θ máximo de 136,4°. Se recogió un total de 111 imágenes de oscilación. Se realiza un barrido de datos utilizando barridos ω de 20,0 a 200,0° en etapas de 5,0° a $\chi = 0,0^\circ$ y $\phi = 180,0^\circ$. Se realiza un segundo barrido de 20,0 a 200,0° en etapas de 5,0° a $\chi = 54,0^\circ$ y $\phi = 180,0^\circ$. Se realiza un tercer barrido de 20,0 a 185,0° en etapas 5,0° a $\chi = 54,0^\circ$ y $\phi = 90,0^\circ$, y se realiza un barrido final utilizando barridos ω de 20,0 a 50,0° en etapas de 5,0° a $\chi = 0,0^\circ$ y $\phi = 0,0^\circ$. La tasa de exposición es de 12,0 [seg./°]. La distancia del cristal al detector es de 127,40 mm. La lectura de salida se realiza en el modo de píxeles de 0,100 mm.

Reducción de los datos

25 De las 11772 reflexiones que se recogen, 2025 son exclusivas ($R_{int} = 0,038$); las reflexiones equivalentes se fusionan.

30 El coeficiente de absorción lineal, μ , para la radiación Cu-K α es de 13,035 cm⁻¹. Se aplica una corrección de la absorción empírica que resulta en factores de transmisión que varían de 0,540 a 0,659. Los datos se corrigen para los efectos de Lorenz y de polarización. Se aplica una corrección para la extinción secundaria (Larson, A.C., Crystallographic Computing, 1970, 291-294, ecuación 22, sustituyéndose V por el volumen celular) (coeficiente = 0,005900).

Disolución de la estructura y refinamiento

35 La estructura se disuelve mediante métodos directos (SIR92: Larson, A.C., J. Appl. Cryst., 1994, 27, 435) y se expande utilizando técnicas de Fourier (DIRDIF99: Beurskens, P.T. *et al.*, The DIRD-99 Program System. Technical Report of the Crystallography Laboratory, 1999, Universidad of Nijmegen, Países Bajos). Los átomos que no son hidrógeno se refinan anisotrópicamente. Algunos átomos de hidrógeno se refinan isotrópicamente y el resto se refina utilizando el modelo de cabalgata. El ciclo final del refinamiento de mínimos cuadrados de matriz completa (mínimos cuadrados ponderados = $\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$) en F^2 se basa 2052 reflexiones observadas y 181 parámetros variables y convergencias (el mayor desplazamiento de parámetro es <0,01 veces su des) con unos factores de concordancia no ponderados y ponderados de:

40
$$R1 = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|} = 0,0303$$

$$wR1 = [\sum (w(F_o^2 - F_c^2)^2) / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2} = 0,0733$$

45 La desviación estándar de una observación de peso unitario (desviación estándar = $[\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (N_o - N_v)]^{1/2}$, N_o = número de observaciones, N_v = número de variables) es de 1,10. Se emplean pesos unitarios. Los picos máximos y mínimos sobre el mapa de Fourier de diferencia final se corresponden con 0,22 y -0,22 e⁻³/Å³, respectivamente. La estructura absoluta se deduce basándose en el parámetro de Flack, 0,0(1), refinado utilizando 839 pares de Friedel (Flack, H. D., Acta Cryst., 1983, A39, 876-881).

50 Los factores de dispersión de átomos neutros se toman de Cromer, D.T. *et al.*, International Tables for X-ray Crystallography, 1974, IV, tabla 2.2 A. Los efectos de dispersión anómalos se incluyen en F_{calc} (Ibers, J.A. *et al.*, Acta Crystallogr., 1964, 17, 781); los valores de $\Delta f'$ y $\Delta f''$ son los de Creagh, D.C. *et al.*, International Tables for Crystallography, 1992, C, tabla 4.2.6.8, 219-222. Los valores para los coeficientes de atenuación de masas son los

de Creagh, D.C. *et al.*, International Tables for Crystallography, 1992, C, tabla 4.2.4.3, 200-206. Todos los cálculos se realizan utilizando el paquete informático cristalográfico CrystalStructure 3.8 excepto para el refinamiento, que se realiza utilizando SHELXL-97.

Detalles experimentales

- 5 A. Datos cristalinos
 Fórmula empírica: $F_2O_5N_2C_9H_{14}$
 Peso de la fórmula: 268,22
 Color del cristal, hábito: incoloro, prisma
 Dimensiones del cristal: 0,48 x 0,43 x 0,32 mm
- 10 Sistema cristalino: trigonal
 Tipo de red cristalina: primitiva
 Imágenes de indexación: 5 oscilaciones a 60,0 segundos
 Posición del detector: 127,40 mm
 Tamaño del píxel: 0,100 mm
- 15 Parámetros de la red cristalina:
 $a = 9,78961(18) \text{ \AA}$
 $c = 20,4588(7) \text{ \AA}$
 $V = 1698,02(7) \text{ \AA}^3$
 Grupo espaciador: $P3_121$ (n° 152)
- 20 Valor Z: 6
 $D_{\text{calc.}}: 1,574 \text{ g/cm}^3$
 $F_{000}: 840,00$
 $\mu(\text{CuK}\alpha): 13,035 \text{ cm}^{-1}$
- B. Mediciones de intensidad
- 25 Difractómetro: Rigaku RAXIS-SPIDER
 Radiación: $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$) monocroma de grafito
 Apertura del detector: 460 mm x 256 mm
 Imágenes de datos: 111 exposiciones
 Intervalo de oscilación ω ($\chi = 0,0$, $\phi = 180,0$): 20,0-200,0°
- 30 Intervalo de oscilación ω ($\chi = 54,0$, $\phi = 180,0$): 20,0-200,0°
 Intervalo de oscilación ω ($\chi = 54,0$, $\phi = 90,0$): 20,0-185,0°
 Intervalo de oscilación ω ($\chi = 0,0$, $\phi = 0,0$): 20,0-50,0°
 Tasa de exposición: 12,0 seg./°
 Posición del detector: 127,40 mm
- 35 Tamaño del píxel: 0,100 mm
 $2\theta_{\text{max}}: 136,4^\circ$
 n° de reflexiones medidas:

Total: 11772

Exclusivas: 2052 ($R_{\text{int}} = 0,038$)

Pares de Friedel: 839

Correcciones:

- 5 Polarización de Lorentz
Absorción (factores de trans.: 0,540-0,659)
Extinción secundaria (coeficiente: 5,90000e-003)

C. Disolución de la estructura y refinamiento

Disolución de la estructura: métodos directos (SIR92)

- 10 Refinamiento: mínimos cuadrados de matriz completa en F^2

Función minimizada: $\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$

Mínimos cuadrados ponderados:

$$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0317 \cdot P)^2 + 0,6904 \cdot P], \text{ en el que } P = (\max(F_o^2, 0) + 2F_c^2)/3$$

Límite de exclusión de $2\theta_{\text{max}}$: 136,40

- 15 Dispersión anómala: todos los átomos que no son hidrógeno

nº de observaciones (todas las reflexiones): 2052

nº de variables: 181

Proporción reflexión/parámetro: 11,34

Residuales: R1 ($|I| > 2,00\sigma(I)$): 0,0303

- 20 Residuales: R (todas las reflexiones): 0,0329

Residuales: wR2 (todas las reflexiones): 0,0733

Bondad del indicador de ajuste: 1,099

Parámetro de Flack (pares de Friedel = 839): 0,0(1)

Desplazamiento max./error en el ciclo final: <0,001

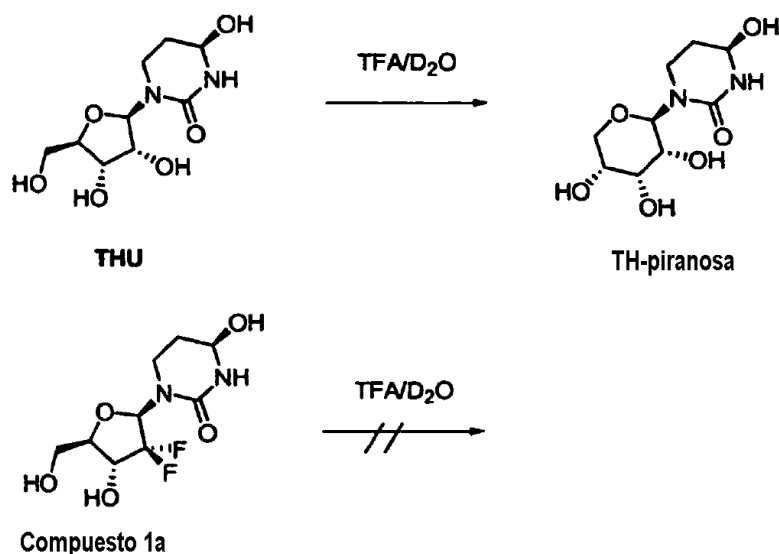
- 25 Pico máximo en el mapa de dif. final: 0,22 e⁻/Å³

Pico mínimo en el mapa de dif. final: -0,22 e⁻/Å³

En la figura 9 se muestra un diagrama ORTEP (Michael N. Burnett y Carroll K. Johnson, ORTEP-III: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations, Oak Ridge National Laboratory Report ORNL-6895, 1996) de la estructura determinada del compuesto **1a**.

- 30 **Ejemplo 8: Potenciación de la estabilidad frente a ácidos del compuesto 1a comparado con la THU**

Se evaluó la estabilidad del compuesto **1** y de la tetrahidrouridina (THU) en una disolución ácida mediante espectroscopía de RMN de ¹H.



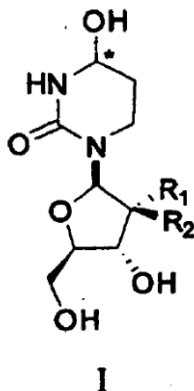
Se disuelve tetrahidrouridina (THU, 5 mg) en D₂O (0,75 ml). El espectro de RMN de ¹H (D₂O, 300 MHz, 27 °C) se muestra en la figura 10. A esta muestra se le añade una gota de TFA deuterado, seguido de un espectro inmediato de RMN de ¹H (figura 10). Incluso en el momento temprano, el pico a 5,4 ppm (aproximadamente 10% de conversión mediante integración) es indicativo de la expansión del anillo a la TH-piranos. A lo largo de las siguientes horas se registran espectros (D₂O, 300 MHz, 27 °C) tal como se muestra en la figura 11. Después de 4 horas, la TH-piranos está más extendida, indicando una conversión de aproximadamente 60%. A las 72 horas, la conversión es casi totalmente completa (>80%). Unos cambios notables en la región de 4,0-4,5 también son indicativos de la descomposición de THU y la formación de TH-piranos.

El compuesto **1a** (5 mg) se disuelve en D₂O (0,75 ml). El espectro de RMN de ¹H (D₂O, 300 MHz, 27 °C) se muestra en la figura 12. A esta misma muestra se le añade una gota de TFA deuterado, seguido de un espectro inmediato de RMN de ¹H (figura 12). Después del primer momento del tiempo, el único cambio notable es la epimerización del aminal, que se advierte por los picos adicionales a 5,92 y 5,93. Después de 4 horas y 72 horas (figura 13) no se producen más cambios notables en los espectros (D₂O, 300 MHz, 27 °C). Estos resultados indican que no se produce formación de piranos con el compuesto **1a** bajo estas condiciones.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a sus realizaciones específicas, los expertos en la técnica deben entender que pueden realizarse diversos cambios y que los equivalentes pueden sustituirse sin apartarse del alcance de la invención. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de un proceso concretos al alcance de la presente invención. Se pretende que todas estas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

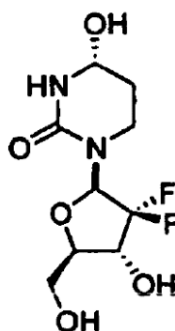
REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:



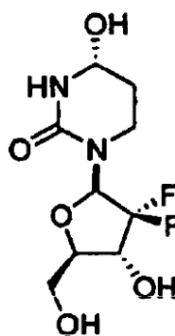
5 en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor.

2.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a, o su sal farmacéuticamente aceptable:



Compuesto 1a.

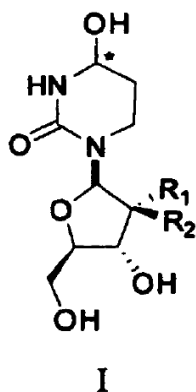
3.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a:



Compuesto 1a.

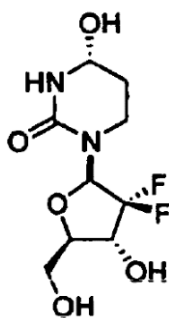
10

4.- Una composición farmacéutica para inhibir la actividad de la enzima CDA, que consiste fundamentalmente en un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:



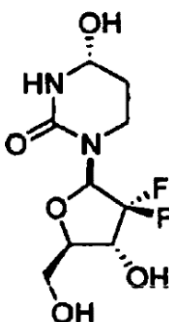
en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5.- El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a, o su sal farmacéuticamente aceptable:



Compuesto 1a.

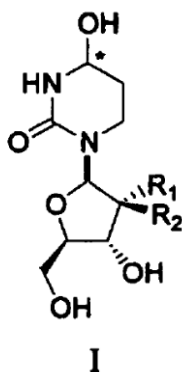
- 6.- El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a:



Compuesto 1a.

- 7.- Una composición que comprende:

- 10 (i) un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:

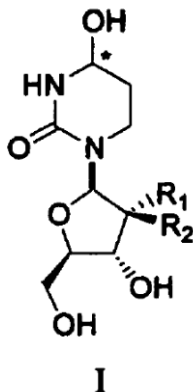


en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor;
y

5 (ii) un fármaco sustrato de CDA seleccionado del grupo que consiste en 5-azacitidina, gemcitabina, ara-C, tezacitabina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, y citoclor.

8.- Una composición que comprende:

(i) un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:



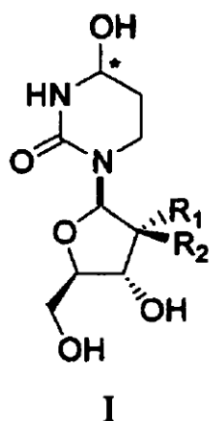
10 en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor;
y

(ii) un fármaco sustrato de CDA;

en la que el fármaco sustrato de CDA no es decitabina.

9.- Una composición que comprende:

(i) un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:



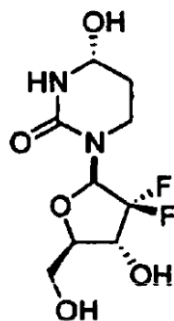
en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor; y

(ii) un fármaco sustrato de CDA;

5 en la que el fármaco sustrato de CDA es decitabina.

10.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que el fármaco sustrato de CDA es gemcitabina, ara-C o 5-azacitidina.

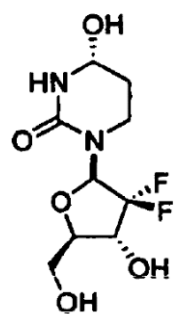
11.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que el compuesto está representado por el compuesto 1a, o su sal farmacéuticamente aceptable:



Compuesto 1a.

10

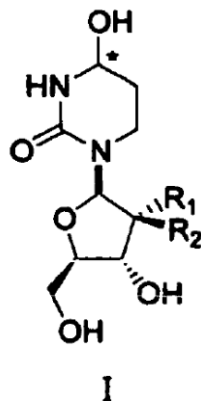
12.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que el compuesto está representado por el compuesto 1a:



Compuesto 1a.

13.- Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

14.- Un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:

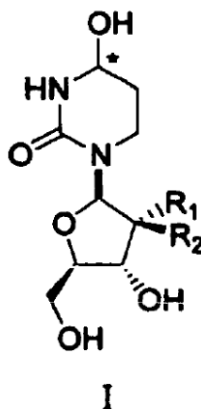


5 en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor, para su uso en un método para tratar el cáncer, que comprende:

(i) administrar a un mamífero que lo necesite un compuesto de fórmula I, y

(ii) administrar a un mamífero que lo necesite un fármaco sustrato de CDA seleccionado del grupo que consiste en 5-azacitidina, gemcitabina, ara-C, tezacitabina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, y citoclor.

10 15.- Un compuesto de fórmula I o su sal farmacéuticamente aceptable:



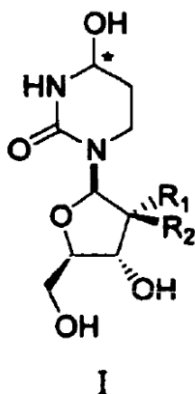
en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R₁ y R₂ son flúor, para su uso en un método para tratar el cáncer, que comprende:

(i) administrar a un mamífero que lo necesite un compuesto de fórmula I, y

15 (ii) administrar a un mamífero que lo necesite un fármaco sustrato de CDA;

en el que el fármaco sustrato de CDA no es decitabina.

16.- Un compuesto de fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable:



en la que el carbono marcado con un asterisco puede tener una configuración (R) o (S), y en la que R_1 y R_2 son flúor, para su uso en un método para tratar el cáncer, que comprende:

- (i) administrar a un mamífero que lo necesite un compuesto de fórmula I, y
- 5 (ii) administrar a un mamífero que lo necesite un fármaco sustrato de CDA;

en el que el fármaco sustrato de CDA es decitabina.

17.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que el fármaco sustrato de CDA es gemcitabina, ara-C o 5-azacitidina.

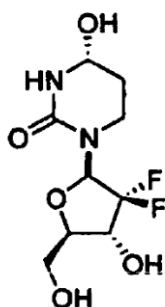
- 10 18.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres hematológicos y cánceres sólidos.

19.- El compuesto de la reivindicación 18 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el cáncer es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste en síndrome mielodisplásico y leucemia.

20.- El compuesto de la reivindicación 19 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el cáncer hematológico es leucemia mieloide aguda o leucemia mieloide crónica.

- 15 21.- El compuesto de la reivindicación 18 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el cáncer es un cáncer sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama metastásico, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma, cáncer ginecológico, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, carcinoma cervical, cáncer del tracto genitourinario, y
- 20 cáncer gastrointestinal.

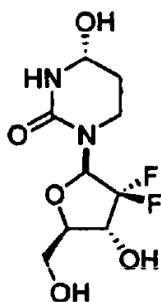
22.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-21 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a, o su sal farmacéuticamente aceptable:



Compuesto 1a.

23.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-21 para su uso en un método para tratar el cáncer,

en el que el compuesto está representado por el compuesto 1a:



Compuesto 1a.

- 5 24.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-23 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el compuesto se administra sustancialmente al mismo tiempo que el fármaco sustrato de CDA, antes del fármaco sustrato de CDA, o después del fármaco sustrato de CDA.
- 25.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-24 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el compuesto y el fármaco sustrato de CDA se administran en una forma de dosificación unitaria individual.
- 10 26.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 14-24 para su uso en un método para tratar el cáncer, en el que el compuesto y el fármaco sustrato de CDA se administran en múltiples formas de dosificación unitaria distintas.
- 27.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 o 13, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, para su uso como medicamento.

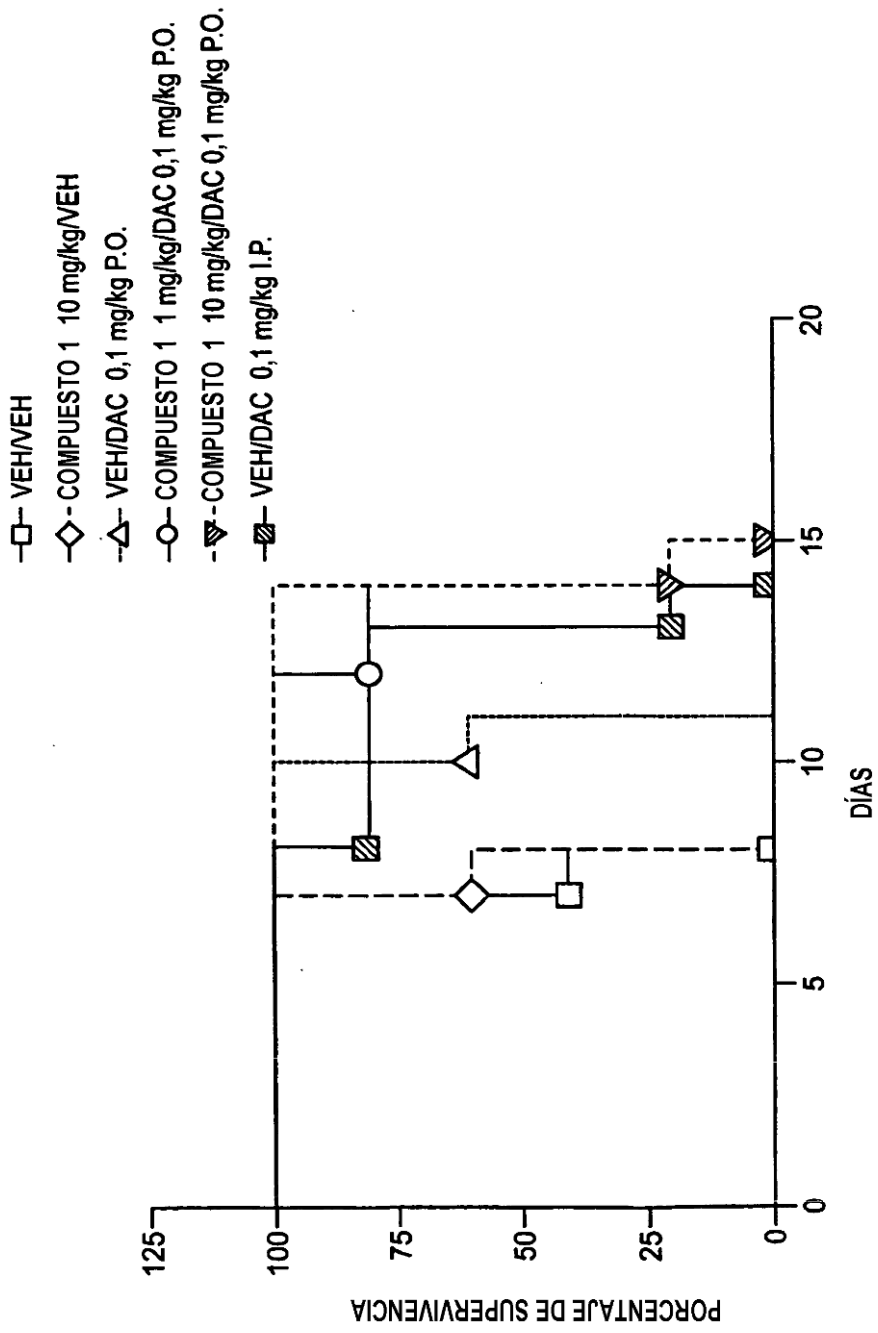


FIG. 1

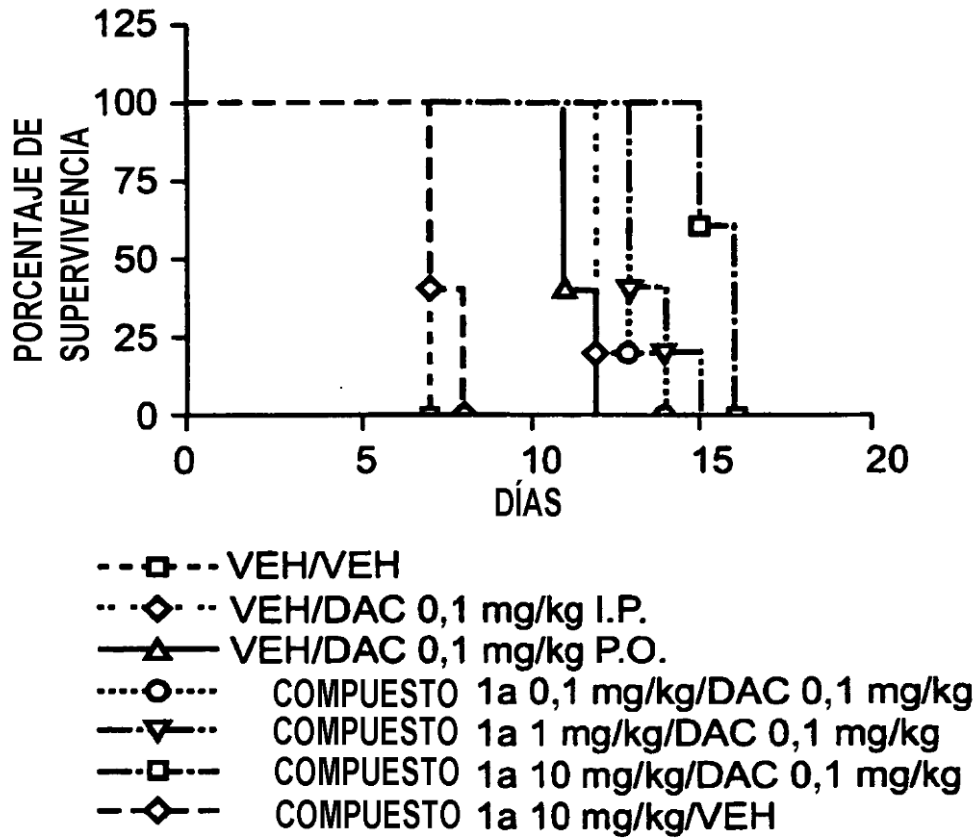


FIG. 2

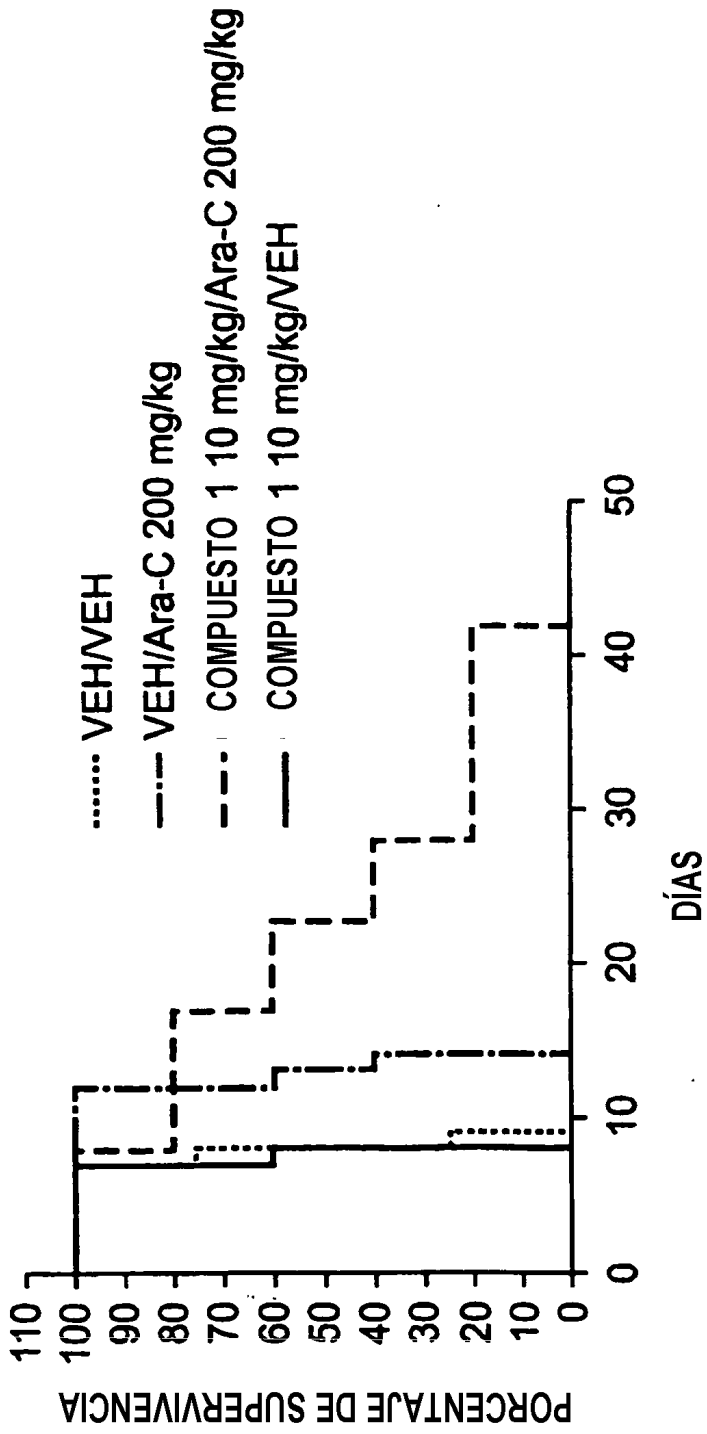


FIG. 3

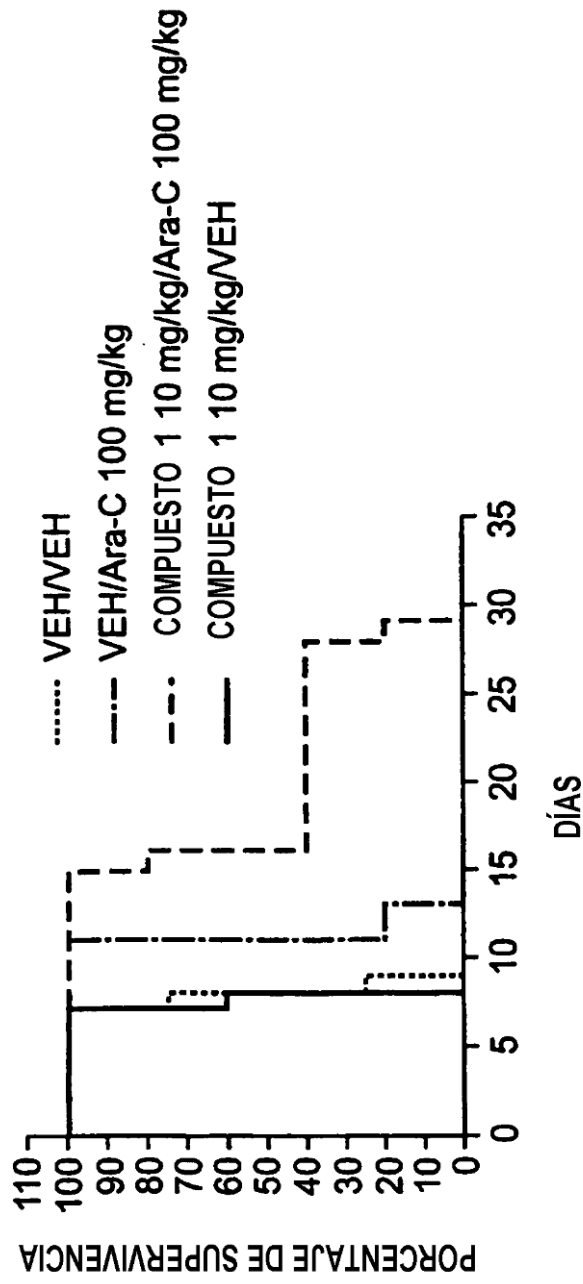


FIG. 4

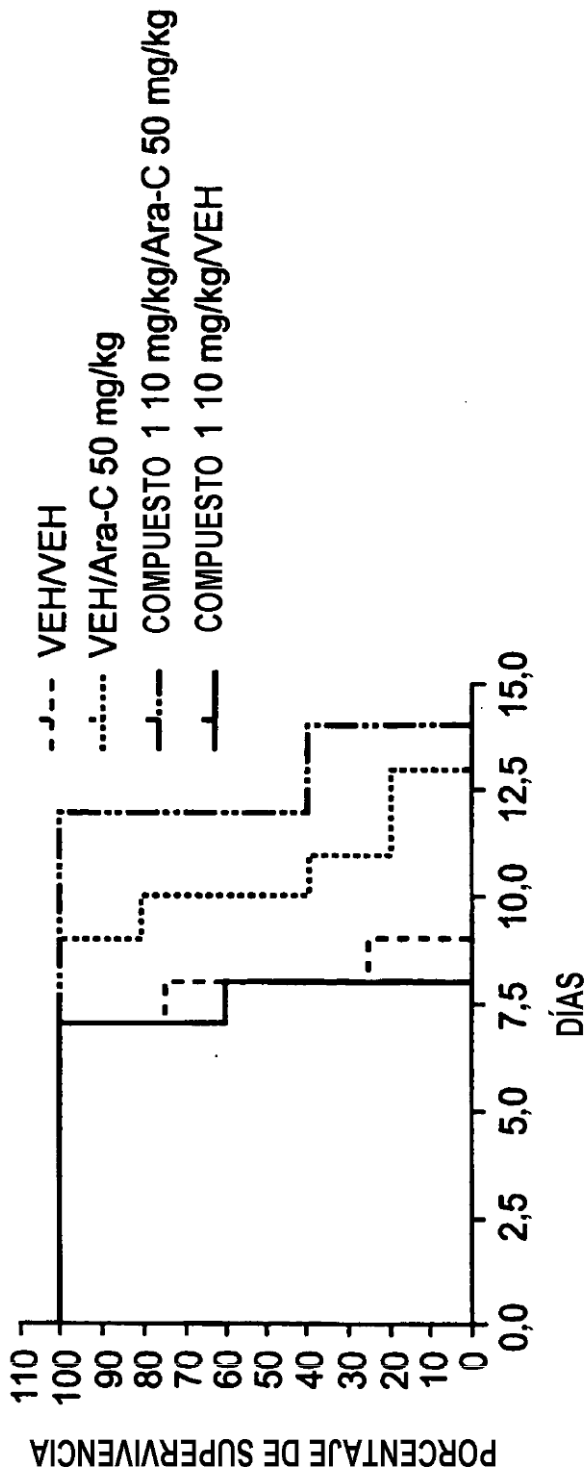


FIG. 5

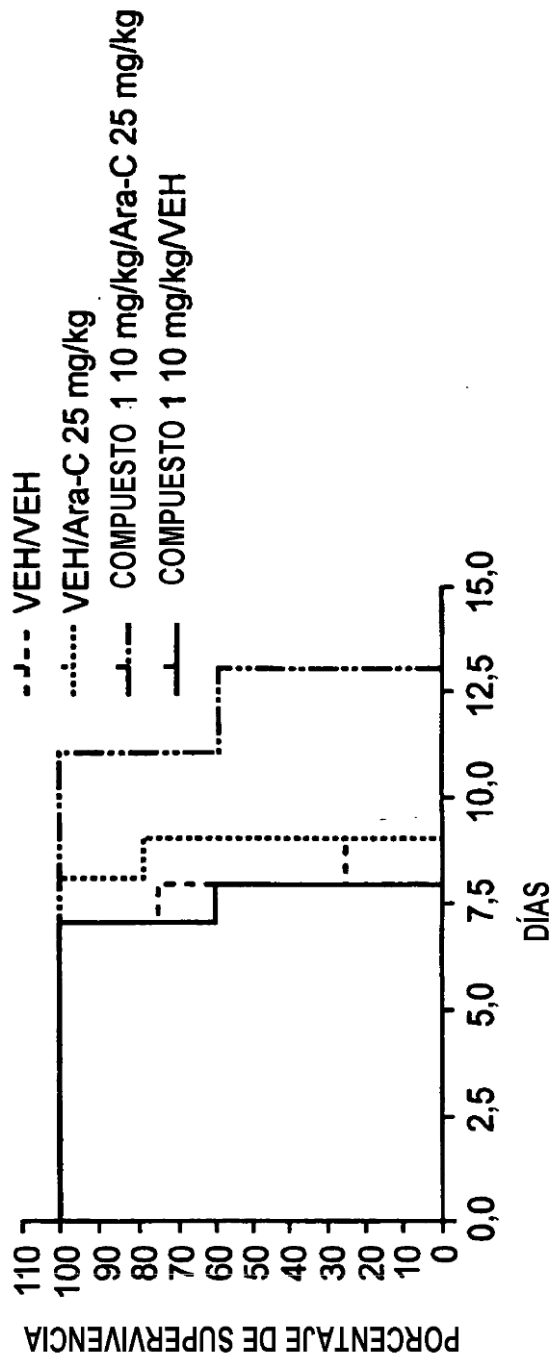


FIG. 6

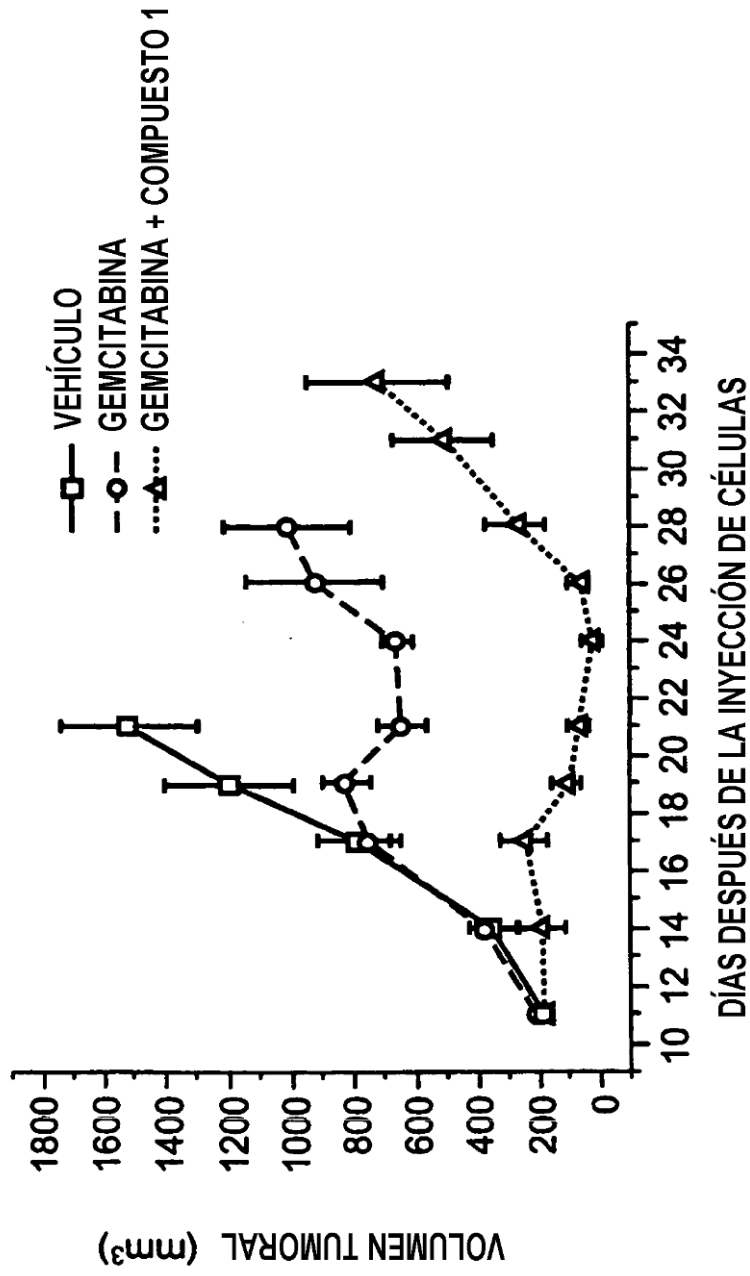


FIG. 7

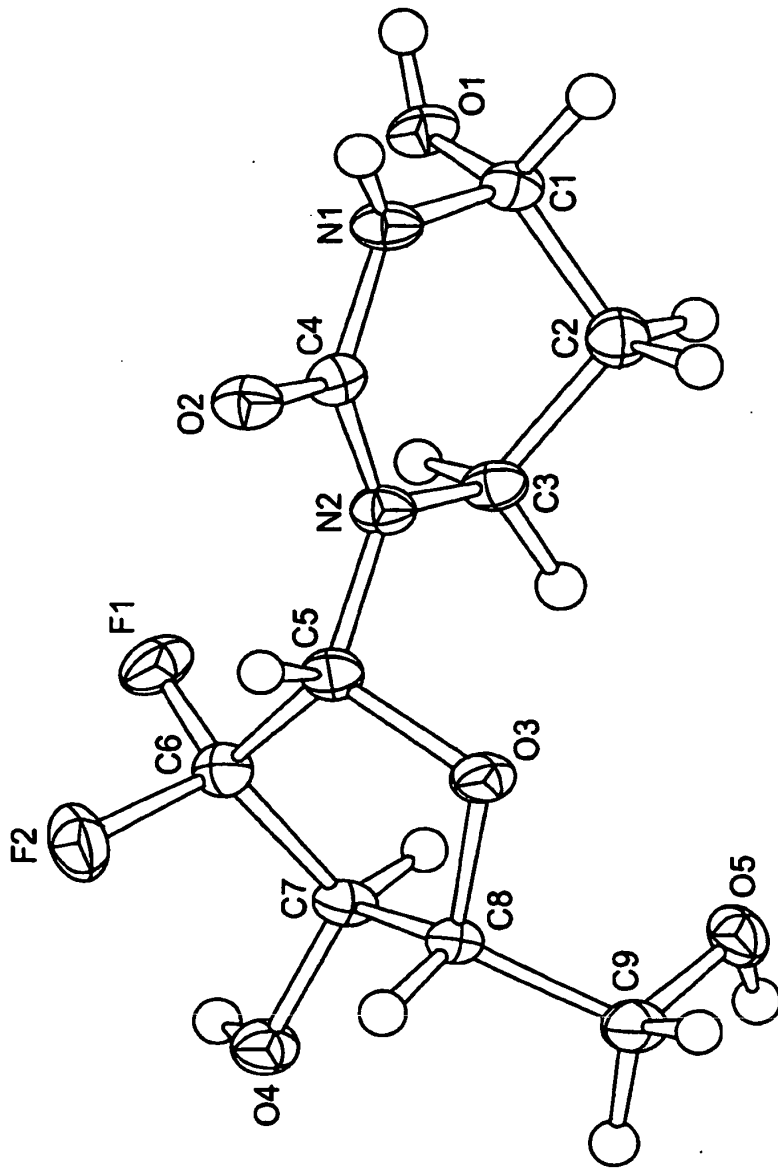


FIG. 8

THUEND20

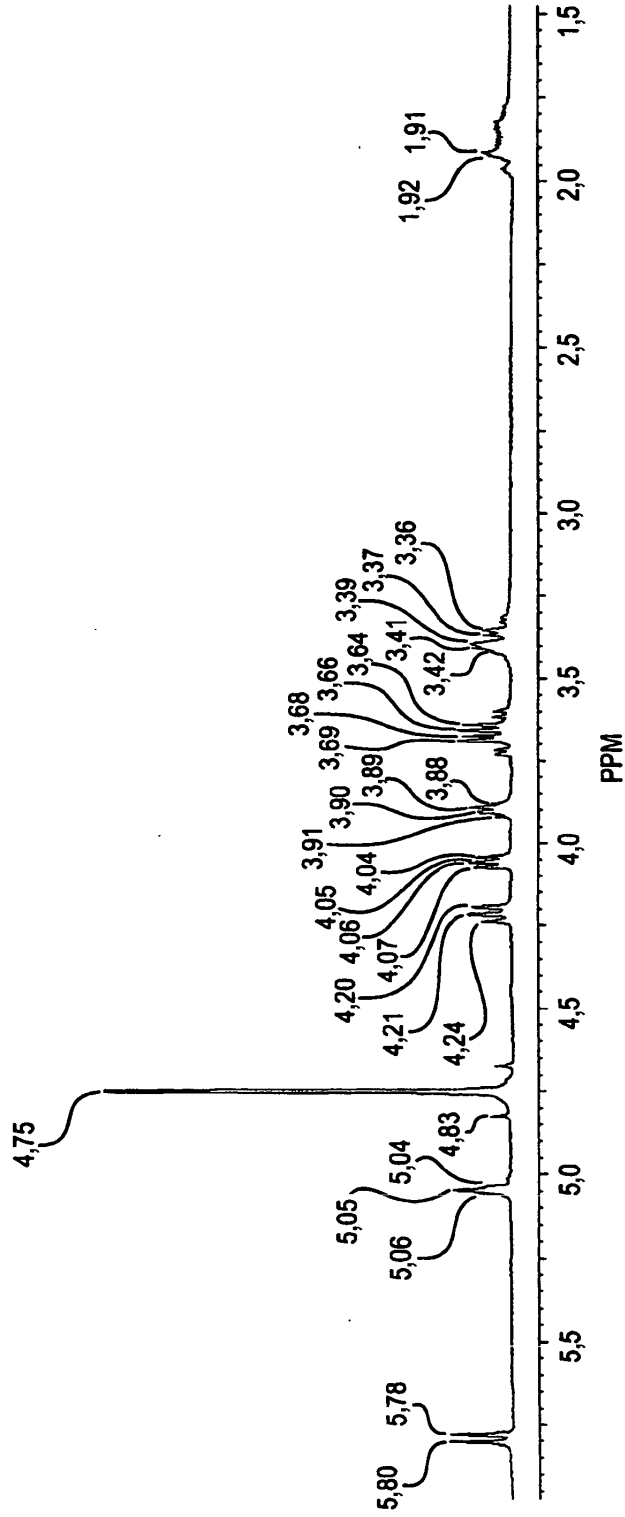


FIG. 9

THUEND2O CON d-TFA (t = 0h)

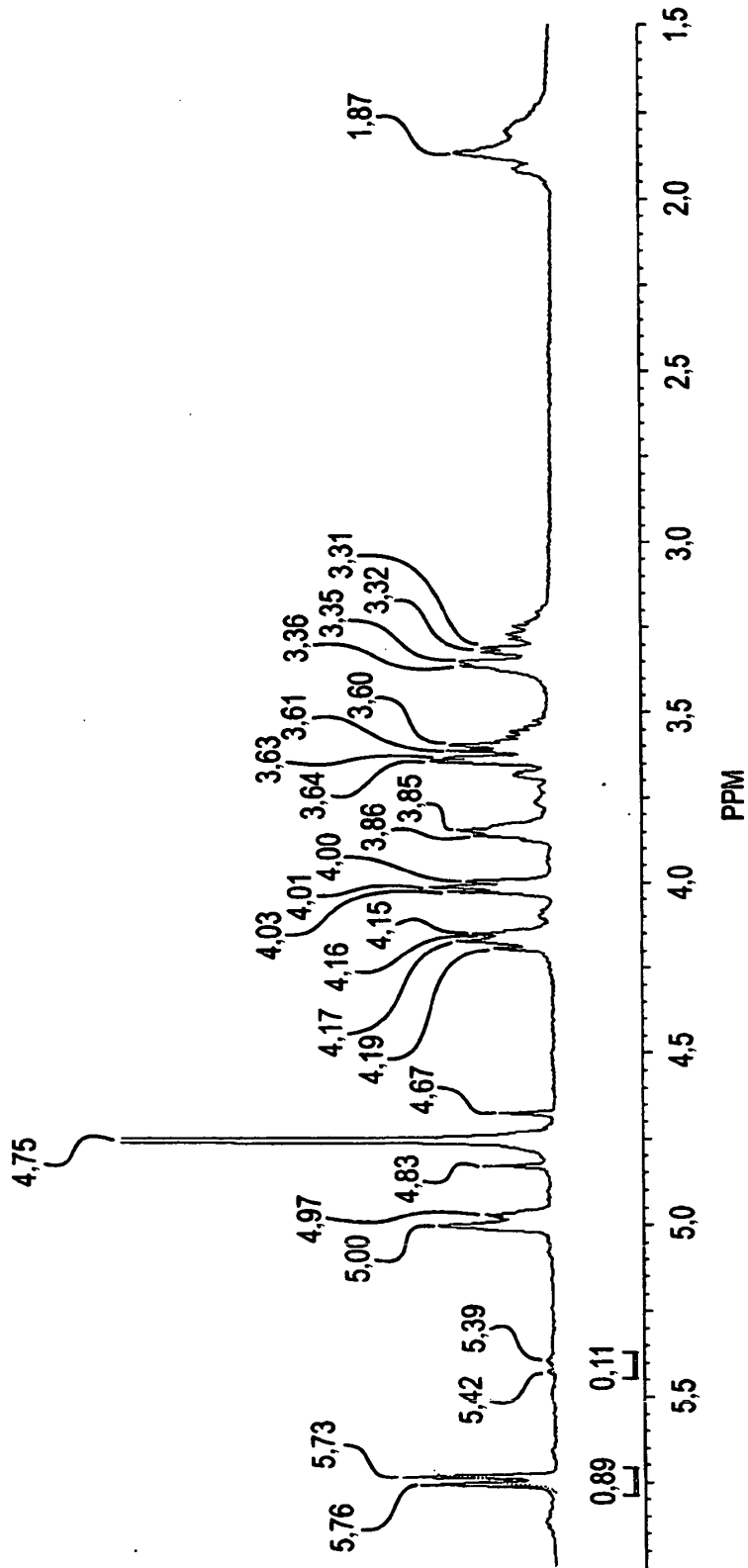


FIG. 10A

THUEND₂O CON d-TFA (t = 4h)

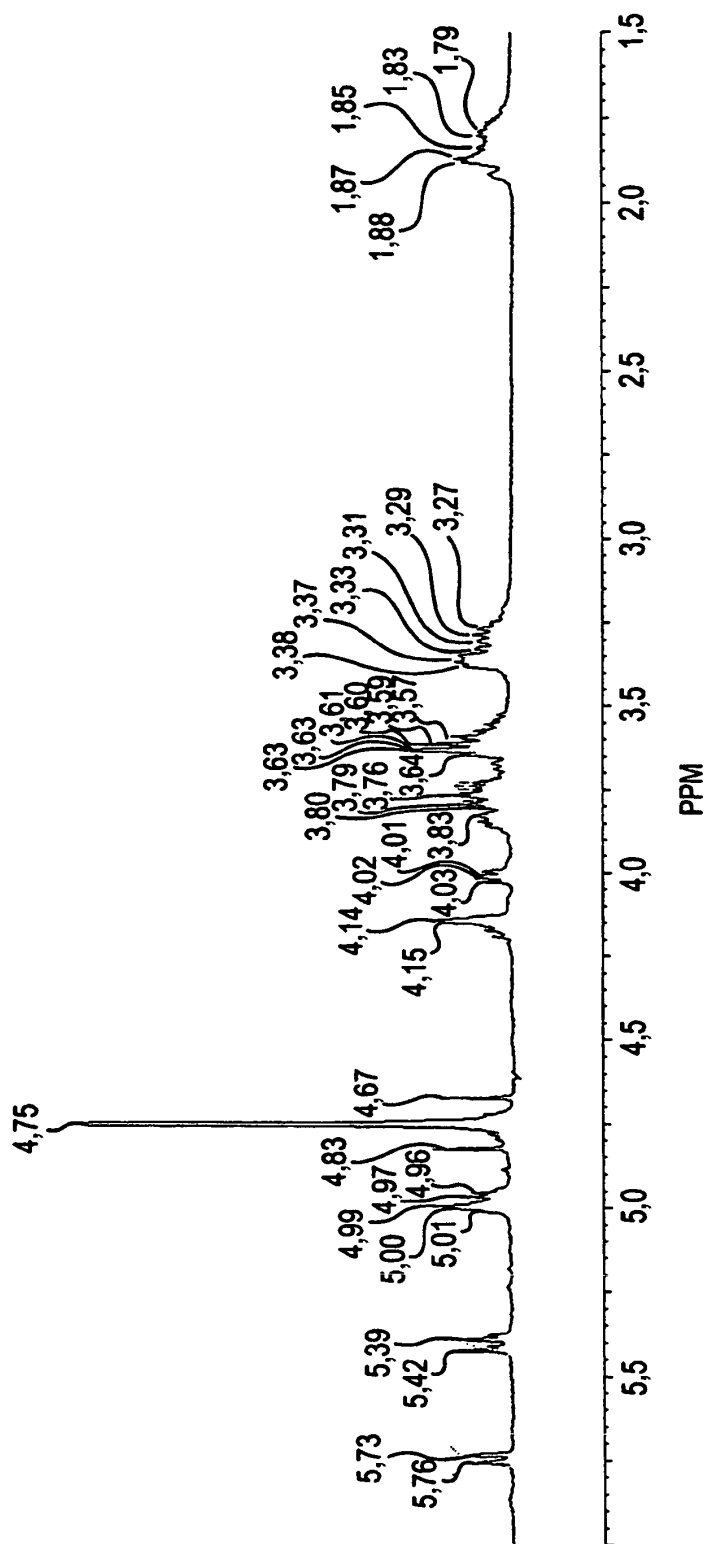


FIG. 10B

THUEND₂O CON d-TFA (t = 72h)

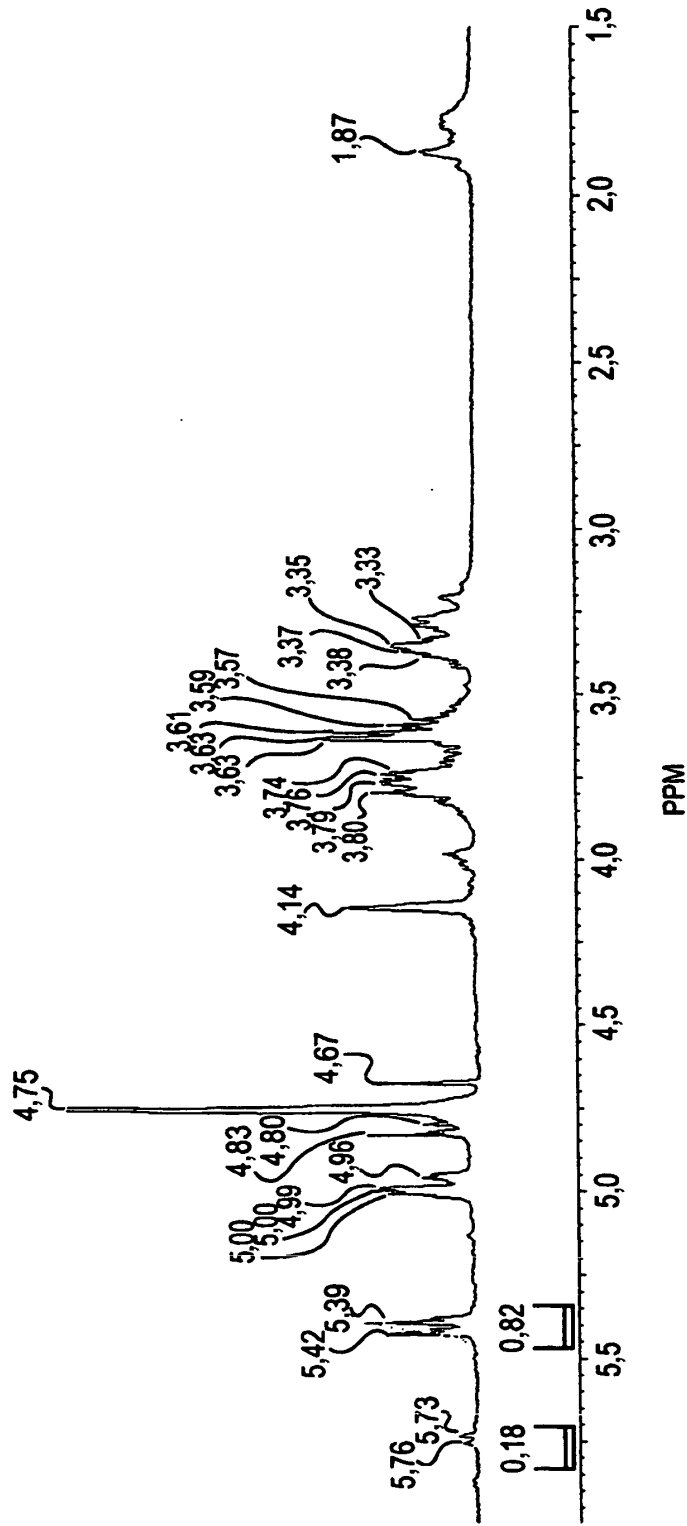


FIG. 10C

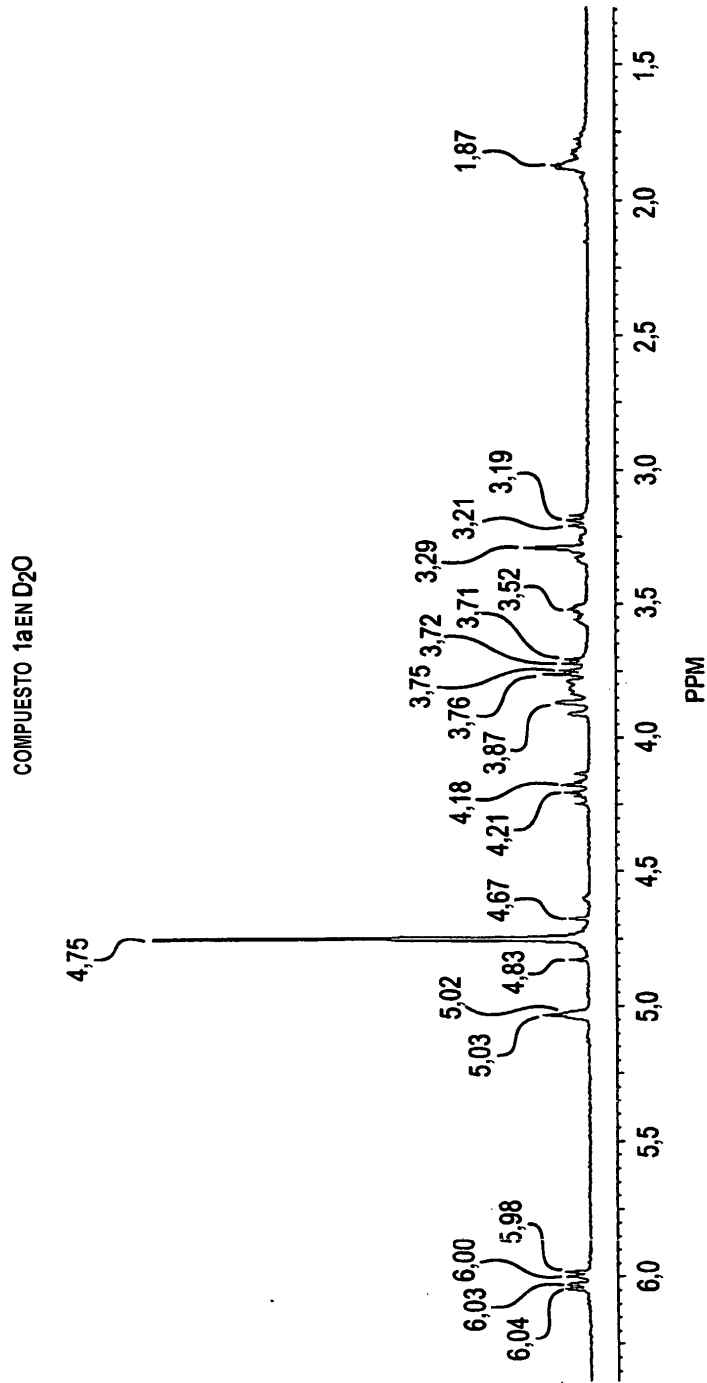


FIG. 11

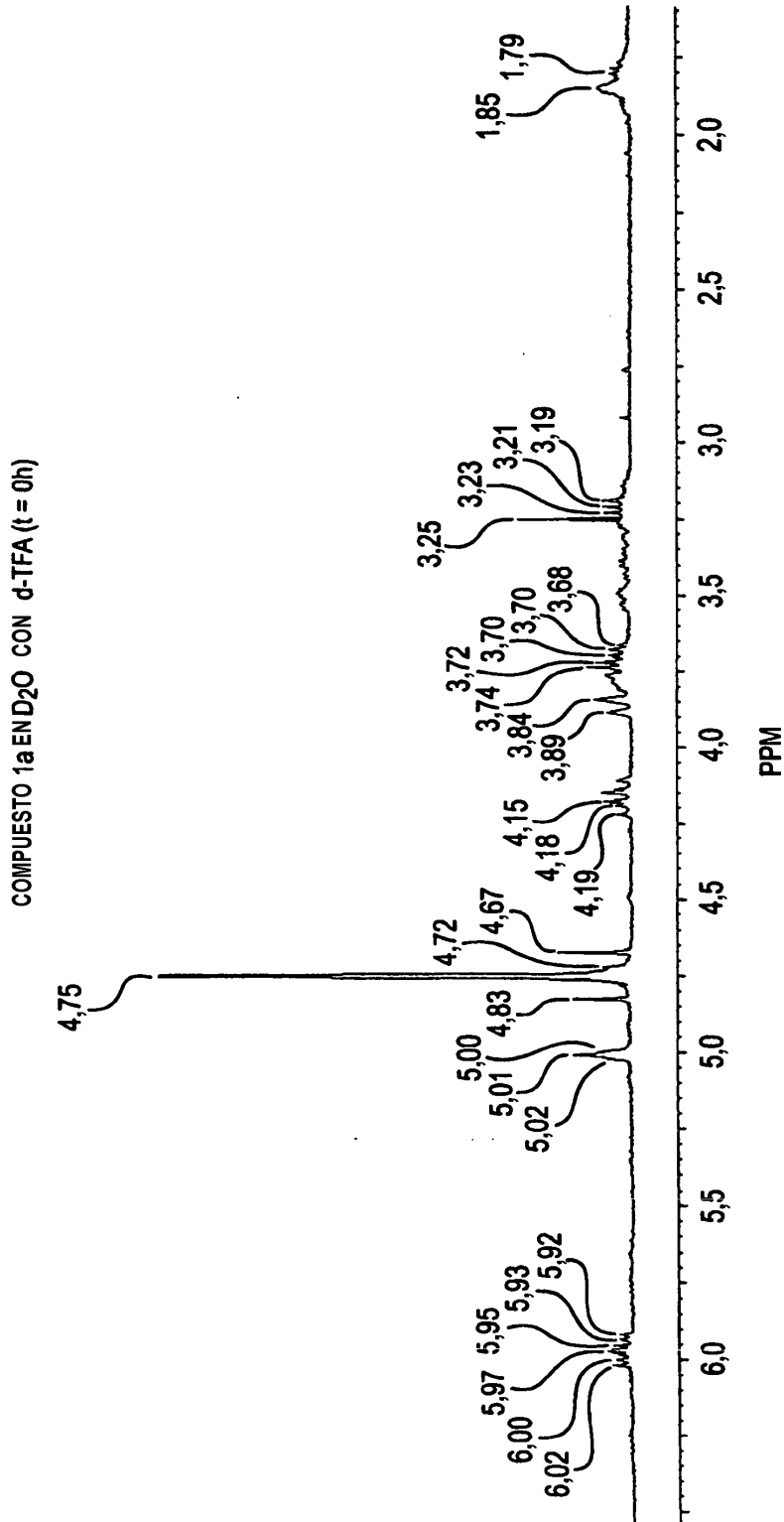


FIG. 12A

COMPUESTO 1aEND₂O CON d-TFA (t = 4h)

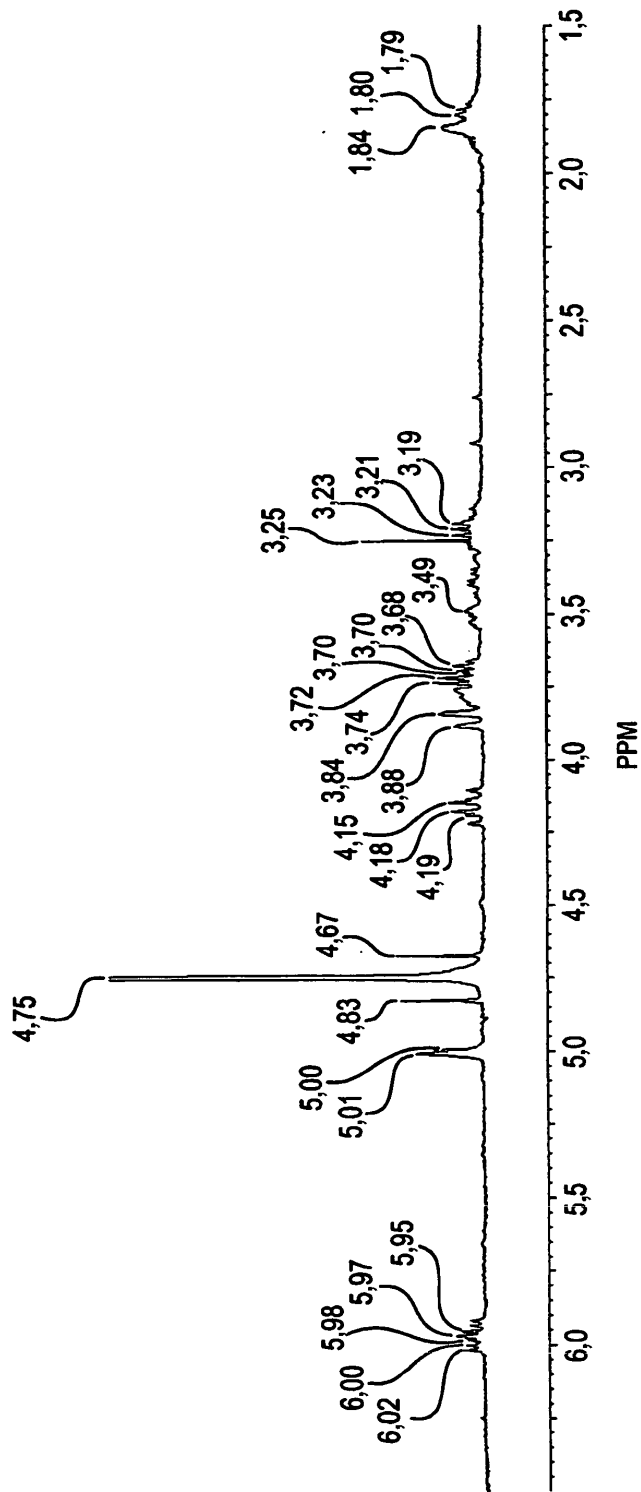


FIG. 12B

COMPUESTO 1aEND2O CON d-TFA (t = 72h)

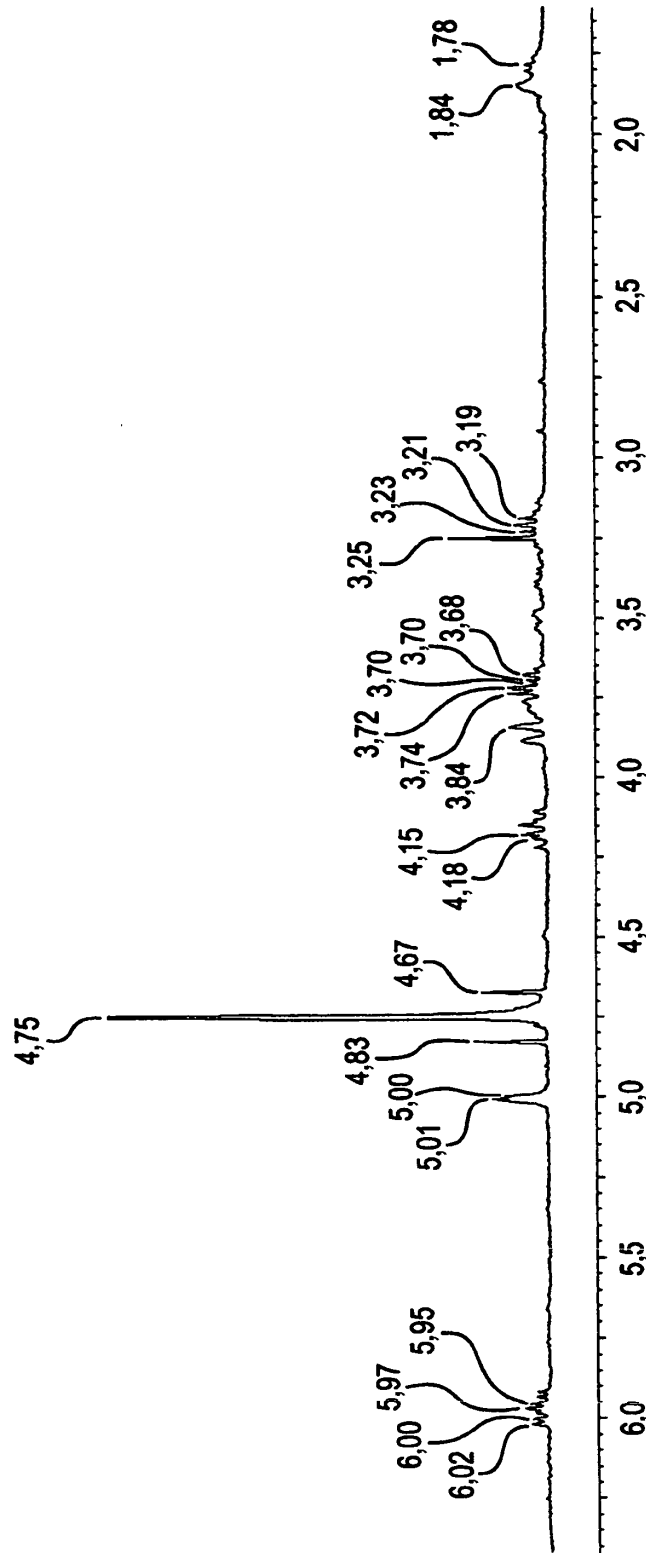


FIG. 12C