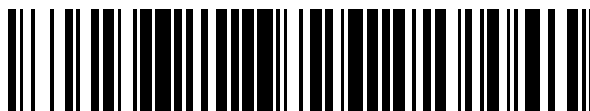


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 165**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/22** (2006.01)

**C07C 229/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2005 E 05821125 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1805192**

54 Título: **Salas de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas como agentes antitumorales**

30 Prioridad:

**25.10.2004 US 622087 P**

**18.04.2005 US 672707 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.03.2013**

73 Titular/es:

**DEKK-TEC, INC. (100.0%)  
725 TOPAZ STREET  
NEW ORLEANS LA 70124-3623, US**

72 Inventor/es:

**MORGAN, LEE.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 397 165 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**

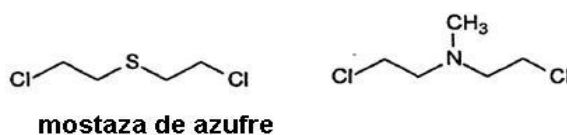
Sales de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas como agentes antitumorales.

**Campo de la invención**

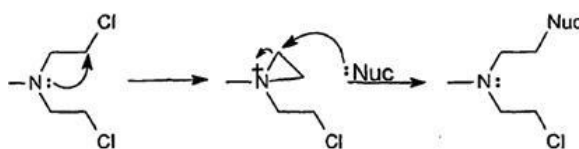
5 Esta divulgación se refiere a sales de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas. También se divulgan composiciones farmacéuticas y procedimientos para usar dichas composiciones para tratar trastornos hiperproliferativos.

**Antecedentes**

10 Las autopsias realizadas a soldados muertos por el gas mostaza en la Primera Guerra Mundial indicaron que la mostaza de azufre tiene un efecto desproporcionado sobre las células en división rápida y han sugerido que los compuestos de mostaza de azufre podrían tener efectos antitumorales. De hecho, los primeros investigadores intentaron tratar el cáncer mediante inyección directa de la mostaza de azufre en tumores. Esta investigación estaba limitada por la extrema toxicidad de los compuestos de mostaza de azufre y se investigó a los análogos de mostaza de nitrógeno, tales como mecloretamina como alternativas menos tóxicas.



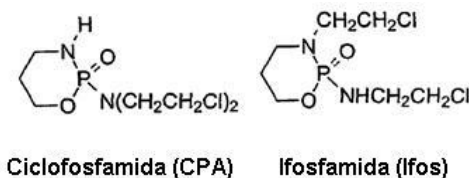
15 En general, los compuestos de mostaza ejercen sus efectos citotóxicos alquilando el ADN, tal como en la posición N-7 de un residuo de guanina. El mecanismo de alquilación mediante los compuestos de mostaza se ilustra en el Esquema 1. Con referencia al Esquema 1, los compuestos de mostaza tienen un nucleófilo interno que ayuda al desplazamiento del cloruro, como se muestra para el caso de la mecloretamina, formando un intermedio de aziridinio. Dado que la mecloretamina tiene dos grupos salientes, el mecanismo de sustitución nucleofílica representada en el Esquema 1 se puede repetir y da como resultado un ADN o un sobrecruzamiento proteína-ADN.



**Esquema 1**

25 La mecloretamina es extremadamente reactiva y, como resultado, es no selectiva. Se han diseñado miles de agentes alquilantes y se han preparado usando mecloretamina como modelo. No obstante, pocos de estos compuestos han mostrado suficiente superioridad terapéutica frente a la mecloretamina como para justificar la realización de ensayos clínicos.

Dada la ausencia de selectividad de la mayoría de los análogos de mecloretamina, se han investigado profármacos, tales como los compuestos de fosforamida, que pueden ser activados por la elevada concentración de fosforamidasa presentes en células neoplásicas. Se ha demostrado que dos agentes alquilantes de fosforamida, ciclofosfamida (CPA) y el compuesto isomérico ifosfamida (Ifos) son particularmente eficaces.



30 La vía metabólica de la CPA es similar a la de la Ifos (el metabolismo de la Ifos se ilustra en la FIG. 1) y, por tanto, los dos compuestos comparten los mismos inconvenientes. Quizá lo más importante es su toxicidad limitante de la dosis por cistitis hemorrágica. Se cree que la cistitis hemorrágica está inducida por la producción de acroleína durante la activación de CPA y de Ifos. La acroleína es un electrófilo activo que reacciona con tioles en condiciones fisiológicas, que puede ser responsable de su toxicidad hepática en forma de depleción de glutatión. Por último, se ha demostrado que la acroleína es teratógena y un potente mutágeno, lo que puede ser responsable del vínculo entre el tratamiento con CPA y efectos secundarios graves, tales como carcinoma de vejiga urinaria y otras

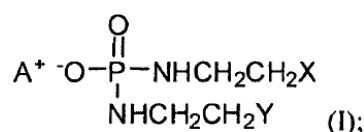
neoplasias malignas.

5 Con referencia a la FIG. 1, la mostaza de isofosforamida (IPM) es un metabolito común de la CPA y la Ifos. Se piensa que la IPM es responsable de al menos una porción de la actividad antitumoral exhibida por la CPA y la Ifos. Los esfuerzos realizados para usar la IPM como agente anticanceroso directamente no han tenido éxito debido, en parte, a la inestabilidad del compuesto. Se ha sintetizado IPM y se han realizado evaluaciones biológicas preliminares del compuesto, pero, por desgracia, la IPM es demasiado inestable como para ser aislada y usada para tratamiento en seres humanos.

10 Millis y col., J. Med. Chem. 1995, 38, páginas 2166-2175, han comunicado que se ha incluido NaCl en estudios de RMN de  $^{13}\text{P}$  de IPM con el fin de mantener una fuerza iónica constante y, además, actuaría ralentizando la desaparición de la IPM.

### Sumario de la divulgación

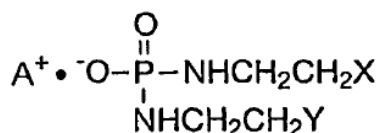
De acuerdo con la invención, en el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden una sal de la fórmula:



15 En la que  $\text{A}^+$  representa  $\text{BH}^+$  y B es una amina seleccionada de los aminoácidos básicos, piridina, *N,N*-dimetilaminopiridina, diazabicyclononano, diazabicycloundeceno, *N*-etil-*N*-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, mono, bis o tris-(2-hidroxietyl)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxietyl)metilamina, *N,N*-dimetil-*N*-(2-hidroxietyl)amina, tri-(2-hidroxietyl)amina y *N*-metil-D-glucamina, en la que X e Y representan de forma independiente grupos salientes y en la que la sal de fórmula (I) tiene una semivida a temperatura ambiente en presencia de agua que es igual o superior a dos veces la de la mostaza de isofosforamida en las miasmas condiciones

20

Para una mejor comprensión también se divulgan en el presente documento compuestos de la fórmula

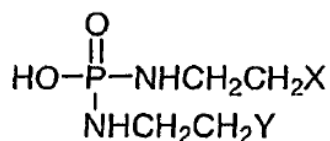


25 en la que  $\text{A}^+$  representa una especie de amonio seleccionada de las formas protonada (ácido conjugado) o cuaternaria de aminas alifáticas y aminas aromáticas, incluidos aminoácidos básicos, aminas heterocíclicas, piridinas sustituidas o insustituidas, guanidinas y amidinas; y X e Y representan de forma independiente grupos salientes.

30 También se divulgan composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los compuestos descritos con anterioridad. En un aspecto, las composiciones pueden incluir uno o más agentes terapéuticos aparte de los descritos mediante la fórmula anterior para usar en terapia de combinación.

También se divulgan procedimientos para tratar sujetos mamíferos, tales como sujetos humanos, que tienen trastornos hiperproliferativos. Dichos procedimientos pueden emplear uno o más de los compuestos y composiciones descritos con anterioridad.

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas de compuestos de la fórmula



35 en la que X e Y representan de forma independiente grupos salientes, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. También se describen procedimientos de preparación de dichas composiciones, incluida la esterilización de la composición estéril usando un filtro antimicrobiano estéril. Dicha filtración se puede realizar con menos del 10 % de descomposición del ingrediente activo, preferentemente menos del 5 %, 2 % o incluso menos del 1 % de

descomposición.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para producir un liofilizado que comprende un compuesto de la fórmula anterior.

- 5 En un caso, el procedimiento comprende poner en contacto la mostaza de isofosforamida o un análogo de la misma con una base amina en presencia de agua y liofilizar la mezcla resultante.

### **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 es un esquema que ilustra el metabolismo de la ifosfamida, incluida la producción de acroleína y de mostaza de isofosforamida.

La FIG. 2 es un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{IPM}\cdot(\text{LYS})_2$  en  $\text{D}_2\text{O}$  registrado a 500 MHz.

- 10 La FIG. 3 es una sección ampliada del espectro de la FIG. 2.

La FIG. 4 es un espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{IPM}\cdot(\text{LYS})_2$ .

### **Descripción detallada**

- 15 Las siguientes explicaciones de términos, expresiones y ejemplos se proporcionan para describir mejor los presentes compuestos, composiciones y procedimientos, y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Se entenderá también que la terminología usada en la presente divulgación es para el propósito de describir solo realizaciones y ejemplos particulares y no se desea que sea limitante.

- 20 Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como de "aproximadamente" un valor concreto y/o de "aproximadamente" otro valor concreto. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde un valor concreto y/o al otro valor concreto. De forma similar, cuando los valores se expresan en forma de aproximaciones mediante el uso del anterior "aproximadamente", se entenderá que el valor concreta forma otra realización. También debe entenderse que los criterios de valoración de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro criterio de valoración como de forma independiente con el otro criterio de valoración.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas se hará referencia a una serie de términos que se entenderá que tienen los significados siguientes:

- 25 "Opcional" u "opcionalmente" significan que el acontecimiento o la circunstancia que se describen más adelante puede ocurrir pero no tiene que ocurrir necesariamente y que la descripción incluye los casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y los casos en los que no.

- 30 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, incluidos  $\alpha$ -aminoácidos, en sus estereoisómeros D y L para aminoácidos quirales. Ejemplos de residuos aminoácidos básicos incluyen los que tienen una cadena lateral básica, tal como un grupo amino o guanidino. Los residuos aminoácidos básicos incluye, sin limitaciones, arginina, histidina, homoarginina, lisina, hemolisina y ornitina.

- 35 El término "anticuerpo" significa una inmunoglobulina, natural o producida total o parcialmente de forma sintética. Todos los derivados del mismo que mantienen una capacidad de unión específica también se incluyen dentro del término. El término también cubre cualquier proteína que tiene un dominio de unión que es homóloga o considerablemente homóloga con un dominio de unión a inmunoglobulina. Estas proteínas pueden proceder de fuentes naturales, o producirse total o parcialmente de forma sintética. Los anticuerpos usados en el presente documento pueden ser monoclonales o policlonales.

Como se usa en el presente documento, "amina alifática" se refiere a un compuesto de la fórmula  $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ , en la que al menos uno de  $\text{R}^{1-3}$  es un grupo alifático.

- 40 La expresión "amina alifática acíclica" se refiere a una amina alifática como antes, en la que al menos uno de los grupos alifáticos es acíclico.

La expresión "amina heterocíclica" se refiere a un compuesto de la fórmula  $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ , en la que al menos uno de  $\text{R}^{1-3}$  es un grupo heterocíclico o  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y/o  $\text{R}^3$  tomados junto con su átomo de nitrógeno común forman un anillo.

#### *1. Sales de IPM y análogos de IPM*

- 45 Los compuestos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen IPM y análogos de IPM que se formulan con uno o más equivalentes de una base. Dado que la IPM y sus análogos son lábiles al ácido y son ácidas, los compuestos divulgados en el presente documento ofrecen mayor estabilidad, así como otras ventajas. Las ventajas de las formulaciones divulgadas en términos de síntesis, estabilidad y biodisponibilidad serán evidentes para los expertos en la técnica tras consideración de la presente divulgación.

En un caso, los compuestos divulgados son sales de mostaza de isofosforamida o análogos de mostaza de isofosforamida, incluidos uno o más cationes. Los cationes pueden ser un ácido conjugado de una base amina. Contraiones adecuados para la mostaza de isofosforamida y sus análogos incluyen los ácidos conjugados (como se usa en el presente documento, los términos que hacen referencia a aminas se entenderá que incluyen sus ácidos conjugados a menos que el contexto indique claramente que se hace referencia a amina libre) de las bases, incluidos aminoácidos básicos, aminas alifáticas, aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas, guanidinas y amidinas. De las aminas alifáticas, las aminas alifáticas acíclicas y las di y trialquilaminas cíclicas y acíclicas son particularmente adecuadas para usar en los compuestos divulgados.

Ejemplos concretos de bases de amina adecuadas (y sus correspondientes iones de amonio) para usar en los presentes compuestos incluyen, sin limitaciones, piridina, *N,N*-dimetilaminopiridina, diazabiclononano, diazabicooundeceno, *N*-metil-*N*-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, mono-, bis- o tris- (2-hidroxiethyl) amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxiethyl)metilamina, *N,N*-dimetil-*N*-(2-hidroxiethyl)amina, tri-(2-hidroxiethyl)amina y *N*-metil-*D*-glucamina.

En una realización adicional, las sales descritas anteriormente pueden incluir una segunda amina o grupo amónico. En una realización, los compuestos divulgados en el presente documento incluyen más de un equivalente de una amina por cada equivalente de mostaza de isofosforamida o de un análogo de la mostaza de isofosforamida. Dichas realizaciones incluyen las que tienen proporciones entre la amina y la mostaza de isofosforamida o análogos de la mostaza de isofosforamida que no son números enteros. En ciertas realizaciones, los compuestos tienen una proporción de dos a una o de tres a una entre la amina y la mostaza de isofosforamida o un análogo de la mostaza de isofosforamida. En realizaciones de trabajo se produjeron sales que contenían dos equivalentes de base amina por equivalente de mostaza de isofosforamida. En una realización, una base amina usada para formar mostaza de isofosforamida y un análogo de la mostaza de isofosforamida incluye más de un grupo amino, dichas bases se pueden denominar "multibásicas". Más específicamente, ciertos ejemplos de bases multibásicas que se pueden usar tienen dos grupos amino; dichos compuestos se pueden denominar "dibásicos". Por ejemplo, una molécula dibásica adecuada es *N,N*-dimetilaminopiridina, que incluye dos grupos amino básicos. En una realización concreta de un compuesto divulgado en el presente documento, un compuesto incluye mostaza de isofosforamida o un análogo de la mostaza de isofosforamida y un equivalente de una amina dibásica.

En una realización, los compuestos divulgados incluyen una o más bases zwitteriónicas. Ejemplos de dichas bases incluyen aminoácidos, que son zwitteriónicos a pH fisiológico.

En una realización, las sales divulgadas actualmente son más estables que la mostaza de isofosforamida y los análogos de la mostaza de isofosforamida. Por ejemplo, la mostaza de isofosforamida, tras la liofilización del compuesto puro, se descompone en casi el 40 % durante el almacenamiento a -20 °C durante tres meses. Por el contrario, la sal de lisina de la IPM no exhibe ninguna descomposición que se pueda medir, incluso tras diez meses en condiciones de almacenamiento similares.

Los compuestos divulgados son sales de mostaza de isofosforamida estabilizadas o análogos de sales de mostaza de isofosforamida estabilizadas, en las que la sal tiene una semivida a temperatura ambiente (p. ej., de aproximadamente 23 °C) en presencia de agua que es superior a la semivida de la mostaza de isofosforamida en presencia de agua en las mismas condiciones. En concreto, una sal de mostaza de isofosforamida tiene una semivida que es igual o superior a dos veces la de la mostaza de isofosforamida en presencia de agua, más preferentemente igual o superior a cinco veces.

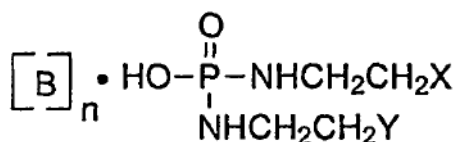
En ciertas realizaciones, los liofilizados de los compuestos divulgados son más estables que una preparación liofilizada de mostaza de isofosforamida. En ciertas de estas realizaciones preferidas, el liofilizado de los compuestos divulgados tiene una semivida más prolongada que una preparación liofilizada de la propia mostaza de isofosforamida, preferentemente al menos dos veces más larga, más preferentemente al menos cinco veces más larga.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de sales farmacéuticamente aceptables de IPM o sus análogos (tales como los compuestos de la fórmula anterior) son más estables que una composición por lo demás idéntica de la propia mostaza de isofosforamida (es decir, no en forma de sal) en condiciones idénticas. En ciertas de estas realizaciones preferidas, las composiciones divulgadas tienen una semivida más prolongada que una preparación liofilizada de la mostaza de isofosforamida, preferentemente al menos dos veces más larga, más preferentemente al menos cinco veces más larga.

Ciertos compuestos de mostaza de isofosforamida y de análogos de mostaza de isofosforamida divulgados en el presente documento incluyen grupos salientes. Sin limitarse a la teoría, se cree que los dos grupos salientes son desplazados in vivo por nucleófilos biomoleculares, tales como ácidos nucleicos y proteínas, de modo que se entrecruzan las biomoléculas. La expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo saliente que puede ser desplazado por un nucleófilo. Con referencia a los compuestos divulgados en el presente documento, grupo saliente se refiere a un grupo que se puede desplazar para formar un intermedio de aziridinio o puede ser desplazado directamente por un nucleófilo biomolecular, tal como un nucleófilo de ácido nucleico, para formar, por ejemplo, una especie de guanidino alquilada en la posición 7. Ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen los halógenos y los

sulfonatos (-SO<sub>2</sub>R). En una realización de las sales de análogos de isofosforamida divulgadas, el compuesto es un grupo saliente "mixto", incluidos dos tipos diferentes de grupos salientes, por ejemplo un halógeno y un sulfonato o dos halógenos diferentes, tales como un bromo y un cloro. La patente de EE.UU. nº 6,197,760 de Struck enseña procedimientos para fabricar dichos compuestos de grupos salientes mixtos.

5 La presente divulgación también se refiere a agentes anti-hiperproliferativos de la fórmula

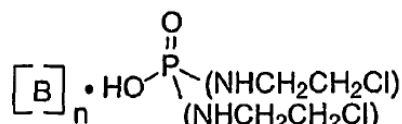


10 Con referencia a la fórmula, B puede ser, para cada n, una molécula básica seleccionada de forma independiente. B se puede seleccionar de los aminoácidos básicos, aminas alifáticas acíclicas, di y trialkilaminas, aminas alifáticas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas sustituidas e insustituidas, guanidinas cíclicas y acíclicas, y amidinas cíclicas y acíclicas. Normalmente, n es de 1 a aproximadamente 3, de tal como que la fórmula puede incluir diferentes moléculas básicas. Todavía haciendo referencia a la fórmula, X e Y son grupos salientes. Un experto en la técnica entenderá que la estructura de la mostaza de isofosforamida incluye un protón ácido y como tal existe de forma predominante como su base conjugada a pH fisiológico y en presencia de una base tal como B. Asimismo, B, siendo un grupo básico existe predominantemente como su ácido conjugado a pH fisiológico y en presencia de la mostaza de isofosforamida y los análogos de la mostaza de isofosforamida. Ejemplos de los compuestos divulgados se representan en la Tabla 1.

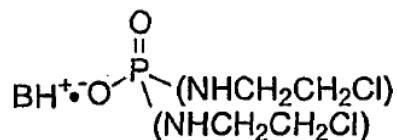
Tabla 1

$[B]_n \cdot HO-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}-NHCH_2CH_2X$ $ $ $NHCH_2CH_2Y$			
B	n	x	Y
lisina	2	Cl	Cl
NH <sub>3</sub>	2	Cl	Cl
ciclohexilamina	2	Cl	Cl
N-metil-D-glucamina	2	Cl	Cl
N,N-dimetilaminopiridina	1	Cl	
arginina	2	Cl	Cl
lisina	2	Cl	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
lisina	2	Br	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

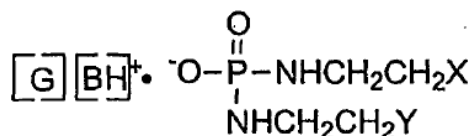
Los compuestos divulgados incluyen sales de mostaza de isofosforamida. Ciertos ejemplos de dichas sales de mostaza de isofosforamida se pueden representar con la fórmula



20 Con referencia a la fórmula anterior, B puede ser cualquier grupo básico, particularmente una amina. Se debe reconocer que la fórmula anterior existirá predominantemente como la sal correspondiente y, por tanto, puede incluir compuestos que están representados por la fórmula

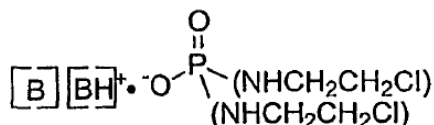


Con referencia a la fórmula anterior, dichos compuestos también pueden incluir uno o más equivalentes adicionales de una especie de amina o amonio. Dichos compuestos se pueden representar con la fórmula:



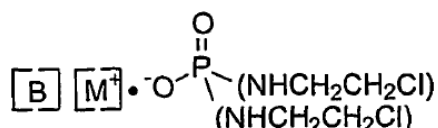
- 5 en la que G representa una segunda especie de amina o amonio. En ejemplos concretos, G es un aminoácido básico y  $\text{BH}^+$  representa el ácido conjugado del mismo aminoácido básico o de uno diferente.

En un caso,  $\text{BH}^+$  es el ácido conjugado de G. En este caso, las sales de mostaza de isofosforamida divulgadas pueden estar representadas por la fórmula



- 10 en la que B es una amina y  $\text{BH}^+$  es su ácido conjugado.

En un caso, los compuestos divulgados en el presente documento incluyen un catión metálico, tal como un catión de metal alcalino. Ejemplos de dichos cationes incluyen  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ . En un aspecto, dichos ejemplos se pueden representar con la fórmula



- 15 en la que  $\text{M}^+$  representa un catión de metal alcalino y B es como se ha definido anteriormente.

## II. Composiciones y procedimientos

- 20 Otro aspecto de la divulgación incluye composiciones farmacéuticas, preferentemente composiciones farmacéuticas estériles, preparadas para administrar a un sujeto y que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos divulgados actualmente. Dichas composiciones estériles se pueden preparar pasando una solución de la sal de IPM o un análogo de la misma a través de un filtro antimicrobiano estéril. Dichas composiciones estériles comprenden, preferentemente, el principio activo de la invención con una degradación menor del 10 %, preferentemente menor del 5 %, 2 % o incluso menor del 1 % de descomposición, medido mediante ensayo para determinar la presencia de subproductos de descomposición tales como ácido fosfórico y sus sales y etilaminas sustituidas.

- 25 Los compuestos divulgados en el presente documento se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante inhalación o pulverización y se pueden administrar en formulaciones monodosis que contienen vehículos, excipientes y transportadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales.

- 30 Normalmente se prefiere la administración parenteral mediante inyección de las sales de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas divulgadas. Los inhibidores se pueden proporcionar en una única dosificación o de forma crónica, dependiendo de la enfermedad concreta, el estado del paciente, la toxicidad del compuesto y otros factores, como reconocerá un experto en la técnica.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o compuestos administrados puede variar en función de los efectos deseados y de los factores indicados anteriormente.

- 35 Las composiciones farmacéuticas para administrar a un sujeto pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes de superficie activa y similares, además de la molécula de elección. Las

composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos adicionales, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares. Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir componentes adicionales, tales como vehículos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para estas formulaciones son convencionales. En Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition (1995), se describen composiciones y formulaciones adecuadas para liberación farmacéutica de los compuestos divulgados en el presente documento.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo concreto de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente contienen fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), vehículos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

En una realización se formula un compuesto divulgado para administración a un sujeto humano. En un aspecto de esta realización, la composición farmacéutica incluye de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, tal como de aproximadamente 20 a aproximadamente 100mg/ml del compuesto de una sal de mostaza de isofosforamida o un análogo de la misma.

En un aspecto, ciertas realizaciones de composiciones farmacéuticas se formulan en formas de dosificación unitarias.

Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitaria contienen de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1.500 mg, tal como de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1.500 mg de una sal de mostaza de isofosforamida divulgada o un análogo de la misma por unidad de dosificación.

En algunas realizaciones se contempla específicamente que los presentes compuestos se liberan mediante un depot de fármaco inyectado y/o implantado, por ejemplo que comprende liposomas multivesiculares, tale como en DepoFoam (SkyePharma, Inc, San Diego, CA) véase, por ejemplo, Chamberlain y col., Arch. Neuro. 1993, 50, 261-264; Katri y col., J. Pharm. Sci. 1998, 87, 1341-1346; Ye y col., J. Control Release 2000, 64, 155-166; y Howell, Cancer J. 2001, 7, 219-227).

En el presente documento se divulgan procedimientos para tratar afecciones caracterizadas por una actividad proliferativa anormal o patológica o neoplasias mediante la administración de uno o más de los compuestos divulgados y composiciones de los mismos. "Neoplasia" hace referencia al proceso de crecimiento celular anormal e incontrolado. Neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo. El producto de una neoplasia es un neoplasma (un tumor), que es un crecimiento anormal de tejido que es el resultado de un exceso de división celular. Un tumor que no produce metástasis se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o que puede producir metástasis se denomina "maligno".

Las afecciones que se pueden tratar de acuerdo con el procedimiento divulgado incluyen las caracterizadas por un crecimiento y/o diferenciación celular anormal, tal como cánceres y otras afecciones neoplásicas. Ejemplos típicos de trastornos proliferativos que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones divulgados se indican a continuación.

Ejemplos de tumores hematológicos que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen leucemias, incluidas leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (las formas indolente y de grado alto), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, leucemia de células peludas y mielodisplasia.

Otros ejemplos de afecciones que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones divulgados incluyen tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de la glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de la vejiga urinaria y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma)



En una realización, los compuestos divulgados en el presente documento son superiores a CPA o lfos solas contra el crecimiento de tumores resistentes a CPA. Por tanto, un aspecto de un procedimiento divulgado en el presente documento incluye tratar a un sujeto que tiene una afección neoplásica resistente a CPA con una sal de mostaza de isofosforamida o un análogo de la misma divulgados en el presente documento.

- 5 En una realización del procedimiento, se administra a un sujeto de aproximadamente 0,2 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día de una sal de mostaza de isofosforamida o un análogo de la misma divulgada. Por ejemplo, se puede administrar a un sujeto de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 7,5 mg/kg/día de un compuesto divulgado.

- 10 En otra realización del procedimiento, se administra a un sujeto de aproximadamente 10 a aproximadamente 700 mg/m<sup>2</sup>/día, tal como de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup>/día o de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>/día. Por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup>/día, tal como de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 mg/m<sup>2</sup>/día de un compuesto divulgado en el presente documento.

- 15 En una realización del procedimiento para tratar trastornos hiperproliferativos divulgados en el presente documento se administra a un sujeto un compuesto divulgado según un calendario de múltiples dosis diarias. En dichas realizaciones, el compuesto se administra durante al menos dos días y durante tantos como en cinco días diferentes. En un aspecto de calendarios de múltiples dosis diarias, el compuesto se administra al sujeto en días consecutivos, tal como de dos a cinco días consecutivos.

- 20 En una realización del procedimiento se administran a un sujeto uno o más agentes terapéuticos además de los compuestos y composiciones divulgados en el presente documento. Por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar incluyen agentes de unión a microtúbulos, de intercalado o entrecruzamiento de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y/o ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos y/o inhibidores de la angiogénesis.

- 25 “Agente de unión a microtúbulos” se refiere a un agente que interacciona con la tubulina para estabilizar o desestabilizar la formación de microtúbulos de modo que se inhibe la división celular. Ejemplos de agentes de unión a microtúbulos que se pueden usar junto con las sales de mostaza de isofosforamida divulgadas en el presente documento y análogos de las mismas incluyen, sin limitaciones, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vindesina, vinorelbina (navelbina), las epotilonas, colchicina, dolastatina 15, nocodazol, podofilotoxina y rizoxina. También se pueden usar análogos y derivados de dichos compuestos que conocerán los expertos en la técnica. Por ejemplo, epotilonas y análogos de epotilona adecuados para incorporar en los presentes compuestos se describen en la publicación internacional nº WO 2004/018478, que se incorpora en el presente documento por referencia. Actualmente se cree que los taxoides, tales como paclitaxel y docetaxel, son particularmente útiles como agentes terapéuticos en los compuestos divulgados en el presente documento. Ejemplos de taxoides adicionales útiles, incluidos análogos de paclitaxel se enseñan en las patentes de EE.UU. nº 6,610,860 de Holton, 5,530,020 de Gurrum y col., y 5,912,264 de Wittman y col., Cada una de estas patentes se incorpora en el presente documento por referencia.
- 30
- 35

- Reguladores adecuados de la transcripción de ADN y/o ARN, incluidos, sin limitaciones, actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina y derivados y análogos de los mismos también son adecuados para usar en combinación con los compuestos divulgados en el presente documento. Los agentes de intercalado y entrecruzamiento de ADN que se pueden incorporar en los compuestos divulgados incluyen, sin limitaciones, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mitomicinas, tales como mitomicina C, bleomicina, clorambucilo, ciclofosfamida y derivados y análogos de los mismos.
- 40

Inhibidores de la síntesis de ADN adecuados para usar como agentes terapéuticos incluyen, sin limitaciones, metotrexato, 5- fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo y análogos de los mismos.

- 45 Ejemplos de inhibidores enzimáticos adecuados para usar en combinación con los compuestos divulgados en el presente documento incluyen, sin limitaciones, camptotecina, etopósido, formestano, tricostatina y derivados y análogos de los mismos.

- Terapéuticas adecuadas para usar con los compuestos divulgados en el presente documento que afectan a la regulación génica incluyen agentes que dan como resultado aumento o disminución de la expresión de uno o más genes, tales como, sin limitaciones, raloxifeno, 5-azacotidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona y derivados y análogos de los mismos.
- 50

- La expresión “inhibidor de la angiogénesis” se usa en el presente documento para indicar una molécula que incluye, entre otras, biomoléculas, tales como péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, oligonucleótidos, ADN, ARN, vectores recombinantes y moléculas pequeñas que funcionan inhibiendo el crecimiento de los vasos sanguíneos. La angiogénesis está implicada en ciertos procesos patológicos, tales como los implicados en trastornos tales como retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, dermatitis, psoriasis, úlceras gástricas y la mayoría de los tipos de tumores sólidos humanos.
- 55

En la técnica se conocen los inhibidores de la angiogénesis y ejemplos de inhibidores de la angiogénesis adecuados incluyen, sin limitaciones, angiostatina K1-3, estaurosporina, genisteína, fumagilina, medroxiprogesterona, suramina, interferón-alfa, inhibidores de la metaloproteínasa, factor 4 de las plaquetas, somatostatina, trombospondina, endostatina, talidomida, y derivados y análogos de los mismos.

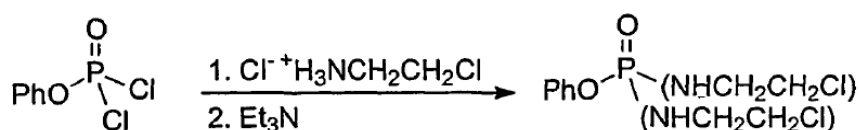
- 5 Otros agentes terapéuticos, particularmente agentes antitumorales, que pueden o no entrar dentro de una o más de las clasificaciones anteriores, también son útiles para administrar en combinación con los compuestos divulgados en el presente documento. A modo de ejemplo, dichos agentes incluyen adriamicina, apigenina, rapamicina, zebularina, cimetidina, y derivados y análogos de los mismos

### III. Ejemplos

- 10 La divulgación anterior se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

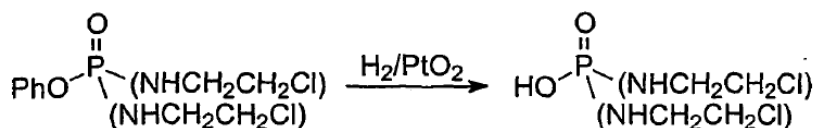
Este ejemplo describe la síntesis del éster de fenilo de IPM de acuerdo con el esquema.



- 15 En un matraz de fondo redondo de 3 cuellos y 5 litros equipado con un agitador mecánico, un embudo de goteo de 500 ml y un tubo de secado de cloruro cálcico se suspende clorhidrato de 2-cloretilamina (116g; 1,0 mol) en 1.200 ml de cloruro de metileno y se agita en un baño de agua helada. Cuando la temperatura disminuyó hasta 5 °C se añadió fenilidiclorofosfonato (105,5 g; 0,5 mol) (disponible comercialmente en Aldrich, Milwaukee, WI). Mediante goteo se añadió trietilamina (202 g, 2 mol) a 1 gota por segundo; la temperatura no superó los 5 °C. La mezcla se dejó agitar durante la noche. Al día siguiente se mezclaron 200 ml de ácido clorhídrico concentrado (12M) con 1.800 ml de agua. A la mezcla de la reacción se añadió lentamente 200 ml de la solución ácida. La mezcla pasó a ser transparente y se transfirió a un embudo de separación de 2 l y se separaron las capas orgánica y acuosa. La capa orgánica se extrajo con la solución ácida 9 x 200 ml, seguido de agua 1 x 200 ml. Después, se separó la capa orgánica y se secó sobre sulfato sódico y se filtró. Después se evaporó el cloruro de metileno a presión reducida y el residuo oleoso se disolvió en 40 ml de acetato de etilo y lentamente se añadieron 60 ml de hexano con agitación; a continuación se cubrió con Parafilm y se guardó a 5 °C en refrigerador durante la noche. Al día siguiente los cristales blancos se filtraron por succión y se lavaron con 100 ml de hexano frío y después se dejaron secar al aire. El líquido madre se conservó en el refrigerador durante 9 horas y se formó una segunda cosecha de cristales que se dejaron secar al aire. Una tercera cosecha de cristales se formó tras la refrigeración del licor madre a partir de la segunda cosecha durante la noche y se dejaron secar al aire. Las cosechas combinadas tuvieron un rendimiento de 117,3 gramos, 0,39 mol. El rendimiento fue del 82 %; p.f. 53-55; Anal. calculado para C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P (P.M. 297,13) C, 40,44%; H, 5,09%; N, 9,43%; Hallado C, 39,7%; H, 4,97%; N, 9,00%.
- 20
- 25
- 30

#### Ejemplo 2

Este ejemplo describe la síntesis de IPM (ácido *N,N*-di(2-cloroetil)fosforodiamídico) a partir del éster de fenilo IPM descrito en el ejemplo 1.



- 35 El éster sólido blanco del ejemplo 1 (0,39 mol) se disolvió en 100 ml de etanol al 95 % y se añadió a un matraz de Parr y se añadieron 2,5 g de PtO<sub>2</sub>. La suspensión se hidrogenó a 50 PSI; dos horas después se interrumpió la hidrogenación y con cuidado se añadieron 2,5 g de PtO<sub>2</sub> con agitación. La hidrogenación se continuó a 50 PSI durante dos horas. Después se detuvo, se llevó a temperatura ambiente y se calentó en una placa caliente con agitación magnética. Cuando la suspensión estaba en ebullición se filtró por succión inmediatamente a través de un embudo de succión de 5,5 cm con dos papeles de filtro y el sobrenadante se almacenó a 5 °C durante dos horas; el catalizador se guardó y se añadió al matraz de Parr y se almacenó en un refrigerador durante la noche. El sólido blanco formado se filtró por succión a través de un embudo de succión de 9 cm y se guardó en un bote sin pesticida; el licor madre se añadió al matraz de Parr y se añadieron 1,25 gramos de PtO<sub>2</sub>, se hidrogenó a 50 PSI durante dos horas. Se detuvo, se calentó y se filtró como anteriormente, y el licor madre se conservó en el refrigerador durante la noche. Los cristales blancos formados se filtraron por succión y se combinaron con la primera cosecha. El licor madre se recogió en el matraz de Parr con el catalizador usado y se añadieron 1,25 gramos adicionales de PtO<sub>2</sub>, y la
- 40
- 45

- 5 hidrogenación continuó a 50 PSI durante dos hora. Después se detuvo, se calentó y se filtró para producir una tercera cosecha que se combinó con las cosechas 1 y 2. Las cosechas combinadas se agitaron en 150 ml de acetona durante 30 minutos, después se almacenaron a 5 °C durante dos horas y se filtraron y almacenaron en un desecador de vacío durante dos horas. El rendimiento fue de 38 g; 0,17 mol; rendimiento del 44 %; p.f. (corr.) 112-114. Anal. calculado para  $C_4H_{11}N_2O_2PCl_2$  (P.M. 221,11) C, 21,73%; H, 5,01%; N, 12,67%; Hallado C, 22,12%; H 5,02%; N, 12,23%.

### Ejemplo 3

- 10 Este ejemplo describe la preparación de la sal de lisina de IPM a partir de la IPM producida de acuerdo con el ejemplo 2. La L-lisina se pesó (25,4 g) y el agua se midió (6 l). La L-lisina se añadió al agua con agitación a 2-8 °C. El volumen de la sustancia farmacológica, IPM, se pesó (20 g) y se añadió lentamente con agitación a 2-8 °C a la solución de lisina.

Una vez disuelta a La solución se mantuvo a 2-8 °C y se dispensó en viales en condiciones estériles.

El producto disuelto se liofilizó después en las condiciones siguientes.

Tiempo (horas)	Acción	Temperatura (°C)
0-1	Carga	0 – 45
1 - 7	Retención	- 45
7 - 34	Secado primario	- 25
34 - 55	Secado secundario	- 10
55 - 76	Secado secundario	0
76 +	Purga con nitrógeno	0

Como alternativa, el producto disuelto se puede liofilizar en las condiciones siguientes.

Tiempo (horas)	Acción	Temperatura (°C)
0 – 0,5	Carga	0 – 45
0,5 – 6,5	Retención	- 45
6,5 - 33	Secado primario	- 25
33 - 54	Secado primario	- 10
54 - 95	Secado secundario	0
95 +	Purga con nitrógeno	0

- 15 Los viales se tapan en condiciones de esterilidad de acuerdo con el procedimiento normalizado de trabajo. La sal de lisina de IPM liofilizada se envasa en viales de cristal sin impresión con tapones sellados de caucho rizado. Este sistema de contenedor/cierre no incluye un revestimiento. La espectrometría de masas por electropulverización de iones negativos reveló picos característicos para  $IPM \cdot (LYS)_2$  a  $M = 219,0, 441,0$  (dímero) y  $662,7$  unidades de masa (trímero). La RMNA de  $^1H$  y la RMN de  $^{13}C$  de  $IPM \cdot (LYS)_2$  en  $D_2O$  se proporcionan en las FIG. 2-4.
- 20 La ciclohexilamina y las sales de amonio de IPM se prepararon como se ha descrito anteriormente para la sal de lisina. Cada una de estas sales se aisló de modo que tuvieran una estequiometría de 2:1 entre la amina y la IPM.

### Ejemplo 4

- 25 Este ejemplo describe la evaluación de la IPM contra varias líneas celulares de cáncer diferentes implantadas en ratones. Los ratones toleraron bien el tratamiento intraperitoneal (IP) e intravenoso (IV) con IPM en cada estudio; las únicas toxicidades son patologías de órganos observadas en la autopsia que se asociaron con los tumores inducidos.

- 30 En primer lugar se evaluó la IPM contra dos variantes de L1210, las líneas celulares L1210/0 y L1210/CPA implantadas en ratones, en comparación con Ifos. Las dosis para IPM dieron el 50 % de la dosis para Ifos. Se observó ILS para los tres agentes en los grupos tratados con L1210/0. No obstante, para el modelo de L1210/CPA el tratamiento con IPM fue superior al de los otros dos grupos (Ifos vs CPA). En la línea tumoral resistente a CPA,

los animales tratados con IPM experimentaron un incremento por dos de la supervivencia con una reducción de la carga tumoral de 7. Para el modelo tumoral L1210/0, la IPM fue igual de activa que la CPA y la Ifos, pero a una dosis menor. Esto demuestra que las células resistentes a CPA no tienen resistencia cruzada a IPM. Los resultados de este estudio se registran más adelante en la Tabla 2.

5

**Tabla 2**

Actividad de la mostaza de isofosforamida contra leucemias L1210/0 y L1210/CPA (respuesta óptima a nº de dosis DL<sub>10</sub> del estudio de dosis-respuesta)

Agente	Dosis* (mg kg <sup>-1</sup> )	Carga tumoral L1210/0† al principio de Rx=8,5 x 10 <sup>7</sup> células			Carga tumoral L1210/CPA† al principio de Rx=6,0 x 10 <sup>7</sup> células		
		Supervivientes el día 60/total	% ILS (solo los ratones que mueren)	Reducción Log <sub>10</sub> neta en la carga tumoral tras la terapia‡	Supervivientes el día 60/total	% ILS (solo los ratones que mueren)	Reducción Log <sub>10</sub> neta en la carga tumoral tras la terapia‡
Ciclofosfamida	200	0/10	+ 107	7	0/10	+ 57	4
Ifosfamida	431	0/10	+ 185	8	0/10	+ 85	5
	289	0/9	+ 114	8	0/10	+ 57	4
Mostaza de ifosforamida	100	0/10	+ 128	8	1/10	+ 114	7

\*Tratamiento: IP; solo el día 2; dosis no tóxica más alta (DL<sub>10</sub> o menor) en un intervalo de dosis.

† IP; 10<sup>6</sup> células en ratones CDF<sub>1</sub> macho.

10

En un segundo estudio se demuestra la inhibición del carcinoma de pulmón de Lewis mediante IPM en ratones en los que se implantaron tumores de carcinoma de pulmón de Lewis. Dosis IP únicas el segundo día con CPA, Ifos, PM e IPM en los ratones portadores de carcinoma de pulmón de Lewis revelaron que la IPM daba 6/10 supervivientes sin tumor en comparación a 7/10 y 5/10 para CPA a dosis iguales equitóxicas. El calendario de dosis única se usó para cada agente y las actividades observadas (T-C) fueron las mismas entre los cuatro agentes.

Los resultados de este estudio, registrados en la Tabla 3, demuestran que la IPM es eficaz contra el carcinoma de pulmón de Lewis.

15

**Tabla 3**

Respuesta del carcinoma de pulmón de Lewis a un implante de mostaza de isofosforamida de tamaño: 20 – 30 mg; sitio del implante: s.c.; Tratamiento farmacológico: IP

Agente	Calendario		Dosis no tóxica más alta (mg kg- 1/dosis)	Supervivientes sin tumor	T- C*†	% ILS ‡	Log total muertes™	
Ciclofosfamida	Día única	2 Dosis	200	5/10	27	68	> 6,8	
Ifosfamida	Día única	2 Dosis	300	7/10	18	55	> 4,5	
Mostaza fosforamida	de	Día única	2 Dosis	200	0/10	4,9	15	1,2
		Día minutos x 7	2 C5 30	0/10	6,1	17	1,5	

Mostaza de Día 2 Dosis 100 6/10 8,4 34 > 2,1  
isofosforamida única

\* Retraso del crecimiento tumoral (T-C), en el que T = mediana del tiempo (días) requerido para los tumores del grupo de tratamiento y C, tumores del grupo control (mediana de 120 cada uno) para alcanzar un peso previamente determinado (750 mg). Se excluyó de estos cálculos a los supervivientes sin tumores.

† Control: Mediana del día de muerte) = 29; tiempo para que la mediana del tumor alcance 750 mg= 10,4 días; no hubo supervivientes sin tumores entre los 30 ratones control.

‡ Incremento del tiempo de vida, excluidos los supervivientes.

δ El log<sub>10</sub> de muerte celular (total) se calculó usando la fórmula siguiente: Log de muerte= valor T-C / (3,32 T<sub>4</sub>). En la que T<sub>4</sub> es el tiempo de duplicación del volumen del tumor medido desde una línea recta de mejor ajuste de los tumores del grupo control en crecimiento exponencial (intervalo de 100-400 mg). T<sub>4</sub> = 1m2 para el tumor de Lewis en este experimento.

En un tercer estudio se evaluó la eficacia de la IPM en la inhibición del crecimiento del melanoma B16. Administraciones de dosis únicas de IPM a 150 mg revelaron que la IPM era ligeramente inferior a la CPA pero mejor que la Ifos en este modelo animal resistente. No se observaron diferencias estadísticas entre las respuestas de % ILS entre los tres agentes terapéuticos. Los resultados de este estudio, registrados en la Tabla 4, demuestran la eficacia de la IPM contra el melanoma.

5

**Tabla 4**

Comparación de la respuesta del melanoma B16 s.c. a ciclofosfamida, mostaza de isofosforamida, mostaza de fosforamida y a Ifosfamida

Agente	Calendario Rx	Dosis (mg mg <sup>-1</sup> )	Supervivientes sin tumor	T-C* (días)	% ILS
Ciclofosfamida	Día 2				
	Dosis única	200	5/10		68
Ifosfamida	Día 2				
	Dosis única	300	7/10	18	55
Mostaza de fosforamida	Día 2				
	Dosis única	200	0/10	4,8	15
Mostaza de isofosforamida	Día 2				
	Dosis única	100	6/10	8,4	34

\*Véase la nota al pie de la Tabla 3 en lo que antecede. El peso predeterminado fue 750 mg.

10 En un cuarto estudio se evaluó la IPM en la inhibición de la leucemia P388 en ratones. En este modelo animal la IPM fue eficaz en comparación con CPA e Ifos contra leucemia P388 implantada IP como indica el > log<sub>10</sub> muerte celular, aunque produjo menos supervivientes sin tumor. No obstante, con el modelo de tumor P388/CPA se incrementó significativamente la muerte celular además del % ILS para IPM en comparación con CPA e Ifos. Los resultados de este estudio se registran en la Tabla 5. Todos los datos son estadísticamente significativos y demuestran que la IPM se puede usar contra tumores tratados o resistentes a CPA además de para pacientes previamente tratados con otros agentes.

15

**Tabla 5**

Actividad de la mostaza de isofosforamida contra leucemias P388/0 y P388/CPA (respuesta óptima a n° de dosis DL<sub>10</sub> del estudio de dosis-respuesta)

Agente	Dosis* (mg kg <sup>-1</sup> )	Carga tumoral P388/0† al principio de Rx= ~ 4,4 x 10 <sup>6</sup> células			Carga tumoral P388/CPA† al principio de Rx= ~4,6 x 10 <sup>6</sup> células		
		Supervivientes el día 60/total	% ILS (solo los ratones que mueren)	Carga tumoral tras terapia‡	Supervivientes el día 60/total	% ILS (solo los ratones que mueren)	Reducción log <sub>10</sub> neta en la carga tumoral tras terapia‡
CPA	265	7/10	+ 280	7	0/10	+ 35	3
	175	4/10	+ 130	7	0/10	+ 35	3
Ifos	538	7/10	+ 210	7	0/10	+ 42	4
	431	7/10	+ 130	7	0/10	+ 39	4
IPM	125	0/9	+ 100	6	0/10	+ 71	7
	100	1/10	+ 140	7	0/10	+ 85	7

\*Tratamiento: IP; solo el día 1; dosis no tóxica más alta (DL<sub>10</sub> o menor) en un intervalo de dosis.

† Implante: IP; 10<sup>6</sup> células en ratones CDF<sub>1</sub> hembra.

En un quinto estudio se evaluó la inhibición con IPM del sarcoma M5076 implantado en ratones. Se inyectaron dosis diarias de 18-40 mg/kg de IPM a tumores en crecimiento durante cinco días (el compuesto se inyectó IP diariamente los días 11-15). La T – C fue de 6,1 días a 40 mg/kg. Las dosis fueron bien toleradas con mejoras significativas en la respuesta. Los ratones toleraron bien los tratamientos (IP); las únicas toxicidades son patologías de órganos observadas en la autopsia que se asociaron con los tumores inducidos. Los resultados de este estudio, registrados en la Tabla 6, demuestran que la IPM es eficaz contra el sarcoma de un modo dependiente de la dosis.

**Tabla 6**

Respuesta del sarcoma M5076 implantado SC al tratamiento con IPM			
Agente	Dosis (mg/kg)	Días hasta 2 duplicaciones	Días de retraso (T-C)
IPM	40	15,4	6,1
IPM	27	12,6	3,3
IPM	18	10,3	1

En un sexto estudio se evaluó la inhibición de tumores de mama 16/C implantados en ratones. En los ratones se implantó el tumor de mama 16/C y cuando los tumores eran palpables/mensurables se trataron con CPA, Ifos e IPM como agentes individuales. CPA e Ifos se usaron como controles para IPM. Los fármacos se administraron IP a dosis de 30-60 mg/kg/día durante 4 días, comenzando el día 7 tras la implantación del tumor. Se produjo una mejora estadística de la actividad para IPM en comparación con CPA e Ifos, a todas las dosis para los tres agentes. IPM fue superior en “días hasta 2 duplicaciones” y “días de retraso (T-C)” en comparación con Ifos y CPA a la misma dosis/día contra este tumor mamario murino agresivo. Todas las proporciones estaban dentro de los límites de confianza. Estos datos (registrados en la Tabla 7) demuestran la eficacia de IPM contra los tumores de mama y las dosis de cuatro días avalan además la superioridad de múltiples dosis de IPM.

**Tabla 7**

Respuesta del tumor de mama 16/C SC al tratamiento con CPA, IFOS e IPM						
Agente	Dosis	Vía	Calendario		Días hasta 2 duplicaciones	Días de retraso (T – C)
Control.		IP	C1d x 4 días 7	CONTROL	3,2	
CPA	60	IP	C1d x 4 días 7	CPA	7,7	4,5
CPA	50	IP	C1d x 4 días 7		7,2	4,0
CPA	40	IP	C1d x 4 días 7		4,4	1,2
CPA	30	IP	C1d x 4 días 7		3,6	0,4
IFOS	60	IP	C1d x 4 días 7	IFOS	4,6	1,4
IFOS	50	IP	C1d x 4 días 7		4,9	1,7
IFOS	40	IP	C1d x 4 días 7		3,8	0,6
IFOS	30	IP	C1d x 4 días 7		4,0	0,8
IPM	50	IP	C1d x 4 días 7	IPM	9,5	6,3
IPM	40	IP	C1d x 4 días 7		8,5	5,2
IPM	30	IP	C1d x 4 días 7		7,4	4,2

5 En un séptimo estudio se evaluó la IPM contra el melanoma lox-IMVI humano implantado IP. En ratones atímicos se implantó IP el melanoma Lox humano y se trató durante cinco días con CPA o IPM. Las dosis de ambos fármacos fueron 40 mg/kg al día IV durante 5 días. El % ILS fue +121 para CPA y +52 para IPM. No obstante se observaron respuestas excelentes y las dosis fueron bien toleradas. Las respuestas estaban dentro de los límites de confianza. Los resultados de este estudio (registrados en la Tabla 8) demuestran la eficacia de la administración IV de IPM también demuestran la eficacia de la IPM contra el melanoma humano.

**Tabla 8**

Tratamiento: IV;C1DX5 (1)		Respuesta terapéutica	
Agente	Dosificación (mg/kg/dosis)	Mediana de días de la muerte	% ILS
Control	-	19,0	-
PA	40	42,0	+ 121
IPM	40	29,0	+ 52

10 En un octavo estudio se evaluó la inhibición de tumores de mama -1/C MX-1 humanos con IPM. La administración IP diaria de CPA, Ifos o IPM se comparó en dosificaciones de 40-60 mg/kg siguiendo un calendario diario x 5 días comenzando el día 12 (tras la implantación). Los datos registrados en la Tabla 9 demuestran que la IPM es activa contra los tumores de mama humanos. Todas las proporciones estaban dentro de los límites de confianza.

**Tabla 9**

Respuesta del tumor de mama MX-1 SC al tratamiento con CPA, IFOS e IPM					
Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Calendario	Días hasta 2 duplicaciones	Días de retraso (T - C)
CPA	60	IP	C 1d x 5 día 12	> 48,0	> 40,5
IFOS	60	IP	C 1d x 5 día 12	39,4	31,9
IFOS	40	IP	C 1d x 5 día 12	16,1	8,6

IPM	60	IP	C 1d x 5 día 12	26,5	19,0
IPM	40	IP	C 1d x 5 día 12	14,2	6,7

**Ejemplo 5**

En este ejemplo se compara la eficacia de IPM y la de IPM•(LYS)<sub>2</sub> y la sal de IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> contra varias líneas celulares hiperproliferativas.

5 La eficacia de la IPM y la IPM•(LYS)<sub>2</sub> y la sal de IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> contra el tumor murino de pulmón de Lewis se comparó cuando se administraron los compuestos por vía IP a diario durante 5 días a dosis de 20-125 mg/kg al día x 5 días, comenzando el día 6 (tras la implantación). La IPM y su sal de lisina poseían actividades equivalentes a dosis que reflejaban un incremento por dos de la DMT (mg/kg/dosis) de la sal sobre el fármaco parental. Todas las proporciones estaban dentro de los límites de confianza. Los ratones toleraron bien la administración IP de la sal; las únicas toxicidades son patologías de órganos observadas en la autopsia que se asociaron con los tumores  
10 inducidos. Los resultados de este estudio (registrados en la Tabla 10) demuestran que IPM•(LYS)<sub>2</sub> exhibe una eficacia equivalente a la de la IPM contra el tumor murino de pulmón de Lewis y que la sal de IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> es eficaz contra el tumor murino de pulmón de Lewis.

**Tabla 10**

Tumores murinos de tumor de Lewis		
Agente	Dosificación MTD (mg/kg/dosis)	T – C (días)
Sal de lisina	93,2	8,3*
Sal de amonio de IPM	42,8	9,1
IPM	40,0	12,5*
Implante: 20-30 mg de fragmentos tumorales Vía de tratamiento: Intraperitoneal Calendario: todos los días x 5 comenzando el día 6 *Aunque los valores de T-C son estadísticamente diferentes (P = 0,004), las actividades antitumorales son comparables.		

15 Una segunda comparación de la eficacia de IPM, sal de IPM•(LYS)<sub>2</sub> y sal de IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> se concluyó con respecto a la inhibición de tumores de mama MX-1. En este estudio, los efectos de IPM y la sal de IPM•(LYS)<sub>2</sub> se compararon cuando se administraron por vía IP a dosis de 20-100 mg/kg al día x 5 días, comenzando el día 12 tras la implantación de los tumores de mama MX-1 en los ratones. La sal de IPM•(LYS)<sub>2</sub> fue 8 veces mayor a la IPM a dosis comparables. La DMT también fue mayor para la sal de lisina. Todas las proporciones estaban dentro de los límites de confianza. Los ratones toleraron bien el tratamiento IP con las sales IPM•(LYS)<sub>2</sub> y con IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; las únicas toxicidades son patologías de órganos observadas en la autopsia que se asociaron con los tumores inducidos. Estos  
20 datos (registrados en la Tabla 11) demuestran que tanto la sal de IPM•(LYS)<sub>2</sub> como la sal de IPM•(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> son significativamente superiores a la IPM contra células de tumor de mama humano.

**Tabla 11**

Tumor de mama humano MX-1		
Agente	Dosificación DMT (mg/kg/dosis)	T – C (días)
Sal de lisina de IPM	93,2	10,2*
Sal de amonio de IPM	28,6	4,6
IPM	40,0	2,1*



Implante: 20-30 mg de fragmentos tumorales implantados por vía subcutánea en la almohadilla de grasa de la mama

Vía de tratamiento: Intraperitoneal

Calendario: todos los días x 5 comenzando el día 12

Valor p\*= 0,041

### Ejemplo 6

En este ejemplo se describe la evaluación de la toxicidad aguda de la sal de lisina de la mostaza de isofosforamida siguiendo tres días de inyección intravenosa diaria (bolo) en ratones. Este estudio constaba de dos fases:

5 En primer lugar, la fase de búsqueda de intervalo de dosis consistió en cuatro grupos de tratamiento (un ratón/sexo/grupo) que recibieron el artículo de ensayo como una única dosis diaria durante tres días consecutivos a los respectivos niveles de dosis de 100, 200, 400, y 600 mg/kg. El vehículo fue cloruro sódico al 0,9 % para inyección, USP y todas las dosis estaban a un volumen constante de 15 ml/kg. Los animales se sometieron a observación durante siete días tras la dosis. El día 10, tras el periodo de observación de siete días, todos los supervivientes de la fase de búsqueda del intervalo de dosis se presentan en el Apéndice F de este informe. En base a las muertes observadas en la fase de búsqueda del intervalo de dosis a 200, 400, y 600 mg/kg, los niveles de dosis elegidos para la fase del estudio principal fueron 50, 75, 100, 200, 300, 500 y 600 mg/kg (véase más adelante).

15 La segunda, la fase principal del estudio consistió en ocho grupos de tratamiento (cinco ratones/sexo/grupo) que recibieron el artículo de ensayo como una única dosis diaria durante tres días consecutivos a los respectivos niveles de dosis de 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/kg. Un grupo adicional (5 ratones/sexo) sirvió como control del compuesto parental y recibió el compuesto parental mostaza de isofosforamida del mismo modo, a un nivel de dosis de 150 mg/kg. El vehículo fue cloruro sódico al 0,9 % para inyección, USP y todas las dosis estaban a un volumen constante de 15 ml/kg. Los animales se sometieron a observación durante 11 días tras el periodo de dosis de tres días.

20 Las observaciones de mortalidad, morbilidad y la disponibilidad de comida y agua se realizaron dos veces al día para todos los animales. Las observaciones de signos clínicos se realizaron a diario durante el estudio (aproximadamente una y cuatro horas después de la dosis los días 1, 2 y 3, y una vez al día los días de no administración de dosis). Los pesos corporales de todos los ratones supervivientes se midieron y registraron el segundo día desde la recepción, antes de la aleatorización, y los días -1 y 7. Los pesos corporales también se midieron en todos los animales supervivientes de la fase principal del estudio el día 14. Se realizaron evaluaciones macroscópicas en cada animal del estudio principal en la necropsia (Día 15).

#### *Adquisición y aclimatación de los animales:*

30 Un total de 62 ratones CD-1(1CR) BR macho y 61 hembras (de aproximadamente 6 semanas de edad) se recibieron de CD-1(1CR) Charles River Laboratories, Portage, Michigan, el 21 de abril de 2003. Durante el periodo de aclimatación de siete a 16 días se verificó el sexo de los animales, se pesó a los animales y se sometieron a observación dos veces al día con respecto a su salud general y para detectar cualquier signo de enfermedad. En el momento de la recepción se estableció a los animales a razón de tres o cuatro ratones/jaula con el fin de aclimatarlos al sistema de agua automático. Tres días después de la recepción se estableció a los animales individualmente. En todos los animales se realizó una observación clínica detallada antes de la selección para el estudio.

#### *Aleatorización, asignación al estudio y mantenimiento:*

35 Antes de la asignación al estudio se pesó a los ratones y se les exploró en busca de signos de enfermedad u otras anomalías físicas. Los animales asignados al estudio tenían pesos corporales dentro del 20 % del peso corporal medio para cada sexo. Usando un sencillo procedimiento de aleatorización se colocó a los animales en los grupos de tratamiento. Animales adicionales obtenidos para este estudio se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono y se desecharon.

40 Cuarenta y nueve ratones macho y 49 hembra (de un peso de 24,8 a 29,1 g y de 21,5 a 24,2 g, respectivamente en el momento de la aleatorización) fueron asignados a los grupos de tratamiento identificados en la Tabla 12.

45 A cada animal se le asignó un número de animal para usar en Provantis™ y se le implantó un microchip portador de un número de identificación único. El número de cada animal individual, el número de implante y el número de estudio comprendían una identificación única para cada animal. La jaula se identificó con el número del animal, el número de estudio, el número de grupo y el sexo. La identificación del animal se verificó durante el curso del estudio tal como se documenta en los datos.

Los animales fueron estabularon individualmente en jaulas suspendidas de tipo de alambre de malla de acero

inoxidable. Se proporcionó luz fluorescente durante aproximadamente 12 horas al día y se controló mediante un cronómetro automático. La temperatura y la humedad se monitorizaron y registraron a diario y se mantuvieron entre 68 y 74 °F y de 30 a 68 % respectivamente.

- 5 Los niveles de dosis para la fase de búsqueda de intervalo de dosis se seleccionaron en base a los datos disponibles de estudios previos. Los niveles de dosis para la fase del estudio principal se fijaron tras una revisión de los resultados de la fase de búsqueda de intervalo de dosis con la excepción de los 150 mg/kg del compuesto parental en el grupo control, cuyo nivel de dosis se seleccionó en base a los datos disponibles de estudios anteriores.

Tabla 12

Asignación de grupos			
Número de grupo	Nivel de dosis (mg/kg)	Números de animales	
		Machos	Hembras
Fase de búsqueda de intervalo de dosis <sup>a</sup>			
1	100	1	1
2	200	1	1
3	400	1	1
4	600	1	1
Fase del estudio principal <sup>b</sup>			
5 <sup>c</sup>	150	5	5
6	50	5	5
7	75	5	5
8	100	5	5
9	200	5	5
10	300	5	5
11	400	5	5
12	500	5	5
13	600	5	5
<sup>a</sup> Los animales recibieron las dosis durante tres días, seguido de un periodo de observación de siete días.			
<sup>b</sup> Los animales recibieron las dosis durante tres días, seguido de un periodo de observación de 11 días.			
<sup>c</sup> Este grupo recibió dosis del compuesto parental mostaza de isofosforamida (compuesto parental control).			

10 *Administración:*

Cuatro grupos de tratamiento (un ratón/sexo/grupo) recibieron el artículo de ensayo como una única dosis diaria durante tres días consecutivos por vía de inyección intravenosa (bolo) a los respectivos niveles de dosis de 100, 200, 400, y 600 mg/kg. Todas las dosis estaban a un volumen de 15 ml/kg y se basaron en los pesos corporales más recientes.

- 15 Ocho grupos de tratamiento del estudio principal (recibieron el artículo de ensayo como una única dosis diaria durante tres días consecutivos por vía de inyección intravenosa (bolo) a los respectivos niveles de dosis de 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/kg. Un grupo adicional (5 ratones/sexo) sirvió como control del compuesto parental y recibió el compuesto parental mostaza de isofosforamida del mismo modo, a un nivel de dosis de 150 mg/kg. Todas las dosis estaban a un volumen constante de 15 ml/kg y se basaron en los pesos corporales más recientes.

20

Sujetando al animal se administró la formulación de dosificación a través de una aguja que se insertó en la vena de la cola y se observó el capuchón de la aguja para detectar presencia de sangre y garantizar la correcta colocación de la aguja en la vena. A continuación se administró la dosis al volumen de dosis absoluta para cada animal.

*Observación y exploración:*

5 Se realizaron observaciones en todos los animales de mortalidad, morbilidad, lesiones y la disponibilidad de comida y agua dos veces al día durante la totalidad del estudio.

Se realizó una exploración clínica detallada de cada animal transcurridas una y cuatro horas desde la dosis los días 1, 2 y 3, y una vez al día los días de no administración de dosis. Las observaciones incluyeron, entre otras, evaluación de la piel, el pelaje, los ojos, los oídos, la nariz, la cavidad oral, el tórax, el abdomen, los genitales  
10 externos, las extremidades y los pies, efectos respiratorios y circulatorios, efectos autónomos tales como salivación, y efectos en el sistema nervioso, incluidos temblores, convulsiones, reactividad a la manipulación y comportamiento extraño.

Los pesos corporales de todos los ratones supervivientes se midieron y registraron el segundo día desde la recepción, antes de la aleatorización, y los días -1 y 7. Los pesos corporales también se midieron en todos los  
15 animales supervivientes de la fase principal del estudio el día 14. Los pesos corporales registrados tras la recepción y antes de la aleatorización no se indican, pero se conservan en el archivo del estudio.

El día 10 se sacrificó y desechó a todos los animales supervivientes de la fase de búsqueda de intervalo de dosis. No se realizaron necropsias en ninguno de los animales de la fase de búsqueda de intervalo de dosis. Todos los animales del estudio principal recibieron una exploración completa de la necropsia según los procedimientos  
20 aprobados por un anatomopatólogo veterinario. Al finalizar el estudio, todos los animales supervivientes del estudio principal fueron sacrificados mediante inhalación de dióxido de carbono y exanguinación a través de la vena cava abdominal.

A cada animal se le exploró cuidadosamente para detectar anomalías externas, incluidas masas. Se separó la piel desde una incisión media ventral y se identificaron todas las anomalías subcutáneas y se correlacionaron con los  
25 hallazgos previos a la muerte. Las cavidades abdominal, torácica y craneal se exploraron en busca de anomalías y se extrajeron y examinaron todos los órganos. Se registraron todas las anomalías. No se guardó ningún tejido y se desecharon las carcasas.

*Estadística:*

30 Cuando sea adecuado, la DL<sub>50</sub> y la DL<sub>10</sub> y sus límites de confianza del 98 % se calcularon usando el procedimiento Probit (SAS Institute, Inc. SAS/STAT® User's Guide, Versión 6, Cuarta Edición, Volumen 2. Cary NC: SAS Institute; 1989) en SAS® (grupos tratados en el estudio principal).

Los sistemas informáticos usados durante la realización de este estudio se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13**

Sistemas informáticos	
Sistema in-life	Provantis™
Aleatorización:	Provantis™
Patología	Provantis™
Análisis estadísticos:	SAS
Notificación:	SAS y Microsoft Office Professional

*Resultados:*

35 Los datos siguientes son los resultados de la fase definitiva del estudio principal.

En la Tabla 14 que figura a continuación se presenta un resumen de los resultados de mortalidad. Los resultados de mortalidad generalmente exhiben un típico efecto de dosis-respuesta, siendo la sal de lisina de IPM ligeramente más tóxica en hembras que en machos. El grupo control con el compuesto parental IPM exhibió la mortalidad prevista, así como mayor toxicidad en hembras que en machos, lo que se correlaciona con los datos disponibles de estudios  
40 previos.

Tabla 14

Mortalidad por día de estudio y acumulada																			
Día del estudio (Machos/Hembras)																			
Nivel de dosis (mg/kg)	1 a 5		6		7		8		9		10		11		12 a 14		Mortalidad acumulada		Total
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	
150 <sup>a</sup>	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1/5	4/5	5/10
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0/5	0/10
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	0/5	0/10
100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1/5	0/5	1/10
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1 <sup>b</sup>	0/5	3/5	3/10
300	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4/5	5/5	9/10
400	0	0	0	4	3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5/5	5/5	10/10
500	0	0	4	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	5/5	10/10
600	0	0	3	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	5/5	10/10

<sup>a</sup> Compuesto parental control

<sup>b</sup> Muerte producida el día 12

M – H- Hembras

Machos

La DL<sub>10</sub> intravenosa de la sal de lisina de IPM se calculó en 133 mg/kg (límites de confianza del 95 % de 65 a 172) en ratones (sexos combinados), mientras que la DL<sub>50</sub> intravenosa se calculó en 220 mg/kg (límites de confianza del 95 % de 184 a 265 mg/kg).

- 5 Los valores de la DL<sub>10</sub> para machos y hembras por separado fueron 140 y 179 mg/kg, respectivamente (límites de confianza del 95 % de 12 a 199 mg/kg para machos, no pudieron calcularse para las hembras), mientras que los valores de la DL<sub>10</sub> para machos y hembras fueron 247 y 197 mg/kg, respectivamente (límites de confianza del 95 % de 187 a 330 para machos; no pudieron calcularse para las hembras).

- 10 No se observaron hallazgos macroscópicos relacionados con el tratamiento en ningún sexo en las observaciones posteriores a la muerte.

#### Conclusiones:

- 15 Los resultados de mortalidad generalmente exhibieron un típico efecto de dosis-respuesta, siendo la sal de lisina de IPM ligeramente más tóxica en hembras que en machos. Ningún animal murió a la dosis de 50 o 75 mg/kg, 1 de 10 animales murió a 100 mg/kg, 3 de 10 animales murieron a 200 mg/kg, 9 de 10 animales murieron a 300 mg/kg, y todos los animales murieron a 400, 500, y 600 mg/kg. El grupo control del compuesto parental de IPM exhibió la mortalidad prevista (5 de 10 animales murieron), así como una mayor toxicidad en hembras que en machos, lo que se correlaciona con los datos disponibles de estudios previos. El inicio de la muerte en el estudio se retrasó ligeramente, produciéndose las primeras mortalidades el día 6 y las últimas el día 12. En general, los signos clínicos que reflejan el estado de deterioro de los ratones antes de la muerte se observaron en ambos sexos. Estos signos clínicos incluyeron la agonía, la disminución de la actividad, el incremento de la actividad, inflamación (cola/nariz/hocico y/o cara), respiración rápida/lenta/poco profunda/difícil/audible, temblores, piel fría al tacto, aspecto descuidado, postura encorvada, alteración de la función de las extremidades, decoloración del pelaje en las regiones dorsal y/o anogenital, heces pocas/ausentes y disminución de la micción. Se observaron disminuciones relacionadas con el tratamiento en la ganancia media de peso corporal, o, en muchos casos, la pérdida de peso corporal, en los animales supervivientes el día 7, con al menos una recuperación parcial para el día 14 en los animales supervivientes al finalizar el estudio. No se observaron hallazgos macroscópicos relacionados con el tratamiento en la necropsia.
- 20
- 25

En base a la enfermedad y los hallazgos de este estudio, la DL<sub>10</sub> intravenosa de la sal de lisina de IPM se calculó en 133 mg/kg (límites de confianza del 95 % de 65 a 172) en ratones (sexos combinados), mientras que la DL<sub>50</sub> intravenosa se calculó en 220 mg/kg (límites de confianza del 95 % de 184 ° 265 mg/kg).

### Ejemplo 7

- 5 En este ejemplo se resumen los resultados de extensos datos preclínicos para la toxicidad de la IPM y su sal de lisina. Estos datos se usan para diseñar los regímenes de dosificación para ensayos clínicos humanos.

La toxicidad de la IPM y su sal de lisina se han investigado mediante estudios preclínicos agudos y subagudos usando ratones, ratas y perros. Se han estudiado dosis únicas de administración oral, intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP) para IPM en ratones y ratas. Se han estudiado dosis múltiples de administración por vía IV e IP en ratones y perros. Las dosis intravenosas subagudas (3 días) en ratones y perros ha proporcionado la información toxicológica/farmacocinética sobre toxicidades y alteraciones farmacológicas que se usaron en el diseño de la administración y calendarios de dosis en seres humanos. Las dosis IV subagudas (3-día) con la sal de lisina de IPM se realizaron en ratones.

15 En base a los resultados del estudio de búsqueda de intervalo de dosis se requirieron dosis mayores de IPM para producir una mortalidad mayor a la prevista. Para ratas, los valores de DL<sub>50</sub> oral se calcularon en 4443 mg/kg para machos, 2786 mg/kg para hembras y 3560 mg/kg para ambos sexos combinados. En cada caso se pudieron calcular los límites de confianza del 95 %.

20 Para ratones, los valores de DL<sub>50</sub> oral se calcularon en 1.014 mg/kg para machos, (límites de confianza del 95 %), 1962 mg/kg para hembras (límites de confianza del 95 % 1523-2983 mg/kg) y 1432 mg/kg para ambos sexos combinados (límites de confianza del 95 % 1128-1742 mg/kg).

25 Para ratas, los valores de DL<sub>50</sub> para dosis intravenosas únicas se calcularon en 567 mg/kg para machos, 400 mg/kg para hembras y 428 mg/kg para ambos sexos combinados. En cada caso no se pudieron calcular los límites de confianza del 95 %. Para ratones, los valores de DL<sub>50</sub> intravenosa se calcularon en 929 mg/kg para machos, (límites de confianza del 95 %), 484 mg/kg para hembras (límites de confianza del 95 % 72-1.364 mg/kg) y 688 mg/kg para ambos sexos combinados (límites de confianza del 95 % 3981.366 mg/kg).

La administración de IPM por vía IP e IV sí dio como resultado muertes agudas en ratones, ratas y perros. La administración oral en ratones y ratas también se evaluó y se determinaron los valores de DL<sub>50</sub> en el intervalo de 1,4-3,5 g/kg para estas especies de roedores. Los síntomas de toxicidad intravenosa aguda en ratones, ratas y perros incluyeron disminución del apetito, diarrea, disminución de la actividad y muerte.

30 Las dosis aceptables de los estudios de dosificación de tres (3) días fueron significativamente diferentes del calendario de dosis únicas. Se evaluaron los efectos del fármaco sobre la médula ósea, el bazo y las funciones tubulares renales. El impacto de la IPM sobre estos órganos parece contribuir a la causa de la muerte en estas dos especies. A continuación se presenta un resumen.

35 Un estudio IV subagudo de IPM en ratones proporcionó información en cuanto a los valores de DL<sub>10</sub> y la toxicidad que se podrían producir en seres humanos. Los resultados de mortalidad mostraron un típico efecto de dosis-respuesta, siendo la IPM ligeramente más tóxica en hembras que en machos.

40 La DL<sub>10</sub> intravenosa de IPM se calculó en 119 mg/kg (con límites de confianza del 95 % de 87 – 134 mg/kg) en ratones (sexos combinados), mientras que la DL<sub>50</sub> intravenosa se calculó en 149 mg/kg (con límites de confianza del 95 % de 132 -169 mg/kg). Los valores de DL<sub>10</sub> para machos y hembras por separado fueron de 168 y 125 mg/kg respectivamente, mientras que los valores de DL<sub>50</sub> para machos y hembras fueron 173 y 132 respectivamente. En cada caso no se pudieron calcular los límites de confianza del 95 %.

El estudio subagudo de la sal de lisina de IPM incluyó un total de 40 ratones macho y 40 hembras (Crl: CD-1(1CR)BR) de un peso de 24,8 a 29,1 g y de 21,5 y 24,2 g, respectivamente en la aleatorización) fueron tratados con dosis de 50 a 600 mg/kg IV al día x 3 días (Tabla 8.8).

45 Para la sal de LYS de IPMA, la DL<sub>10</sub> intravenosa de IPM para el estudio con ratones de 3 días se calculó en 133 mg/kg (con límites de confianza del 95 % de 65 – 172 mg/kg) (sexos combinados), mientras que la DL<sub>50</sub> intravenosa fue 220 mg/kg (con límites de confianza del 95 % de 184 265 mg/kg (para sexos combinados)). Los valores de DL<sub>10</sub> para machos y hembras por separado fueron de 140 y 179 mg/kg (límites de confianza del 95 % de 12 a 199 mg/kg en machos; no se pudieron calcular para las hembras). Los valores de DL<sub>50</sub> para machos y hembras fueron de 247 y 197 mg/kg respectivamente (límites de confianza del 95 % de 187 a 330 mg/kg en machos; no se pudieron calcular para las hembras).

55 La sal de lisina de IPM generalmente mostró un típico efecto de dosis-respuesta, siendo ligeramente más tóxica en hembras. Ningún ratón murió a la dosis de 50, 75 o 200 mg/kg, 1 de 10 animales murió a 100 mg/kg, 9 de 10 animales murieron a 300 mg/kg y todos los animales murieron a 400, 500, y 600 mg/kg. El grupo control del compuesto parental de IPM exhibió la mortalidad prevista, así como una mayor toxicidad en hembras que en

machos, lo que se correlaciona con los datos disponibles de estudios previos. El inicio de la muerte en el estudio se retrasó ligeramente, produciéndose las primeras mortalidades el día 6 y las últimas el día 12. En general, los signos clínicos que reflejan el estado de deterioro de los ratones antes de la muerte se observaron en ambos sexos.

- 5 En base a los hallazgos de la exploración microscópica, la IPM administrada sola o como la sal de lisina IV a diario durante tres días produjo depleción de médula ósea, necrosis tubular renal o una combinación de ambos relacionados con el tratamiento y se consideraron la causa de la muerte. Para IPM, había depleción intensa de médula ósea en machos a 178 mg/kg y mayor y en hembras a 133 mg/kg y mayor. La necrosis tubular renal se produjo en machos a 237 mg/kg y mayor y en hembras a 133 mg/kg y mayor. Además, se observó depleción linfocítica esplénica en la mayoría de los machos y en todas las hembras que murieron durante el estudio. No se observaron hallazgos microscópicos obvios relacionados con el tratamiento en ningún sexo a 75 mg/kg. Se observaron signos clínicos generalmente secundarios al estado de deterioro de los ratones antes de la muerte, pero ninguna prueba clara de efectos sobre el peso corporal en los ratones supervivientes al finalizar el estudio.

La DL<sub>10</sub> intravenosa para mostaza de ifosforamida (IPM) y su sal de lisina administrada a diario durante tres días se calculó en 119 mg/kg vs. 133 mg/kg, respectivamente, con una DL<sub>50</sub> de 149 mg/kg vs. 220 mg/kg, respectivamente.

- 15 Se han realizado estudios de toxicidad aguda y subaguda en roedores y perros con IPM y su sal de lisina. Estos estudios también se han usado para desarrollar dosis de partida aceptables en investigaciones con seres humanos. Un resumen de los datos de toxicidad en roedores y perros para administración IV de IPM se registra en la Tabla 15 y un resumen de los datos de toxicidad para administración IV de IPM(LYS)<sub>2</sub> se registra en la Tabla 16.

**Tabla 15**

<b>Resumen de la experiencia del tratamiento intravenoso -IPM</b>					
Nº y especie	Dosis, pauta y duración	Dosis total de IPM (mg)	IPM en plasma.	Eficacia	DL <sub>50</sub> de seguridad (mg/kg)
47 ratas	400-2.000 mg/kg; iv x 1d	81,6 - 650	No analizado	No analizado	428
40 ratones	100-1.200 mg/kg; iv x 1d	3,2 - 36	No analizado	No analizado	688
80 ratones	75-562 mg/kg; iv al día x 3 días	5,7 – 60,6	No analizado	No analizado	149
14 perros	1-100 mg/kg/d; iv al día x 3 días	22,5 - 2130	100 mg/kg/día x 3 días (C <sub>mzx</sub> 25-78 mcg/ml)	No analizado	1-5 mg/kg/día x 3 días (100% Supervivencia)

20

**Tabla 16**

<b>Sal de lisina de IPM intravenosa</b>					
Nº y especie	Dosis, pauta y duración	Dosis total de IPM (mg)	IPM en plasma.	Eficacia	DL <sub>50</sub> de seguridad (mg/kg)
80 ratones	50-600 mg/kg; iv al día x 3 días	4,3 - 80	No analizado	No analizado	220

La DMO de IPM para perros fue mg/kg/día x 3 días y una dosis de partida correspondiente en seres humanos de 100 mg/m<sup>2</sup> al día durante tres (3) días debería ser un punto de partida seguro. Para IPM(LYS)<sub>2</sub>, la DL<sub>10</sub> para el

calendario de tres (3) días de dosis intravenosas en ratones se calculó en 133 mg/kg/día x 3 días. La IPM•(LYS)<sub>2</sub> se considera que es un agente alquilante mínimamente tóxico con un agudo intervalo terapéutico. En base a mg/kg, la dosis tóxica media (DTM) en seres humanos para la sal de lisina se estima que es 1/10 de la DL10 en ratones o de 40 mg/m<sup>2</sup>/día.

- 5 Las dosis IV humanas comparables estimadas se registran en la Tabla 17.

**Tabla 17**

<b>Dosis intravenosas humanas comparables estimadas</b>			
<b>Fármaco</b>	<b>Especie</b>	<b>DL<sub>10</sub> IV subaguda</b>	<b>Dosis IV humana comparable</b>
IPM	Ratón	119 mg/kg/d	30 mg/m <sup>2</sup> /d
IPM	Perro	5 mg/kg/d	100 mg/m <sup>2</sup> /d
Sal de lisina de IPM	Ratón	133 mg/kg/d	40 mg/m <sup>2</sup> /d

**Ejemplo 8**

Este ejemplo describe el tratamiento del cáncer en sujetos humanos que tienen cáncer de ovarios metastásico.

- 10 El sujeto se trata con 500 mg/m<sup>2</sup> de IPM al día durante tres días consecutivos mediante infusión intravenosa. Los electrolitos en suero, como fósforo y cloro, se corrigen con electrolitos complementarios, que se interrumpen tras siete días. Los niveles de BUN y creatinina se monitorizan en los límites normales.

**Ejemplo 9**

Este ejemplo describe los resultados del tratamiento de sujetos humanos con IPM•(LYS)<sub>2</sub>. Hasta la fecha se han tratado con IPM•(LYS)<sub>2</sub> cuatro (4) pacientes con cáncer avanzado.

- 15 La dosis inicial de la sal de lisina de IPM fue 30 mg/m<sup>2</sup> administrados por vía intravenosa durante tres (3) días. Un paciente (cohorte) se trató por escalada de dosis cada 21-28 días para permitir la presentación de toxicidad. Las dosis se aumentaron en un 40 % si no se produjeron acontecimientos tóxicos graves. Se han tratado cuatro pacientes, uno a cada dosis, 30, 42, 59 y 83 mg/m<sup>2</sup> por vía de administración IV durante 3 días sin una toxicidad grave. Un paciente con cáncer rectal presentó estabilización de su enfermedad tras la administración de 83 mg/m<sup>2</sup>
- 20 de IPM•(LYS)<sub>2</sub> por vía de administración IV durante 3 días.

**Ejemplo 10**

Este ejemplo describe el tratamiento de cáncer de pulmón amicrocítico que ha progresado a adenocarcinoma infiltrante moderadamente diferenciado. El estado de la enfermedad puede confirmarse mediante TAC.

- 25 La sal de lisina de mostaza de isofosforamida se administra a 350 mg/m<sup>2</sup> al día durante tres días consecutivos por vía intravenosa. Tras un periodo de descanso de 21 días se repitió una vez el protocolo del tratamiento de tres días. Durante los tratamientos se monitorizaron diariamente los análisis hematológicos y de bioquímica en sangre. El estado del cáncer se monitoriza mediante TAC.

**Ejemplo 11**

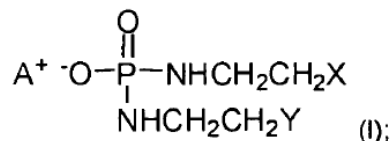
Este ejemplo demuestra el efecto de la formación de una sal de amina sobre la estabilidad del compuesto.

- 30 Las muestras de la mostaza de isofosforamida y su sal de lisina se almacenaron en condiciones variables y se analizó su pureza. Los resultados se presentan en la tabla siguiente.

Compuesto	0 meses	1 mes	3 meses	1 año
IPM, -23 °C	97 %	88 %	70 %	
IPM-LYS, -23 °C	98 %		98 %	100 %
IPM-LYS, ambiente	98 %	98 %	65 %	

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una sal de la fórmula:



- 5 en la que A<sup>+</sup> representa BH<sup>+</sup> y B es una amina seleccionada de los aminoácidos básicos piridina, *N,N*-dimetilaminopiridina, diazabicyclononano, diazabicycloundeceno, *N*-metil-*N*-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, mono-, bis- o tris- (2-hidroxietyl) amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxietyl)metilamina, *N,N*-dimetil-*N*-(2-hidroxietyl)amina, tri-(2-hidroxietyl)amina y *N*-metil-*D*-glucamina.
- en la que X e Y representan de forma independiente grupos salientes; y
- 10 en la que la sal de fórmula (I) tiene una semivida a temperatura ambiente en presencia de agua que es igual o mayor a dos veces la de la mostaza de isofosforamida en las mismas condiciones.
2. Una composición de la reivindicación 1, en la que la sal de fórmula (I) tiene una semivida que es igual o mayor a cinco veces la de la mostaza de isofosforamida.
3. Una composición de la reivindicación 1 o 2, en la que B es tris(hidroxietyl)metilamina.
4. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que X e Y son halógeno.
- 15 5. Una composición de la reivindicación 4, en la que X e Y son Cl.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que B es lisina.
7. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hiperproliferativo.
- 20 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para usar para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno hiperproliferativo.
9. El uso de la reivindicación 7, en el que el trastorno hiperproliferativo comprende cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, retinoblastoma, cáncer de estómago, cáncer testicular o tumor de Wilms.
- 25 10. La composición de la reivindicación 8, en la que el trastorno hiperproliferativo comprende cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, neuroblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, retinoblastoma, cáncer de estómago, cáncer testicular o tumor de Wilms.
- 30 11. El uso de la reivindicación 7, en el que el trastorno hiperproliferativo comprende un adenocarcinoma, melanoma, tumor cutáneo, sarcoma, leucemia o linfoma.
- 35 12. El uso de la reivindicación 7, en el que el trastorno hiperproliferativo comprende un tumor de ovarios, de mama, de pulmón, de próstata o rectal.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que el trastorno hiperproliferativo comprende un tumor de pulmón y el tumor de pulmón es un tumor canceroso amicrocítico o microcítico.
- 40 14. El uso de la reivindicación 13, en el que el tumor de pulmón es un tumor canceroso amicrocítico.



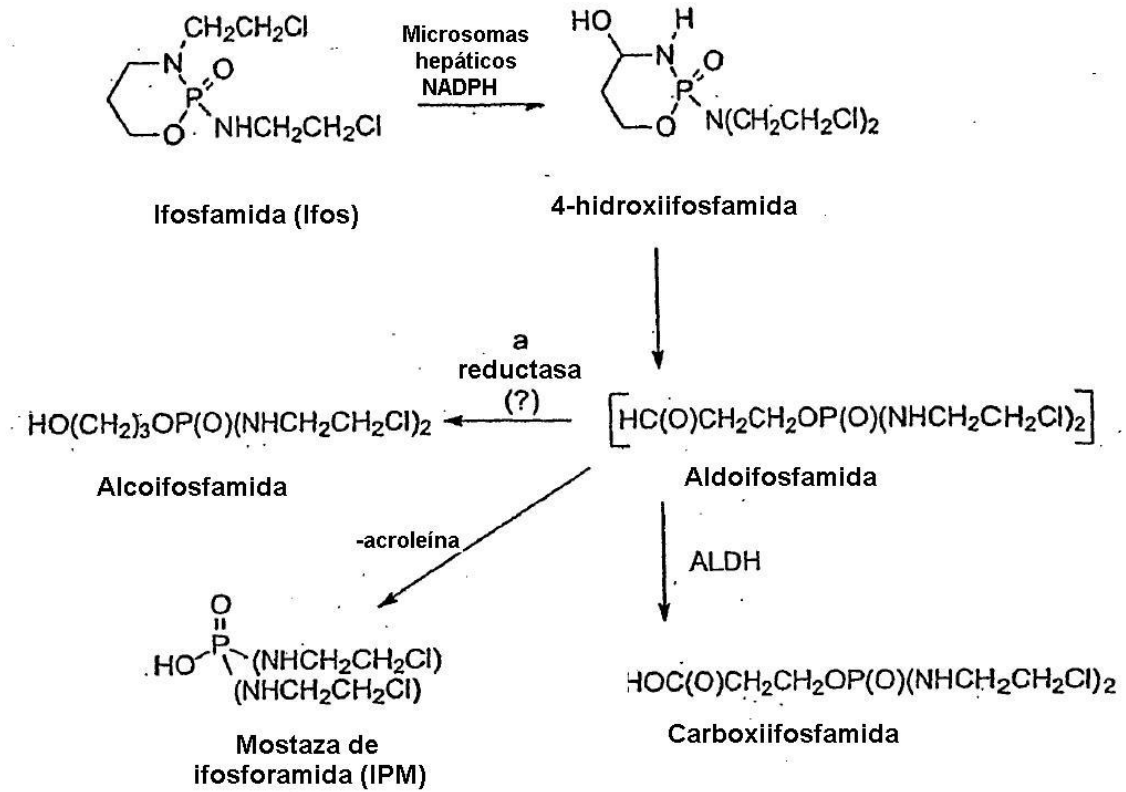


FIG. 1

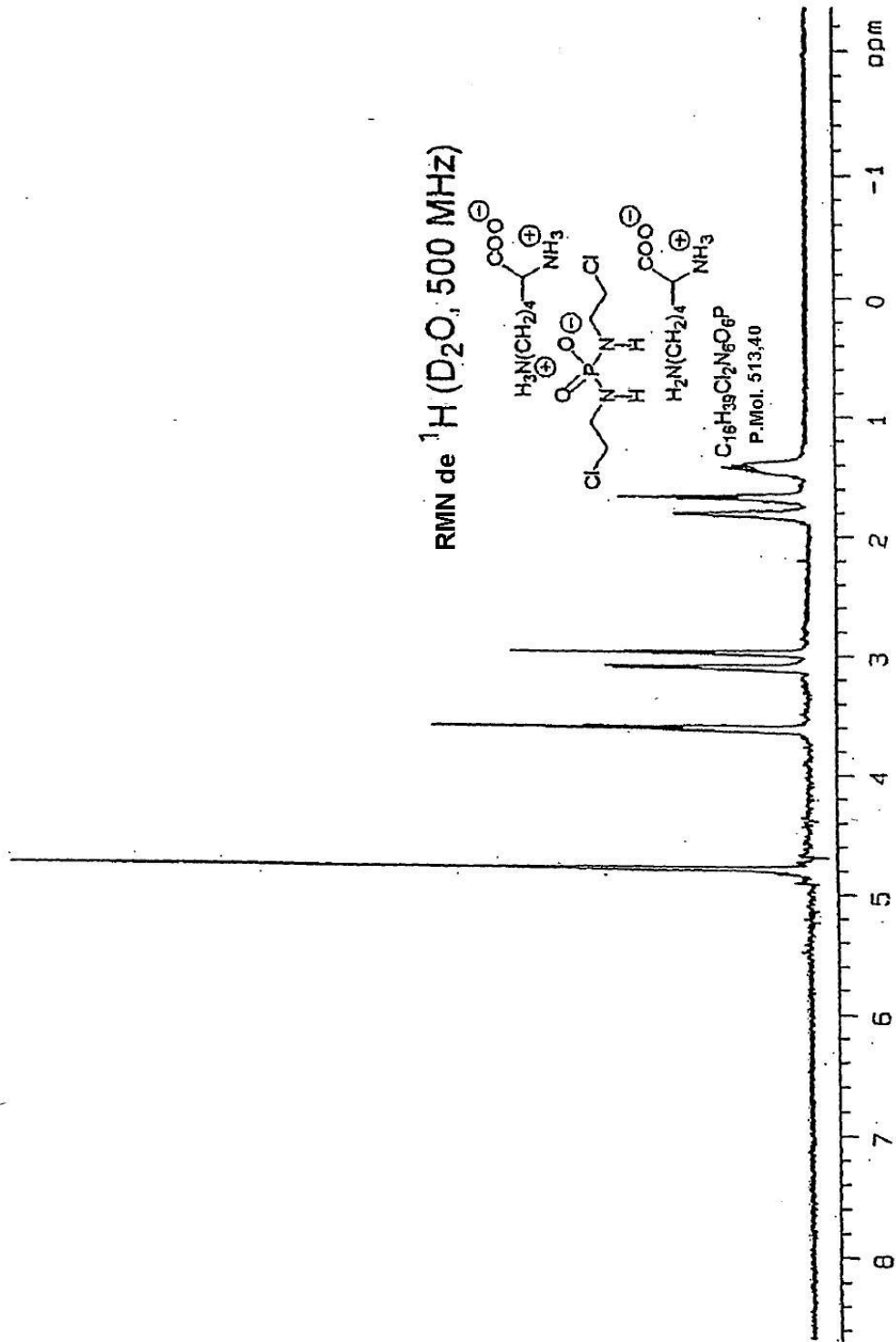


FIG. 2

FIG. 3

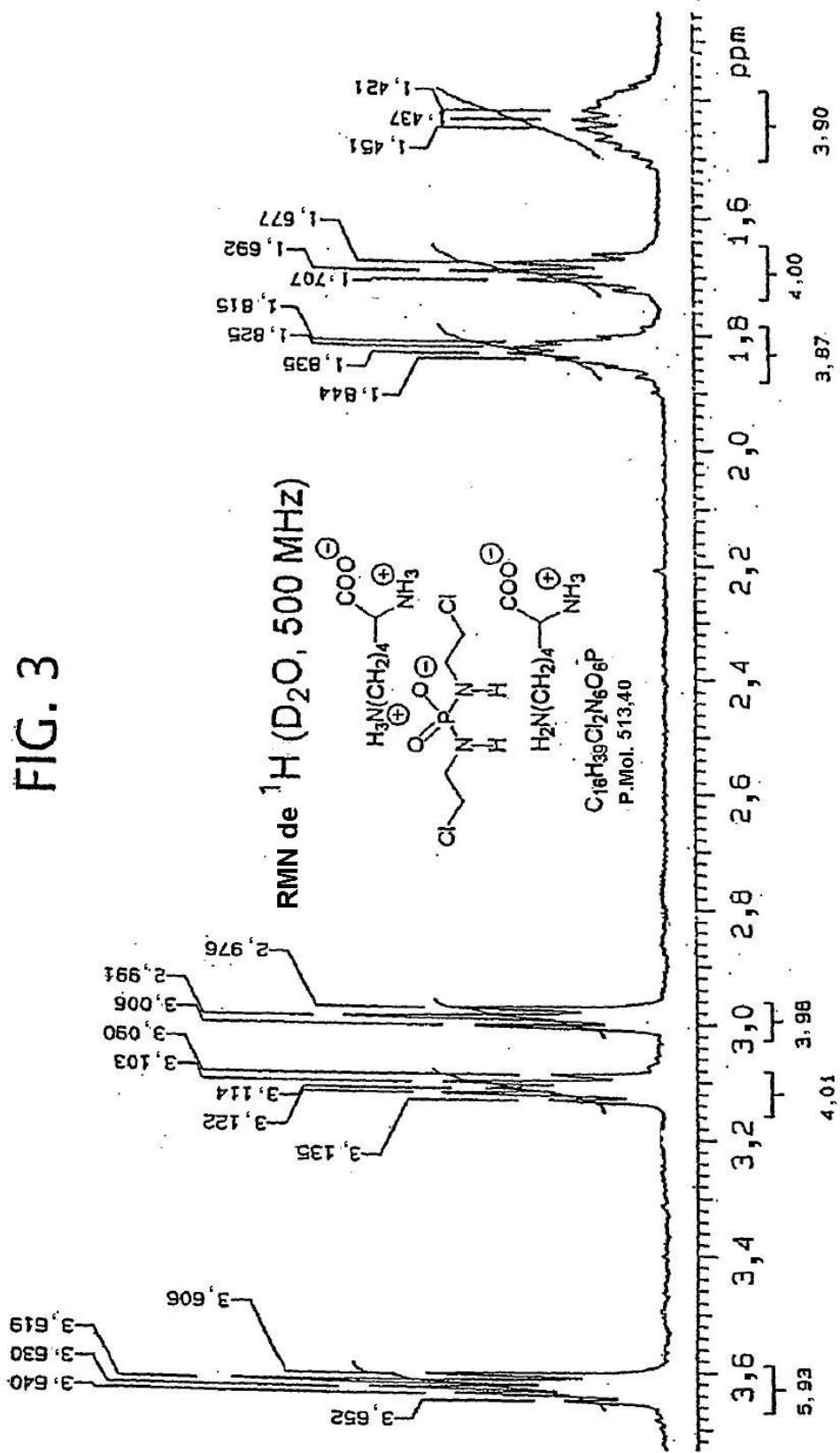


FIG. 4

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz)

