

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 670**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/38** (2006.01)  
**C07F 9/547** (2006.01)  
**C07F 9/576** (2006.01)  
**C07F 9/6512** (2006.01)  
**C07F 9/6509** (2006.01)  
**C07F 9/6558** (2006.01)  
**C07H 15/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2011 E 11738732 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2601202**

54 Título: **Fármacos dobles de bisfosfonato dirigidos al hueso**

30 Prioridad:

**04.08.2010 EP 10171886**

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

**28.10.2014**

73 Titular/es:

**SCHOTT, HERBERT (100.0%)**  
**Hartmeyerstr. 14**  
**72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHOTT, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 514 670 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

Fármacos dobles de bisfosfonato dirigidos al hueso

- 5 La presente invención se refiere a nuevos fármacos dobles de bisfosfonato, métodos para preparar dicho compuesto; composiciones farmacéuticas que contienen el mismo; así como al uso de dichos compuestos en medicina humana y veterinaria y, en particular, para tratar tumores, infecciones virales, o trastornos dentales.

### Antecedentes en la técnica

- 10 Los 1-hidroxibisfosfonatos (BP) son análogos de pirofosfato donde la unión P-O-P está reemplazada por P-C-P. El átomo de carbono contiene el grupo 1-hidroxilo y una cadena lateral variable<sup>1</sup>. El enlace P-C-P es relativamente estable frente a la hidrólisis química y enzimática. La potente afinidad de enlace hacia los huesos se usa en medicina para el tratamiento en reabsorción ósea y otros trastornos óseos tales como osteoporosis u osteolisis inducida por tumores<sup>2,3</sup>. Los huesos son los sitios más habituales para la metástasis en pacientes con tumores sólidos que provienen de mama, próstata, pulmón, tiroides y riñón<sup>4</sup>. El uso de los BP ha tenido un profundo efecto beneficioso en la gestión de enfermedades óseas metastásicas y en la prevención de la pérdida ósea inducida por tratamientos<sup>5</sup>. Los BP también se han investigado por su uso potencial en enfermedades parasitarias<sup>6,7</sup>. Los BP se unen fuertemente a la hidroxiapatita y se han sugerido como vectores para dirigirse a los huesos en diversos agentes de contraste específicos de tejidos<sup>8-12</sup>. Se han aplicado complejos de iones metálicos radiactivos con BP en radioterapia de cáncer óseo y en los ajustes paliativos para la terapia del dolor asociada con metástasis ósea<sup>13</sup>. Los enfoques para la dirección quimioterapéutica ósea de citostáticos o proteínas han propuesto la conjugación de metotrexato<sup>14,15</sup>, doxorubicina<sup>16</sup> o albúmina<sup>17</sup> con los BP. Los estudios recientes han sugerido que los BP tienen efectos directos en las células tumorales y pueden mejorar las actividades antitumorales de los citostáticos<sup>18-27</sup>. Se ha ensayado la utilidad potencial de los BP etidronato y zoledronato en la disminución o prevención de reabsorción radicular inflamatoria y reabsorción radicular de reemplazo en piezas dentales de reemplazo. Se ha mostrado que el zoledronato previene la reabsorción radicular y facilita la regeneración de los tejidos periodontales después de la reimplantación<sup>40</sup>.
- 30 De acuerdo con el documento de Patente US 2009/227544 A1, los derivados anticancerígenos que se pueden conjugar con los bisfosfonatos incluyen 5-fluorouracilo, citarabina, cisplatino, doxorubicina, epirubicina, estreptozocina.

- 35 Los análogos de nucleósido terapéuticos tales como 2'-desoxi-5-fluorouridina (5-FdU), arabinofuranosil citidina (araC) y azidotimidina (AZT) son compuestos bien conocidos y su actividad como fármacos antivirales y antitumorales está bien establecida desde hace numerosos años. Hasta la fecha, no se ha sugerido la dirección a los huesos de estos compuestos.

- 40 Existe la necesidad continuada de fármacos adicionales que permitan el tratamiento dirigido de enfermedades relacionadas con los huesos como, por ejemplo, tumores óseos o tumores óseos metastásicos.

### Sumario de la invención

- 45 El problema a solucionar por la presente invención es, por lo tanto, la provisión de un nuevo tipo de fármacos adecuado para dirección a los huesos.

- 50 Sorprendentemente, dicho problema se podría solucionar mediante la provisión de compuestos de pirimidina derivatizados específicamente con bisfosfonatos, como se describe adicionalmente con mayor detalle posteriormente y en las reivindicaciones.

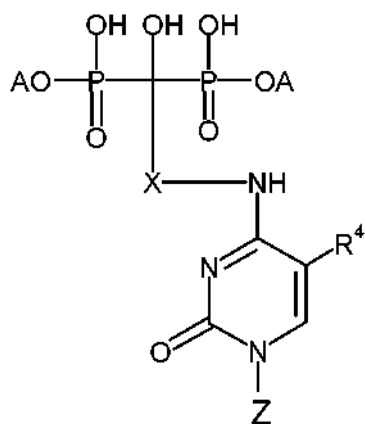
- 55 En particular, se unieron covalentemente aminobisfosfonatos (alendronato, pamidronato) en una síntesis de tres etapas, con derivados protegidos y triazolizados de análogos de nucleósido usados como agentes quimioterapéuticos (5-FdU, AZT, araC) por sustitución de su resto triazolilo. A partir de las mezclas de reacción desprotegidas y purificadas cromatográficamente, se obtuvieron nucleósidos de N<sup>4</sup>-[alquil-(hidroxifosfono)fosfonato]-citosina que combinan dos compuestos activos antitumorales diferentes.

- 60 El nuevo tipo de fármacos dobles puede hacer posible la dirección a los huesos debido a su resto bisfosfonato. Se espera que el metabolismo de los fármacos dobles produzca diferentes compuestos activos citostáticos con efecto antitumoral aditivo o sinérgico. Los ensayos iniciales *in vitro* de múltiples líneas celulares tumorales con 1 5FdU-alendronato mostraron sorprendentemente inhibición del crecimiento variable de 11 líneas de células tumorales.

### Realizaciones particulares de la invención

- 65 La presente invención se refiere a las siguientes realizaciones particulares:

1. Bisfosfonato de fórmula general I

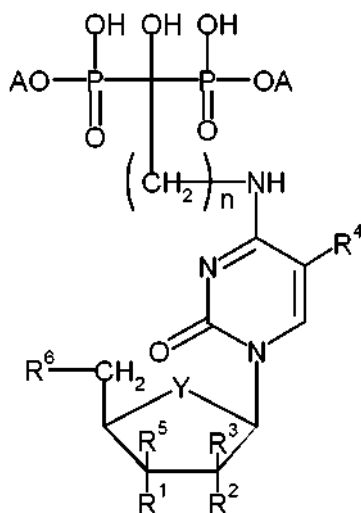


(I)

donde los parámetros independientemente los unos de los otros o en combinación tienen los siguientes significados:

- 5 los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón o un catión metálico monovalente;  
 X representa un puente alquileo de cadena lineal o ramificado, en particular alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 Z representa H o un anillo carbo o heterocíclico de 5 o 6 miembros, en particular heterocíclico de 5 miembros, opcionalmente mono o polisustituido, y  
 10 R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, trifluorometilo, alquilo lineal o ramificado, alcoxilo lineal o ramificado, o bromovinilo; en particular hidrógeno, halógeno, o alquilo lineal o ramificado.

2. El compuesto de la realización 1 de fórmula general Ia



(Ia)

donde los parámetros independientemente los unos de los otros o en combinación tienen los siguientes significados:

- 15 los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón, o un catión metálico monovalente;  
 Y representa O o S, en particular O;  
 n representa un número entero de 1, 2, 3 o 4, en particular 2 o 3;  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup> independientemente los unos de los otros representan hidrógeno, halógeno, fluorometileno, hidroxilo, azido, ciano, alcoxilo lineal o ramificado, acilo, alquilino inferior, en particular hidrógeno, hidroxilo, halógeno, azido, o alquilino inferior;  
 25 R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, trifluorometilo, alquilo lineal o ramificado, alcoxilo lineal o

ramificado o bromovinilo, en particular hidrógeno, halógeno, o alquilo lineal o ramificado;

R<sup>6</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, fosfato, alquilo lineal o ramificado, alcoxilo lineal o ramificado o acilo, en particular hidroxilo o acilo.

5 3. El compuesto de la realización 2, donde los parámetros independientemente los unos de los otros o en combinación tienen los siguientes significados:

los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón, o un catión metálico alcalino;

Y representa O;

10 n representa un número entero de 2 o 3;

R<sup>1</sup> representa hidrógeno, halógeno, azido o hidroxilo;

R<sup>2</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno o hidroxilo

R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, o alquilo lineal o ramificado;

15 R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo inferior; y

R<sup>6</sup> representa hidroxilo o acilo.

4. El compuesto de la realización 2 o 3, donde los parámetros independientemente los unos de los otros o en combinación tienen los siguientes significados:

20 los restos A representan independientemente los unos de los otros Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;

Y representa O;

n representa un número entero de 2 o 3;

25 R<sup>1</sup> representa azido o hidroxilo;

R<sup>2</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno o hidroxilo

R<sup>4</sup> representa hidrógeno, fluoro o metilo;

R<sup>5</sup> representa hidrógeno o etinilo; y

30 R<sup>6</sup> representa hidroxilo.

5. Un compuesto de cualquiera de las realizaciones precedentes para uso en medicina humana y animal.

6. Un compuesto de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de tumores o infecciones virales.

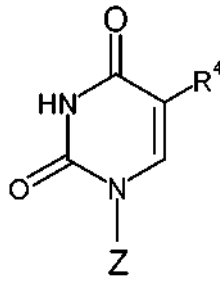
35 7. Un compuesto de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de tumores óseos, incluyendo tumores óseos metastásicos.

40 8. Un compuesto de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 para uso en curación dental, en particular en el tratamiento o la prevención de trastornos dentales, como trastornos inflamatorios, tales como reabsorción radicular inflamatoria o reabsorción radicular de reemplazo en piezas dentales reimplantadas; o regeneración del tejido periodontal después de reimplantación de piezas dentales; o en periodoncia o cirugía oral, en particular para la estabilización de piezas dentales y el mantenimiento de piezas dentales. Por ejemplo, se puede aplicar un compuesto de la presente invención (por ejemplo por vía tópica) en la pieza dental o en la mandíbula con el fin de estabilizar la pieza dental y/o el tejido óseo.

50 9. Composición farmacéutica que comprende en un vehículo farmacéuticamente aceptable al menos un compuesto de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 opcionalmente en combinación con al menos un ingrediente terapéuticamente activo adicional.

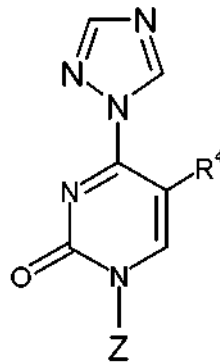
10. Método de preparación de un compuesto de fórmula general I como se define en la realización 1, comprendiendo el método

55 a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula general II



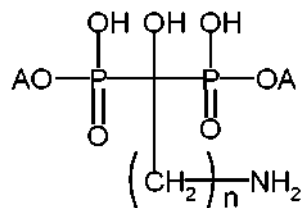
(II)

5 donde Z y R<sup>4</sup> son como se han definido anteriormente, con la condición de que si cualquiera de los restos Z y R<sup>4</sup> contiene un grupo hidroxilo dicho grupo hidroxilo es un grupo hidroxilo protegido, con triazol para formar un compuesto de fórmula III



(III)

10 b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula III con un aminofosfonato de fórmula general IV

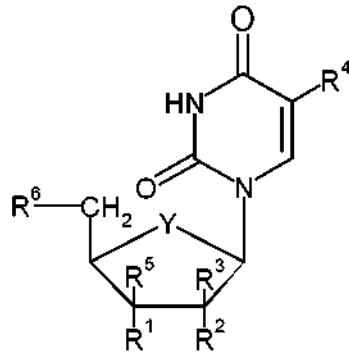


(IV)

c) y aislar el producto deseado opcionalmente después de retirar cualquier grupo protector.

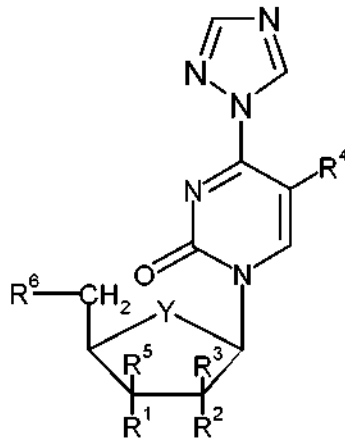
15 11. Método de preparación de un compuesto de fórmula general Ia como se define en cualquiera de las realizaciones 2 a 4, comprendiendo el método

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula general IIa



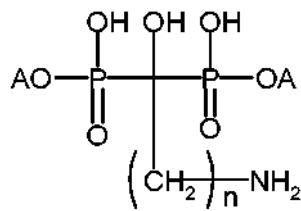
(IIa)

5 donde Y y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son como se han definido anteriormente, con la condición de que si cualquiera de los restos R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> fuera un grupo hidroxil dicho grupo es un grupo hidroxil protegido, con triazol para formar un compuesto de fórmula IIIa



(IIIa)

10 b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIIa con un aminofosfonato de fórmula general IV



(IV)

c) y aislar el producto deseado opcionalmente después de retirar cualquier grupo protector.

15 12. El método de la realización 10 u 11, donde el compuesto de aminofosfonato se selecciona entre alendronato y pamidronato.

## Descripción de realizaciones y aspectos adicionales de la invención

### 1. Definiciones

5 A menos que se indique otra cosa se aplicarán las siguientes definiciones:

"Cationes metálicos monovalentes" comprende cationes de metales alcalinos, en particular Na y K.

Un grupo "fosfonato" está representado por la fórmula  $(-\text{PO}_3)^2$  (unido a un compuesto químico); y comprende las formas protonadas correspondientes así como las formas salinas con cationes metálicos monovalentes.

10 Un "puente alquileo de cadena lineal o ramificado" es un grupo hidrocarburo lineal o ramificado que forma un puente que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono, y también se puede denominar grupo "alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>". Como ejemplos de tales grupos se pueden mencionar: metileno, 1,2-etileno, 1,2- y 1,3-propileno, 1,2-, 1,3-, 2,3- y 1,4-butileno, 1,5-pentileno, 1,6-hexileno e isómeros constitucionales de los mismos. En particular se pueden mencionar: -CH<sub>2</sub>-CH(Met)-, -CH(Met)-CH<sub>2</sub>-, -CH(Met)-CH(Met)-, -C(Met)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(Met)<sub>2</sub>-, -C(Met)<sub>2</sub>-CH(Met)-, -CH(Met)-C(Met)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH(Et)-, -CH(Et)-CH<sub>2</sub>-, -CH(Et)-CH(Et)-, -C(Et)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(Et)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH(n-Prop)-, -CH(n-Prop)-CH<sub>2</sub>-, -CH(n-Prop)-CH(Met)-, -CH<sub>2</sub>-CH(n-Bu)-, -CH(n-Bu)-CH<sub>2</sub>-, -CH(Met)-CH(Et)-, -CH(Met)-CH(n-Prop)-, -CH(Et)-CH(Met)-, -CH(Met)-CH(Et)-, donde Met es metilo, Et es etilo, n-Prop es n-propilo y n-Bu es n-butilo.

20 Como "alquilo lineal o ramificado" se pueden mencionar: radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> que son radicales lineales o ramificados que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos son los radicales alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (también denominados "alquileo inferior lineal o ramificado") metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, 2-butilo, isobutilo o *terc*-butilo; y además pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, heptilo, octilo y sus isómeros constitucionales tales como 2-etilhexilo; o radicales alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> que son radicales lineales o ramificados que tienen de 8 a 30 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos son octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, hencosilo, docosilo, tricosilo, tetracosilo, pentacosilo, hexacosilo, heptacosilo, octacosilo, nonacosilo, escualilo, sus isómeros constitucionales, homólogos superiores e isómeros constitucionales de los mismos.

Como "alcoxilo lineal o ramificado" se pueden mencionar los restos unidos a oxígeno, análogos de los "alquilo (inferior) lineal o ramificado" anteriores.

Un grupo "acilo", es de la fórmula general R-(C=O)- donde R representa un resto hidrocarburo C<sub>1-30</sub> saturado o mono o poliinsaturado. En particular, dicho resto es un resto hidrocarburo de cadena lineal mono o poliinsaturado o una mezcla de tales restos con una longitud media de 1-30, 1-29, 1-10, 1-5 o 5-25 átomos de carbono. Son restos particularmente preferentes:

- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal saturados: CH<sub>3</sub>-, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>-, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>-, C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>-, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>-, C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>-, C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>-, C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>-, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-, C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>-, C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>-, C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>-, C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>-, C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>-, C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>-, C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>-, C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>-, C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>-, C<sub>22</sub>H<sub>47</sub>-, C<sub>24</sub>H<sub>49</sub>-, C<sub>25</sub>H<sub>51</sub>-, C<sub>29</sub>H<sub>59</sub>-, C<sub>30</sub>H<sub>61</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos ramificados saturados: iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-; iso-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-; iso-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal monoinsaturados: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>-, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>-, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>-, C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>-, C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal con dos insaturaciones: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>-, C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal con tres insaturaciones: C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal con cuatro insaturaciones: C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>-;
- restos derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal con cinco insaturaciones: C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>-.

Un grupo "alquinilo inferior" comprende radicales alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> que son radicales hidrocarburo lineales o ramificados, en particular lineales, que tienen de 2 a 4 átomos de carbono y un triple enlace C-C, como por ejemplo etinilo, 1- o 2-propinilo, y 1-, 2- y 3-butinilo.

Como "anillo carbo o heterocíclico de 5 o 6 miembros" se puede mencionar un resto de "anillo mono o bicíclico", opcionalmente condensado, que puede ser un anillo no aromático o aromático o heteroaromático, que tiene de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo y opcionalmente de 1 a 4 heteroátomos, tales como N, S y O. Como ejemplos se pueden mencionar ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, así como los análogos mono o poliinsaturados de los mismos, como por ejemplo ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclohexadienilo, cicloheptadienilo; naftilo y fenilo; así como radicales heterocíclicos de 5 a 7 miembros saturados o mono o poliinsaturados que tienen de 1 a 4 heteroátomos, seleccionados entre O, N y S, y donde el anillo heterocíclico puede estar además condensado con otro anillo heterocíclico o carbocíclico. Ejemplos de restos heterocíclicos son los obtenidos a partir de pirrolidina, tetrahidrofurano, piperidina, morfolina, pirrol, furano, tiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, tiazol, piridina, pirano, purina, pirimidina, piridazina, pirazina, cumarona, indol y quinolina. En particular el grupo anular es una estructura de tipo pirimidina, tal como, preferentemente, un anillo de citosina,

timina o uracilo.

"Opcionalmente mono o polisustituido" significa sustitución con al menos uno de los siguientes sustituyentes: NH<sub>2</sub>, OH, ceto (C=O), SH, halógeno, tal como F, Cl, Br, I; alcoxi inferior, alquilo inferior o alquililo inferior como se ha definido anteriormente.

Como restos de "halógeno" se pueden mencionar restos de F, Cl, Br y I.

## **2. Fármacos dobles particulares**

Como ejemplos no limitantes de fármacos dobles particulares de fórmula general I o la se pueden mencionar:

### **Fármaco doble de tipo alendronato:**

- N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FdU-alendronato) **(6a)**.
- N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (araU-alendronato) **(6b)**.
- N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-5-metil-3'-azido-2',3'-didesoxicitidina (AZT-alendronato) **(6c)**.

### **Fármaco doble de tipo pamidronato:**

- N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FdU-pamidronato) **(7a)**.
- N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (araU-pamidronato) **(7b)**.
- N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-5-metil-3'-azido-2',3'-didesoxicitidina (AZT-pamidronato) **(7c)**.

## **3. Formulaciones farmacéuticas y usos de acuerdo con la invención**

La invención también se refiere a agentes farmacéuticos, que contienen al menos un compuesto doble de acuerdo con la definición anterior en un vehículo o diluyente farmacéuticamente compatible, tal como por ejemplo contenido en liposomas o nanopartículas.

Los compuestos de acuerdo con la invención se usan generalmente en forma de agentes farmacéuticos para el tratamiento de un individuo, preferentemente un mamífero, en particular un ser humano. Por lo tanto, los compuestos se administran habitualmente en forma de composiciones farmacéuticas, que comprenden un excipiente farmacéuticamente compatible con al menos un análogo de nucleósido bisfosfonato de acuerdo con la invención, opcionalmente también una mezcla de varios compuestos de acuerdo con la invención, y opcionalmente otras sustancias activas que se pueden usar para el efecto terapéutico deseado respectivo. Tales composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal.

Ejemplos de formulaciones farmacéuticas adecuadas son formas farmacéuticas sólidas, tales como polvos, gránulos, comprimidos, pastillas, sobrecitos, obleas, grageas, cápsulas tales como cápsulas de gelatina duras y blandas, supositorios o formas farmacéuticas vaginales; formas farmacéuticas semisólidas, tales como pomadas, cremas, hidrogeles, pastas o parches, y formas farmacéuticas líquidas, tales como soluciones, emulsiones, en particular emulsiones de aceite en agua, suspensiones, por ejemplo lociones, preparaciones para inyección e infusión, gotas oculares y óticas. Además, se pueden usar dispositivos de administración implantados para la administración de los compuestos de acuerdo con la invención. Además, pueden encontrar aplicación liposomas, microesferas o matrices poliméricas.

Para la producción de los agentes farmacéuticos, los compuestos de acuerdo con la invención se mezclan o se diluyen habitualmente con un excipiente. Los excipientes pueden ser materiales sólidos, semisólidos o líquidos, que sirven como vehículo, excipiente o medio para la sustancia activa.

Los excipientes adecuados incluyen por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones también pueden comprender vehículos o excipientes habituales farmacéuticamente aceptables, tales como sustancias de deslizamiento, por ejemplo sebo, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; conservantes, tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; antioxidantes; antiirritantes; agentes quelantes; adyuvantes de revestimiento con azúcar; estabilizantes de emulsión; agentes formadores de película; agentes de gelificación; agentes para enmascarar el olor; correctores del sabor; resinas; hidrocoloides; disolventes; solubilizantes; agentes de neutralización; aceleradores de la penetración; pigmentos; compuestos de amonio cuaternario; agentes reengrasantes y sobreengrasantes; bases para pomadas, cremas o aceites; derivados de silicona; adyuvantes de dispersión; estabilizantes; agentes esterilizantes; bases para supositorios; excipientes para formación de comprimidos, tales como aglutinantes, cargas, sustancias de deslizamiento, disgregantes o revestimientos; propulsores; agentes de secado; opacificantes; espesantes; ceras; plastificantes; aceites blancos. En este sentido, una realización se basa en el conocimiento experto, como se describe, por ejemplo, en Fiedler, H.P., Lexikon der



Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete (Enciclopedia de excipientes para farmacia, cosmética y áreas relacionadas), 4ª edición, Aulendorf: ECV-Editio-Kantor-Verlag, 1996.

5 Los vehículos habituales en particular son, por ejemplo, manitol, glucosa, dextrosa, albúminas o similares; los diluyentes preferentes son básicamente solución salina fisiológica o una solución de glucosa al 5 %. Además, es habitual el tamponamiento de dichas soluciones con reactivos adecuados.

10 Para una mejor aplicación de los compuestos de acuerdo con la invención, se pueden proporcionar composiciones que contienen los compuestos de acuerdo con la invención en combinación con un vehículo orgánico. Además, se puede añadir cualquier otro excipiente que se use habitualmente para la preparación de agentes farmacéuticos, con la condición de que no se vea alterado el uso apropiado de dicha composición de vehículo orgánico y de los compuestos de acuerdo con la invención.

15 Una realización preferente de dichas composiciones prevé la asociación de los compuestos de acuerdo con la invención en forma de liposomas uni a oligolamelares con un diámetro máximo de 0,4 µm. Todos los métodos de preparación de liposomas que se conocen por sí mismos se pueden usar para formar los liposomas, por ejemplo ultrasonidos, cromatografía en gel, análisis de detergente, filtración a alta presión.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto queda superado por los efectos beneficiosos terapéuticamente.

25 Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

30 Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. Los requisitos para las formas unitarias de dosificación de la invención se prescriben y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico o profiláctico a conseguir en particular, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

45 Un intervalo no limitante, a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la invención es 0,01-600 mg/kg, más en particular 0,1-200 mg/kg, 0,5-150 mg/kg, o 1-90 mg/kg. Se debe indicar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar. Además, se debe entender que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se deberían ajustar en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación que se exponen en el presente documento son solamente a modo de ejemplo y no pretenden limitar ni el alcance ni la práctica de la composición reivindicada.

50 Además, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener además al menos otra sustancia farmacológica activa, que es adecuada para el tratamiento de enfermedades infecciosas y/o cánceres.

Se pueden mencionar, como ejemplos no limitantes de otras sustancias activas para el tratamiento de tumores:

60 (A) Agentes antineoplásicos, tales como

- (1) agentes fitocitostáticos, por ejemplo preparaciones de muérdago,
- (2) agentes citostáticos definidos químicamente, tales como

- a) alcaloides y podofilotoxinas, por ejemplo vinblastina, vincristina y otros alcaloides y análogos de la vinca; derivados de podofilotoxina, tales como etopósido;
- b) agentes de alquilación, tales como nitrosoureas y análogos de mostaza de nitrógeno, por ejemplo

ciclofosfamida y estramustina;

c) antibióticos citotóxicos, tales como antraciclinas y sustancias relacionadas, por ejemplo daunorrubicina, doxorubicina; bleomicina y mitomicina;

5 d) antimetabolitos, tales como análogos del ácido fólico, por ejemplo metotrexato, análogos de purina, análogos de pirimidina, por ejemplo gemcitabina y 5'-fluorouracilo;

(3) compuestos de platino, tales como carboplatino, cisplatino;

(4) enzimas y anticuerpos monoclonales;

10 (5) antineoplásicos con actividad endocrina, tales como

a) hormonas y sustancias relacionadas, por ejemplo estrógenos, gestágenos, por ejemplo acetato de medroxiprogesterona; hormonas del hipotálamo, tales como análogos de gonadorelina, por ejemplo buserelina;

15 b) antagonistas de hormonas, tales como el antiestrógeno tamoxifeno y otros antiestrógenos; o el antiandrógeno flutamida y otros antiandrógenos;

c) inhibidores de enzimas

(B) Agentes protectores/antídotos para terapia antineoplásica, por ejemplo ácido folínico.

20 Como ejemplos no limitantes de otras sustancias activas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como el SIDA en particular, se pueden mencionar: azidotimidina, didesoxicitidina, sanilvudina, estavudina (1-(2,3-didesoxi-beta-D-glicero-pent-2-enofuranosil)-5-metil-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona), didesoxiinosina, interleuquina-2 recombinante (humana), mesilato de saquinavir, interferón alfa, nevirapina, sulfato de abacavir, CD4-immunoadhesina, lamivudina, quinoestatina-272, emtricitabina, mesilato de delavirdina, inmunógeno del VIH-1, sulfato de indinavir, fosfonato de azidotimidina, calanólido A, amprenavir, efavirenz, ritonavir, mesilato de nelfinavir, gadolinio texafrina, enfuvirtida, interleuquina de capa leucocítica, clorhidrato de semapimod, elvucitabina, canovirina N, tipranavir, azodicarbonamida, fumarato de tenofovir y disoproxilo, sulfato de atazanavir, lamivudina/zidovudina, sampidina, dapivirina, etravirina, lopinavir/ritonavir, adargileuquina-alfa, gliminox, ancriviroc, O-(2-hidroxi-propil)-beta-ciclodextrina, darunavir, maraviroc, sulfato de abacavir/lamivudina, hesperidina sulfonada, rilpivirina, tenofovir.

30 En particular, la invención también se refiere al uso de al menos un compuesto de acuerdo con la definición anterior para la producción de un agente farmacéutico para la prevención y/o terapia de enfermedades infecciosas y/o cánceres, en particular tumores óseos y tumores óseos con metástasis.

#### 35 **4. Concepto de la síntesis de fármacos dobles antimetabolito bisfosfonato**

##### **4.1 General**

40 Para la actividad de los BP la estructura P-C-P es un prerrequisito y la intensidad de los efectos depende en gran medida de la cadena lateral. Pequeños cambios en la estructura pueden conducir a alteraciones importantes en sus características fisicoquímicas, biológicas, terapéuticas y toxicológicas. La longitud de la cadena lateral es muy importante. Los BP altamente activos contienen cadenas laterales con átomos de nitrógeno terminales en forma de grupos amino o restos heterocíclicos<sup>1</sup>. Por ejemplo, el pamidronato con su cadena lateral 3-aminopropilo tiene una actividad aproximadamente 10 veces inferior que el alendronato que tiene una cadena lateral 4-aminobutilo. El

45 reemplazo del grupo amino terminal por un resto imidazol dando como resultado Zoledronato (Zometa®) mejoró drásticamente la actividad con respecto a pamidronato y alendronato<sup>2</sup> y muestra actividades antitumorales más elevadas.

50 El acoplamiento de pamidronato o alendronato a un análogo de nucleósido citostático (antimetabolito) da como resultado un fármaco doble. El suministro dirigido de fármacos dobles a los huesos o las médulas óseas será posible debido al componente BP. El efecto antitumoral de los antimetabolitos citostáticos unidos se debería reforzar de forma auditiva o sinérgica con la actividad del componente BP citostático. La conjugación de los BP con antimetabolitos virostáticos da como resultado un nuevo fármaco doble antiviral cuyo componente BP podría inhibir la escisión catalizada por la transcriptasa inversa del VIH-1 mediada por ATP de la cadena terminal del AZT como se propone en la bibliografía<sup>28</sup>.

60 Se seleccionan 2'-desoxi-5-fluorouridina (5-FdU), 1-β-D-arabinofuranosiluracilo (araU) y AZT como antimetabolitos sobre una base de nucleósido de pirimidina para la síntesis de los fármacos dobles. El acoplamiento de análogos de nucleósido a través de la esterificación de su grupo hidroxilo con los grupos fosfonato de los BP como se ha descrito para 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT)<sup>29</sup> y otros nucleósidos<sup>30</sup> no pareció ser lo mejor para los presentes inventores. No se puede excluir que la esterificación con solo un grupo fosfonato podría reducir la alta afinidad de los BP por el hueso. Varios mono, di, tri y tetraésteres de los BP fueron profármacos ineficaces de los BP de partida<sup>2</sup>. Los BP geminales libres han mostrado las afinidades más elevadas por la superficie de la hidroxiapatita<sup>13</sup>. Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado otro concepto para el acoplamiento de nucleósidos y BP seleccionados, en el que no se derivatizan los grupos fosfonato terminales del BP. De forma análoga a síntesis descritas previamente<sup>31-33</sup>, se unió aminobisfosfonato a través de sus grupos amino terminales por sustitución del



Los nucleósidos de N<sup>4</sup>-[alquil-(hidroxifosono)fosfonato]-citosina se prepararon en tres etapas (Fig. 1) partiendo de un análogo de uridina (1). En la primera etapa de síntesis, se protegieron los grupos hidroxilo carbohidrato libres de 1 con restos acetilo dando como resultado 2 con rendimientos del 94 % - 97 %. Se obtuvo 5-FdU acetilado (2a) en forma de un sólido cristalino, y la acetilación de AZT dio como resultado una espuma sólida. En la segunda etapa, se introdujo el resto 1,2,4-triazolilo en la posición 4 de los restos uracilo protegidos. Se obtuvieron los análogos de uridina O-acetilados y 4-triazolizados **3** con un rendimiento entre el 77 % de **3c** y el 88 % de **3a**. Se sintetizó **3b** de acuerdo con métodos publicados<sup>31</sup>. El resto triazolilo de **3** se sustituyó en la tercera etapa de síntesis con (amino-1-hidroxifosono)fosfonatos (alendronato (**4**), pamidronato (**5**)) usando cantidades equimolares de nucleósido y de los BP dando como resultado el nucleósido de N<sup>4</sup>-[alquil-(hidroxifosono)fosfonato]-citosina acetilado. Se seleccionó una cantidad equimolar desfavorable de los reactivos con respecto a un alto rendimiento deseado de fármacos dobles ya que resulta difícil la separación del fármaco doble hidrofílico de un exceso de BP sin reaccionar también hidrofílico. El desarrollo de la sustitución se controló por TLC. Durante la reacción, la mancha fluorescente (360 nm) de **3** desapareció y se formaron nuevas manchas oscuras de migración más lenta (254 nm) y el fármaco doble deseado que permaneció en forma de una mancha oscura en el origen. El aislamiento y la purificación del fármaco doble acetilado se consiguieron en dos etapas. En primer lugar, se precipitó la parte principal del producto deseado junto con el BP que no había reaccionado y una pequeña cantidad de productos secundarios por adición de CH<sub>3</sub>OH al jarabe obtenido después de la concentración de la mezcla de reacción y se retiró por filtración. El resto obtenido y parcialmente purificado se disolvió en amoníaco y se mantuvo a temperatura ambiente para retirar los grupos protectores acetilo. El resto del producto de reacción deseado se obtuvo cromatográficamente a partir del filtrado usando una columna de fase inversa RP-18 y más tarde se desprotegió.

La separación cromatográfica se hizo más difícil debido a que los tiempos de retención del fármaco doble y de los BP que no habían reaccionado eran muy similares. Usando solamente agua como eluyente, los BP abandonaron la columna en primer lugar seguidos inmediatamente por el fármaco doble mientras que los componentes nucleosídicos sin acoplar y los productos secundarios permanecieron en la columna. Los fármacos dobles eran detectables por UV a 254 nm, mientras que los BP eran inactivos al UV y no se detectaron cuando se examinó automáticamente el eluato mediante un detector UV. El eluyente concentrado y liofilizado que contenía los fármacos dobles dio como resultado polvos de color blanco con diferentes hidrataciones **6** y **7**.

Una purificación cromatográfica alternativa posible usando una columna de intercambio aniónico que se usa normalmente para separar nucleótidos<sup>34</sup> podría aumentar drásticamente el tiempo de retención de los compuestos cargados negativamente. El mayor tiempo de retención no mejoraría la resolución del perfil de elución. Además de esto, el eluyente necesario para la cromatografía de intercambio aniónico contiene sal que se tiene que retirar de los compuestos eluidos en un procedimiento que consume tiempo. La difícil purificación de la mezcla de reacción podría ser una razón de que los fármacos dobles analíticamente puros se hayan obtenido únicamente con bajos rendimientos que varían entre un 35 % y un 55 %. Otra razón podría ser las condiciones desfavorables de reacción para la sustitución. La solubilidad de los BP polares que son únicamente solubles en agua con respecto a sus derivados de nucleósido protegidos no polares que son casi insolubles en agua no es un buen requisito para una reacción homogénea. El medio de reacción de agua/DMSO usado no fue un medio de reacción adecuado que favoreciera la sustitución con un alto rendimiento. Las sustituciones de los análogos usando componentes amino que son solubles en disolventes orgánicos dio como resultado un 95 % de rendimiento<sup>33</sup>.

La esterificación reversible del resto fosfonato de los BP mejora su solubilidad en disolventes orgánicos y podría aumentar el rendimiento de la sustitución aunque, sin embargo, el esfuerzo de esta protección reversible también aumentaría drásticamente el esfuerzo de síntesis. La estructura química y la pureza analítica de los productos de síntesis se confirmaron mediante RMM-espectroscopía de masas y análisis elemental. No se realizaron los análisis elementales de **2c** y **3a** debido a que estas sustancias se obtuvieron únicamente en forma de jarabe o espuma.

## **5. Actividades antitumorales de los fármacos dobles**

### **5.1 Actividad anticancerígena *in vitro* de 5-FdU-alendronato (6a)**

Hasta la fecha, las evaluaciones iniciales con respecto a la actividad citostática *in vitro* de los fármacos dobles solo se han realizado con 5-FdU-alendronato (**6a**) usando ensayos de identificación sistemática *in vitro* de las 60 líneas celulares del National Cancer Institute (NCI, Estados Unidos de América). En estas identificaciones sistemáticas, se determinó el porcentaje de crecimiento causado durante un periodo corto de incubación de 48 h usando solamente una dosis (10 μM) de 5-FdU-alendronato (se pueden encontrar detalles adicionales de la identificación sistemática del NCI en <http://www.dtp.nci.nih.gov>). En estas condiciones, el crecimiento de 11/59 líneas celulares sometidas a ensayo se redujo en un intervalo entre un 95 % y un 62 % mientras que las otras líneas celulares (48/59) no mostraron ninguna inhibición del crecimiento. Las 11 líneas celulares sensibles se indican en la tabla 1. El bajo efecto citostático que se encontró en la identificación sistemática del NCI se debe probablemente al periodo de incubación corto (48 h) y a la baja dosis. En este corto periodo de incubación, el fármaco doble probablemente no se metabolizó suficientemente, de modo que la concentración de metabolitos citostáticos no fue suficiente para una inhibición eficaz del crecimiento. A pesar de este periodo de incubación probablemente demasiado corto, ya se había observado una sensibilidad diferente con respecto al crecimiento de las líneas celulares tumorales sometidas a ensayo. Estos datos orientativos de la inhibición ya mostraron que los fármacos dobles representan un nuevo BP

con una actividad anticáncer comparable con la de los BP convencionales tal como se muestra en los siguientes ejemplos publicados. 6 líneas celulares tumorales diferentes sometidas a ensayo con el ensayo de quimiosensibilidad tumoral basado en ATP muestran una inhibición del crecimiento de un 50 % después de 6 días de incubación si se añadía en promedio Clondronat 1-1406  $\mu\text{M}$ , Alendronat 11-1856  $\mu\text{M}$  o Ácido zoledrónico 2-1912  $\mu\text{M}$ <sup>21</sup>. En otro examen, el Ácido zoledrónico mostró en promedio una eficacia mayor en otras 8 líneas celulares, cuya sensibilidad se evaluó con el ensayo de MTT. Para una inhibición de crecimiento de un 50 % de estas líneas celulares, solamente se necesitó una dosis de Ácido zoledrónico de 2,3-86,6  $\mu\text{M}$ <sup>18</sup>. Se necesitan más estudios detallados sobre el potencial citostático y la dirección al hueso de los fármacos dobles y en la actualidad están en curso.

## 5.2 Causas y mecanismos posibles que dan como resultado actividades antitumorales

Los dos fármacos combinados en una molécula de fármaco doble tienen dos funciones citostáticas diferentes. Por una parte, el nucleósido activo citostático o antiviral y por otra parte el resto BP citostático. Por lo tanto, se puede concebir que incluso toda la molécula intacta pueda ser activa. Como ejemplo de un fármaco activo con una función doble, se ha descrito un conjugado de lost y BP<sup>35</sup>. Por el contrario, el acoplamiento del fármaco citostático Doxorubicina con los BP en un conjugado de Doxorubicina no tuvo efecto citostático frente a xenoinjertos de tumores humanos<sup>16</sup>.

Se puede estimar que el fármaco doble podría ser un profármaco que se puede degradar en una mezcla de diferentes metabolitos citostáticos. En caso de que el enlace N-glicosídico relativamente lábil entre el carbohidrato y la base nitrogenada se escinda enzimáticamente, aparecen nuevos BP que contienen N, no descritos anteriormente, cuya cadena de alquilo muestra terminalmente una pirimidinona (proveniente de araU), 5-fluoropirimidinona (proveniente de 5-FdU) o un resto 5-metilpirimidinona (proveniente de AZT). La escisión hidrolítica en la posición N<sup>4</sup> mucho más estable puede conducir a los amino-BP y a los respectivos nucleósidos de uracilo (5-FdU, AraU, AZT). Esta ruta podría dar como resultado una mezcla de fármacos con efectos antitumorales esperados particularmente elevados. Por una parte, los efectos citostáticos de los metabolitos formados podrían estar causados por el hecho de que los antimetabolitos interrumpen las funciones del ADN y del ARN. Por otro lado, se propuso el mecanismo citostático de los N-BP mediante la formación de análogos de ATP inducida por los BP<sup>36</sup>.

Se conoce que con la ayuda de la función de BP, se hace posible una dirección al hueso, tal como se muestra mediante la capacidad descrita de dirección al hueso de 3-(1',1'-etilbisfosfonatos)-5-fluorouracilo<sup>37</sup>. El anclaje relativamente estable de los BP a la posición N<sup>4</sup> de la citosina puede contribuir a la acumulación del fármaco doble en el hueso antes de su metabolismo completo y, por lo tanto, podría actuar como un depósito de 5FdU enriquecido en huesos con metástasis.

La invención se explicará adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

### Parte experimental

#### A. Química general

A menos que se indique otra cosa, los materiales de partida se adquirieron en fuentes comerciales y se usaron como tales. Se aisló 3'-azido-2',3'-didesoximidina (AZT, 1c) a partir de fármacos caducados<sup>29, 38</sup>, y se sintetizó 4-(1,2,4-triazol-1-il)-1-( $\beta$ -D-2',3',5'-tri-O-acetil-arabinofuranosil)pirimidina-2(1H)ona (**3b**) de acuerdo con métodos publicados<sup>31</sup>. Se sintetizaron sal monosódica de (4-amino-1-hidroxi-1-fosfonobutil)fosfonato \*3H<sub>2</sub>O (alendronato) (**4**) y sal monosódica de (3-amino-1-hidroxi-1-fosfonopropil)fosfonato \*H<sub>2</sub>O (pamidronato) (**5**), como se ha descrito aunque, sin embargo, se obtuvieron con un rendimiento notablemente inferior<sup>39</sup>. Los derivados de nucleósido y las impurezas se detectaron usando luz UV y reactivos pulverizados como agentes de revelado como se ha descrito previamente<sup>33</sup>. Se llevó a cabo la TLC sobre placas de gel de sílice prerrevestidas 60F<sub>254</sub> (0,25 mm, Merck). La cromatografía en columna preparativa de las mezclas obtenidas (> 2 g) se realizó a temperatura ambiente por cromatografía ultrarrápida sobre columnas de fase inversa RP-18 autoempaquetadas (LiChroprep, 40-60  $\mu\text{m}$ ). Los compuestos deseados se identificaron usando absorción UV. El eluato se recogió en fracciones de 20 ml. Las fracciones del producto deseado se concentraron hasta un jarabe y el producto precipitó por adición de MeOH. Se cromatografiaron cantidades menores (< 2 g) usando columnas de fase inversa RP-18 disponibles en el mercado (Lobar B, LiChroprep RP-18 40-63  $\mu\text{m}$ , Merck). El producto eluido se aisló por liofilización de las fracciones combinadas. Las alícuotas de los fármacos dobles se purificaron hasta una calidad p.a. mediante cromatografía de doble fase inversa y liofilización de las fracciones recogidas. La concentración de las mezclas de reacción, las fases orgánicas y las fracciones eluidas se realizaron al vacío con una temperatura de baño de aproximadamente 45 °C. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en un espectrómetro Bruker A 250 a 250 y 62,9 MHz o en un espectrómetro Bruker Avance 400 a 400 y 100 MHz, respectivamente. Se usaron CDCl<sub>3</sub>, y D<sub>2</sub>O como disolventes y Me<sub>4</sub>Si como patrón interno. Los datos de RMN <sup>31</sup>P se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance 400 a 161 MHz, usando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como patrón externo. Los espectros de masas se midieron en un instrumento Finnigan TSQ 70 o Finnigan MAT 95. Para los espectros de masas por FAB, todos los compuestos se midieron en una matriz de NBA o glicerina.

**B. Ejemplos de síntesis****Síntesis de nucleósidos de N<sup>4</sup>-[alquil-(hidroxifosono)fosfonato]-citosina****5 Ejemplo 1: Síntesis de compuestos intermedios de triazolilo (3)****1.1 Síntesis de 5-fluoro-4-(1,2,4-triazol-1-il)-1-(β-D-3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-ribofuranosil)-pirimidina-2(1H)-ona (3a).**

10 Se disolvió 2'-desoxi-5-fluorouridina (1 a) (24,6 g, 0,1 mol) en piridina seca (200 ml) y se añadió anhídrido acético (47 ml, 0,5 mol). La solución resultante se agitó con exclusión de humedad durante 8 h a temperatura ambiente y se concentró posteriormente hasta que se produjo la cristalización. El concentrado se evaporó conjuntamente con tolueno (100 ml). El residuo resultante se disolvió por calentamiento (60 °C) en etanol (250 ml) y se recristalizó por reposo durante una noche en un refrigerador. El precipitado se filtró, se lavó con etanol frío y se secó para producir 32,4 g (97 %) de 3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-5-fluorouridina; p.f.: 151 °C; R<sub>F</sub> = 0,35 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5, v/v); MS (FAB<sup>+</sup>) 331. <sup>1</sup>[M-H<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>13</sub>FH<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O, (330,3): C, 47,28; H, 4,58; N, 8,48. Encontrado: C, 47,43; H, 4,78; N, 8,20. RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,13 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,15 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,16-2,25 (m, 1 H, H2'α), 2,55 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2</sub> = 5,7 Hz, J<sub>3</sub> = 14,3 Hz, H2'β), 4,28 (m, 1H, H4'), 4,32 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,1 Hz, J<sub>2</sub> = 12,2 Hz, H5'β), 4,41 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,6 Hz, J<sub>2</sub> = 12,1 Hz, H5'α), 5,24 (m, 1H, H3'), 6,31 (m, 1H, H1'), 7,7 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H6).

20 RMN <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 20,8 (COCH<sub>3</sub>), 20,9 (COCH<sub>3</sub>), 37,8 (C2'), 63,8 (C5'), 73,9 (C3'), 82,5 (C4'), 85,4 (C1'), 123,2 (d, J<sub>CF</sub> = 34,5 Hz, C6), 139,7 y 142,1 (d, J<sub>CF</sub> = 238 Hz, C5), 149,2 (C2), 156,9 (d, J<sub>CF</sub> = 26,7 Hz, C4), 170,3 (C=O), 170,5 (C=O).

25 Se disolvió 1,2,4-triazol (34,5 g, 0,5 mol) con agitación y calentamiento en acetonitrilo seco (150 ml). La mezcla se enfrió a 10 °C con agitación vigorosa y se añadió a la suspensión resultante cloruro de fosforilo (10,3 ml, 0,11 mol) gota a gota de modo que la temperatura no superara 25 °C. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió de nuevo hasta aproximadamente 10 °C y se añadió gota a gota trietilamina (70 ml, 0,5 mol) con agitación de modo que la temperatura no excediera de 20 °C. Se añadió lentamente a la mezcla enfriada de nuevo (aproximadamente 10 °C) 3',5'-di-O-acetil-5-fluorouridina (**2a**) (16,5 g, 50 mmol) disuelta en acetonitrilo seco (90 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Después de la adición de trietilamina (70 ml) y agua (17 ml) la solución se concentró hasta un jarabe que se diluyó con CHCl<sub>3</sub> (150 ml) y se extrajo con solución de hidrogenocarbonato sódico al 5 % (2 x 50 ml). La fase orgánica se concentró y se secó dando como resultado el producto **3a** en bruto (16,7 g, 88 %) en forma de una espuma sólida que se usó en la siguiente etapa de síntesis sin purificación adicional. R<sub>F</sub> = 0,35 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5, v/v). Los valores de R<sub>F</sub> de **2a** y **3a** son muy similares. **3a** muestra fluorescencia violeta con luz UV (366 nm), mientras que **2a** es inactivo a la fluorescencia y aparece como una mancha oscura (254 nm) en la placa de TLC. MS (FAB<sup>+</sup>) 382,1 [M-H<sup>+</sup>];

30 RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,13 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,14 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,10-2,15 (m, 2H, H2'), 2,30 (dt, 1H, J<sub>1</sub> = 6,7 Hz, J<sub>2</sub> = 14,5 Hz, H2'α), 2,90, (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,3 Hz, J<sub>2</sub> = 5,9 Hz, J<sub>3</sub> = 14,5 Hz, H2'β), 4,25-4,50 (m, 3H, H5' + H4'), 5,26 (m, 1H, H3'), 6,24 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 6,1 Hz, J<sub>2</sub> = 6,5 Hz, H1'), 8,25 (s, 1 H, N=CH-N), 8,48 (d, 1H, J = 6,5 Hz, H6), 9,25 (s, 1H, NCH-N). RMN <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 22,7 (COCH<sub>3</sub>), 22,8 (COCH<sub>3</sub>), 38,9 (C2'), 63,3 (C5'), 73,3 (C3'), 83,5 (C1'), 88,1 (C4'), 133,8 (d, J<sub>CF</sub> = 34,8 Hz, C6), 135,0, 137,5, 140,8 (d, J<sub>CF</sub> = 237 Hz, C5), 145,0 (NCN), 151,5, 154,8 (C2), 156,9 (d, J<sub>CF</sub> = 26,5 Hz, C4), 170,2 (C=O), 170,3 (C=O).

**1.2 Síntesis de 5-metil-4-(1,2,4-triazol-1-il)-1-(β-D-5'-O-acetil-3'-azido-2',3'-didesoxirribo-furanosil)-pirimidin-2(1H)-ona (3c).**

45 Se disolvió 2'-azido-2',3'-didesoxitimidina (1c) (9 g, 34 mmol) en piridina seca (70 ml). Se añadió anhídrido acético (16 ml, 0,17 mol) y la solución se agitó con exclusión de humedad durante 8 h a temperatura ambiente, se concentró posteriormente hasta un jarabe, que se evaporó conjuntamente con tolueno (40 ml). Después de secar el jarabe se obtuvo 5'-acetil-2'-azido-2',3'-didesoxitimidina (**2c**) (9,8 g, 94 %) en forma de una espuma sólida que se usó sin purificación adicional en la triazolización posterior, que se realizó de forma análoga a **3.2.2** usando **2c** (9,8 g, 32 mmol) en lugar de **2a**. La fase orgánica obtenida después de la neutralización de las mezclas de reacción se concentró hasta un jarabe. Después de la adición de etanol (120 ml) la solución se concentró hasta aproximadamente 50 ml y se mantuvo durante una noche en un refrigerador (aprox. 6 °C). El precipitado cristalino se retiró por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de etanol frío y se secó dando como resultado 8,8 g (77 %) de **3c**. p.f.: 142-143 °C. R<sub>F</sub> = 0,49 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5, v/v); MS (FAB<sup>+</sup>) 361 [M-H<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (360,33): C, 46,66; H, 4,48; N, 31,10; Encontrado: C, 46,72; H, 4,58; N, 31,65. RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,43-2,55 (m, 1H, H2'), 2,81 (dt, 1H, J<sub>1</sub> = 6,4 Hz, J<sub>2</sub> = 14,1 Hz, H2'b), 4,14-4,28 (m, 2H, H3' y H4'), 4,40 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,1 Hz, J<sub>2</sub> = 12,4 Hz, H5'α), 4,50 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,1 Hz, J<sub>2</sub> = 12,4 Hz, H5'β), 6,15 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,8 Hz, J<sub>2</sub> = 6,5 Hz, H1'), 8,1 (s, 1 H, NCHN), 8,13 (s, 1 H, NCHN), 9,28 (s, 1H, H6). RMN <sup>13</sup>C (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 16,9 (CH<sub>3</sub>), 20,5 (COCH<sub>3</sub>), 38,3 (C2'), 59,5 (C5'), 62,7 (C3'), 82,6 (C1'), 87,5 (C4'), 105,3 (C5), 144,7 (C6), 145,8 (2xNCN), 153,2 (C2), 158,0 (C4) 169,9 (C=O).

**Ejemplo 2: Síntesis de fármacos dobles de bisfosfonato (6), (7)****2.1 Síntesis de N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FdU-alendronato) (6a)**

5 A una suspensión agitada y calentada (85 °C) de **4** (16,2 g, 50 mmol) en agua (90 ml), se añadió **3a** (19 g, 50 mmol), disuelto en dioxano. El valor del pH de la suspensión se ajustó entre 8 y 9 por adición sucesiva de trietilamina. El avance de la reacción de sustitución se controló por TLC. La mancha de fluorescencia del compuesto de triazolilo (**3a**) desaparece durante la reacción y se formaron nuevas manchas fluorescentes de migración más lenta. Cuando se completó la sustitución (aprox. 3-4 h) la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Los compuestos sin disolver se retiraron por filtración y el filtrado se evaporó. Al jarabe obtenido se añadió MeOH (150 ml) y el precipitado fino formado se retiró por filtración y se secó dando como resultado el material de partida I. El filtrado se evaporó hasta un jarabe dando como resultado el material de partida II. I y II se purificaron por separado. I se suspendió en acetonitrilo (100 ml), se agitó a 70 °C durante 3 h, se retiró por filtración, se secó y se desprotegió de acuerdo con el siguiente procedimiento. Al polvo fino obtenido se añadió hidróxido de amonio al 25 % (300 ml). La mezcla de reacción agitada se mantuvo cerrada a temperatura ambiente durante 3 días y a continuación se concentró. El jarabe resultante formó por adición de CH<sub>3</sub>OH y agitación vigorosa un precipitado fino, que se filtró y se secó. El residuo obtenido se disolvió en un pequeño volumen de agua y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre una columna de fase inversa RP-18 autoempaquetada (LiChroprep, 40-60 µm) usando agua destilada como eluyente. Los compuestos deseados del eluato fraccionado se identificaron por absorción UV (254 nm). Las fracciones combinadas del primer pico principal de absorción UV eluido se evaporaron hasta un jarabe formando un precipitado fino por adición de MeOH y agitación vigorosa. El precipitado filtrado se secó dando como resultado la primera parte de **6a**. La purificación de II se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Por adición de H<sub>2</sub>O a I se consiguió un precipitado y se retiró por filtración. El filtrado evaporado se disolvió en un pequeño volumen de H<sub>2</sub>O y se purificó cromatográficamente sobre una columna RP-18 como se ha descrito para I. A continuación se desprotegió usando hidróxido de amonio al 25 % de acuerdo con el procedimiento descrito dando como resultado la segunda parte de **6a**. Los productos aislados I y II se combinaron dando como resultado 15,6 g de **6a** con un rendimiento de un 55 %. MS (FAB<sup>-</sup>) 476,0, [M-H<sup>-</sup>], 498,0 [M+Na<sup>+</sup>], 520,1 [M+2Na<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>\*2,5H<sub>2</sub>O (566,29); C, 27,57, H, 4,45, N, 7,42; Encontrado: C, 27,31, H, 4,33, N, 7,57; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,87-2,05 (m, 4H, 2 x -CH<sub>2</sub>-, H<sup>2</sup>", H<sup>3</sup>" ), 2,19-2,44 (m, 2H, H<sup>2'</sup>) 3,43 (m, 2H, H<sup>1</sup>" ) 3,74 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 5,0 Hz, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H<sup>5'α</sup>), 3,82 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,6 Hz, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H<sup>5'β</sup>), 3,99-4,04 (m, 1H, H<sup>3'</sup>), 4,39-4,44 (m, 1H, H<sup>4'</sup>), 6,21 (m, 1H, H<sup>1'</sup>), 7,83 (d, 1H, J<sub>HF</sub> = 6,7 Hz, H<sup>6</sup>); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 23,2 (C<sup>3</sup>" ), 31,2 (C<sup>2</sup>" ), 39,2 (C<sup>2'</sup>), 41,1 (C<sup>1</sup>" ), 61,2 (C<sup>5'</sup>), 70,4 (C<sup>3'</sup>), 73,9 (t, J<sub>CP</sub> = 131 Hz, P-C-P), 85,9 (C<sup>1'</sup>), 86,6 (C<sup>4'</sup>), 123,4 (d, J<sub>CF</sub> = 33,4 Hz, C<sup>6</sup>), 138,1 (d, J<sub>CF</sub> = 243,4 Hz, C<sup>5</sup>), 155,8 (C<sup>2</sup>), 160,0 (C<sup>4</sup>); RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 18,4 ppm.

**2.2 Síntesis de N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-1-(β-D-arabinofuranosil)citosina (araU-alendronato) (6b)**

Este fármaco doble se obtuvo por unión de **3b** (21 g, 50 mmol) y **4** (16,2 g, 50 mmol) de forma similar a como se ha descrito anteriormente. Rendimiento 11,7 g (42 %) de **6b**; MS (FAB<sup>-</sup>) 474,1 [M-H<sup>-</sup>], 496,1 [M+Na<sup>+</sup>], 518,2 [M+2Na<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>12</sub>P<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (555,29) C, 28,12, H, 5,54; N, 7,57; Encontrado: C, 28,18; H, 4,75; N, 7,90. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,84-2,09 (m, 4H, H<sup>2</sup>", H<sup>3</sup>" ), 3,30-3,41 (m, 2H, H<sup>1</sup>" ), 3,78-3,94 (m, 2H, H<sup>5'</sup>), 3,95-4,04 (m, 1H, H<sup>4'</sup>), 4,06-4,16 (m, 1H, H<sup>3'</sup>), 4,37-4,43 (m, 1H, H<sup>2'</sup>), 4,8 (s, a, OH + NH + D<sub>2</sub>O), 5,93-6,0 (m, 1H, H<sup>1'</sup>), 6,15-6,22 (m, 1H, H<sup>5</sup>), 7,62-7,69 (m, 1H, H<sup>6</sup>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 23,1 (C<sup>1</sup>" ), 31,0 (C<sup>2</sup>" ), 41,3 (C<sup>3</sup>" ), 60,7 (C<sup>5'</sup>), 75,4 (C<sup>2'</sup>), 75,5 (C<sup>3'</sup>), 82,9 (C<sup>4'</sup>), 85,8 (C<sup>1'</sup>), 96,4 (C<sup>5</sup>), 140,6 (C<sup>6</sup>), 157,3 (C<sup>2</sup>), 163,6 (C<sup>4</sup>). RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 18,1 ppm.

**2.3 Síntesis de N<sup>4</sup>-[butil-(4-hidroxi-4-fosfono)fosfonato]-5-metil-3'-azido-2',3'-didesoxicitidina (AZT-alendronato) (6c)**

50 Este fármaco doble se obtuvo por unión de **3c** (3,6 g, 10 mmol) y **4** (3,24 g 10 mmol) de forma similar a como se ha descrito anteriormente. Rendimiento 2,0 g (35 %) de **6c**; MS (FAB<sup>-</sup>) 497,0 [M-H<sup>-</sup>]; 519,1 [M+Na<sup>+</sup>]; 541,1 [M+2Na<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O (596,35), C, 28,20; H, 4,73, N, 14,09; Encontrado: C, 27,92; H, 4,55; N, 14,45. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,86-2,05 (m, 7H, H<sup>7</sup>, H<sup>7</sup>, H<sup>2</sup>", H<sup>3</sup>" ), 2,35-2,52 (m, 2H, H<sup>1</sup>" ), 3,38-3,52 (m, 2H, H<sup>2'</sup>), 3,78 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,7 Hz, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H<sup>5'α</sup>), 3,86 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,6 Hz, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H<sup>5'β</sup>), 4,0 (m, 1H, H<sup>3'</sup>), 4,31 (dt, 1H, J<sub>1</sub> = 5,4 Hz, J<sub>2</sub> = 7,2 Hz, H<sup>4'</sup>), 4,8 (s, a, D<sub>2</sub>O + NH + OH), 6,18 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 6,4 Hz, H<sup>1'</sup>), 7,49 (s, 1H, H<sup>6</sup>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 12,4 (CH<sub>3</sub>), 22,4 (C<sup>3</sup>" ), 31,2 (C<sup>2</sup>" ), 36,5 (C<sup>1</sup>" ), 41,6 (C<sup>2'</sup>), 60,0 (C<sup>5'</sup>), 61,0 (C<sup>3'</sup>), 73,9 (t, J<sub>CP</sub> = 131 Hz, P-C-P), 83,9 (C<sup>1'</sup>), 85,4 (C<sup>4'</sup>), 105,5 (C<sup>5</sup>), 136,4 (C<sup>6</sup>), 157,5 (C<sup>2</sup>), 163,5 (C<sup>4</sup>). RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 18,5 ppm.

**2.4 Síntesis de N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-5-fluoro-2'-desoxicitidina (5-FdU-pamidronato) (7a)**

Este fármaco doble se sintetizó por acoplamiento de **3a** (9,5 g, 25 mmol) y **5** (6,9 g, 25 mmol) de forma análoga a la ruta de síntesis de **6a** dando como resultado **7a**. Rendimiento 6,5 g (48 %). MS (FAB<sup>-</sup>) 462,0 [M-H<sup>-</sup>]; 484,0 [M+Na<sup>+</sup>]; 505,9 [M+2Na<sup>+</sup>]. Anal. calc. C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (543,26) C, 26,53, H, 4,08, N, 7,73; Encontrado: C, 26,28, H, 4,26, N, 8,22; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 2,19-2,45 (m, 4H, H<sup>2'</sup> + H<sup>2</sup>" ), 3,68-3,87 (m, 4H, H<sup>5'</sup> + H<sup>1</sup>" ), 3,99-4,05 (m, 1H, H<sup>3'</sup>), 4,39-4,50 (m, 1H, H<sup>4'</sup>), 6,18-6,25 (m, 1H, H<sup>1'</sup>), 7,83 (d, 1H, J<sub>HF</sub>

= 6,0 Hz, H6). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 32,3 (C2"), 36,6 (C1"), 39,2 (C2'), 61,2 (C5'), 70,4 (C3'), 72,9 (t, J<sub>CP</sub> = 132,7 Hz, P-C-P), 85,9 (C1'), 86,6 (C4'), 123,4 (d, J<sub>CF</sub> = 33,4 Hz, C6), 138,1 (d, J<sub>CF</sub> = 243 Hz, C5), 155,6 (d, J<sub>CF</sub> = 13,9 Hz, C4), 155,9 (C2). RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 17,8 ppm.

## 5 2.5 Síntesis de N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (araU-pamidronato) (7b)

La sustitución de 3a (42 g, 0,1 mol) con 5 (27,4 g, 0,1 mol) de forma análoga a la preparación de 6a dio como resultado el fármaco doble 7b. Rendimiento 25,3 g, (45 %). MS (FAB<sup>-</sup>) 460,1 [M-H]; 482,2 [M+Na]. Anal. calc. C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>12</sub>P<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O\*1,5NH<sub>3</sub> (562,86) C, 26,46, H, 5,27, N, 11,57. Encontrado: C, 26,95, H, 5,56, N, 11,80. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,93-1,98 (m, 2H, H2"), 2,76-2,81 (m, 2H, H1"), 3,75-3,92 (m, 2H, H5'), 3,92-4,01 (m, 1H, H4'), 4,04-4,39 (m, 1H, H3'), 4,34-4,39 (m, 1H, H2'), 5,86-5,92 (m, 1H, H1'), 6,12-6,18 (m, 1H, H5), 7,64-7,75 (m, 1H, H6); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 32,4 (C1"), 38,4 (C2"), 60,8 (C5'), 75,4 (C2'), 75,5 (C3'), 83,6 (C4'), 85,6 (C1'), 96,5 (C5), 140,7 (C6), 157,2 (C2), 163,2 (C4). RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 17,8 ppm.

## 15 2.6 Síntesis de N<sup>4</sup>-[propil-(3-hidroxi-3-fosfono)fosfonato]-5-metil-3'-azido-2',3'-didesoxicitidina (AZT-pamidronato) (7c)

Por sustitución de 3c (1,8 g, 5 mmol) con 5 (1,4 g, 5 mmol) de forma análoga a la preparación de 6a se obtuvo el fármaco doble 7c. Rendimiento 1,2 g (41 %). MS (FAB<sup>-</sup>) 483,0 [M-H]; 505,1 [M+Na], 527,1 [M+2Na]. Anal. calc. C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>\*3,5H<sub>2</sub>O (591,34). C, 26,41, H, 4,60, N, 14,21. Encontrado: C, 25,98, H, 4,46, N, 14,75. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,17-2,31 (m, 2H, H2"), 2,35-2,52 (m, 2H, H1"), 3,69-3,89 (m, 4H, H2' + H5'), 3,97-4,03 (m, 1H, H3'), 4,28-4,35 (m, 1H, H4'), 4,8 (s, a, OH + NH + D<sub>2</sub>O), 6,16-6,22 (m, 1H, H1'), 7,49 (s, 1H, H6). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 12,3 (C7), 32,6 (C2"), 36,4 (C1"), 37,2 (C2'), 59,9 (C5'), 61,0 (C3'), 73,2 (t, J<sub>CP</sub> = 130 Hz), 83,9 (C1'), 85,3 (C4'), 105,6 (C5), 136,3 (C6), 157,5 (C2), 163,1 (C4). RMN <sup>31</sup>P (161 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 18,0 ppm.

## C. Ejemplo de ensayo

### 30 Ejemplo 3: Inhibición del crecimiento *in vitro* de diferentes líneas celulares tumorales por 5-FdU-alendronato (6a)

La acción citostática *in vitro* de los compuestos de acuerdo con la invención en diferentes líneas celulares tumorales se puede demostrar con la siguiente preparación.

35 En el día 0, se inocula una serie de placas de microtitulación con las células tumorales y se preincuba durante 24 h. A continuación, se añade a las células el compuesto de acuerdo con la invención. Después de incubación durante 48 horas, las células se fijan *in situ*, se lavan y se secan. A continuación, se añade sulforrodamina B (SRB), un colorante de color rosa que se une a las células fijadas, y las células se lavan de nuevo. El colorante que permanece representa la masa celular adherente y se determina mediante espectroscopía. Los datos adquiridos automáticamente se evalúan por ordenador.

40 El ensayo de 60 líneas celulares tumorales con 5FdU-alendronato 10 μM (compuesto 6) y un periodo de incubación corto de 48 h, mostró, por ejemplo, una inhibición del crecimiento variable entre un 5 % y un 32 % de 11 líneas celulares tumorales. Los resultados del ensayo se resumen en la siguiente Tabla 1.

45

**Tabla 1:**

Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de líneas celulares tumorales en tratamiento con 5-FdU-alendronato. Los efectos citostáticos del 5-FdU-alendronato se expresan mediante el porcentaje de crecimiento en tratamiento con dosis 10 μM del fármaco doble.	
Panel / Línea celular	Crecimiento [%] <sup>1)</sup>
	5-FdU-alendronato <b>6a</b> (10 μM) <sup>2)</sup>
Leucemia HL-60 (TB)	61,75
Cáncer de pulmón no microcítico EKVX HOP-62 NCI-H322M	82,45 93,16 88,84
Cáncer del SNC SF-268 SF-539 SNB-75	86,64 94,79 87,12



Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de líneas celulares tumorales en tratamiento con 5-FdU-alendronato. Los efectos citostáticos del 5-FdU-alendronato se expresan mediante el porcentaje de crecimiento en tratamiento con dosis 10 $\mu$ M del fármaco doble.	
Panel / Línea celular	Crecimiento [%] <sup>1)</sup>
	5-FdU-alendronato <b>6a</b> (10 $\mu$ M) <sup>2)</sup>
Melanomas MALME-3 M MDA-MB-435	89,24 86,95
Cánceres de ovario OVCAR-3	88,34
Cánceres renales CAKI-1	79,14
<sup>1)</sup> 100 % se refiere al crecimiento observado para la correspondiente línea celular en ausencia del fármaco	
<sup>2)</sup> no se observó ningún efecto de inhibición del crecimiento para el alendronato solo (10 $\mu$ M)	

#### **Ejemplo 4: Unión de nucleósido-BP a hidroxiapatita**

Se conoce que el resto BP de los conjugados preserva su alta afinidad hacia la matriz ósea incluso cuando se acopla con un resto voluminoso<sup>17, 41</sup>. La alta afinidad hacia la matriz ósea se basa en las fuertes propiedades de unión de los BP a la hidroxiapatita<sup>42,43,44</sup>. Por esta razón, se analizaron las propiedades de adsorción de 5-FdU-ale y de 5-FdU a la hidroxiapatita.

##### **a) 5-FdU y 5-FdU-alendronato sin tratar (5-FdU-ale)**

Se disolvieron 5-FdU (246 mg, 1 mmol) o 5-FdU-ale (475 mg) en agua destilada (100 ml). Se determinaron las unidades  $A_{260}$  de la solución obtenida y las relaciones de absorbancia de 250/260 y 280/260 usando un espectrofotómetro UV. Después de la adición de hidroxiapatita sólida tal como se indica en la Tabla 2, la suspensión obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se filtró una alícuota (1 ml) de la suspensión a través de un filtro estéril y se midieron las unidades  $A_{260}$ . La cantidad de fármaco unido a hidroxiapatita se calculó basándose en la disminución de las unidades  $A_{260}$  de la suspensión.

##### **b) Pretratamiento acidificado de 5-FdU-alendronato**

Una solución de 5-FdU-ale (475 mg) en 100 ml de  $H_2O$  se acidificó a pH 2 mediante la adición de HCl y se agitó a 50 °C durante 24 h, seguido de neutralización con carbonato sódico sólido. Los productos de degradación con actividad UV no fueron detectables a 254 nm por análisis de TLC con  $CHCl_3/MeOH$  (80:20) usando placas de gel de sílice. La unión a la hidroxiapatita del 5-FdU-ale pretratado se analizó tal como se ha descrito anteriormente.

Como se resume en la Tabla 2, se adsorbió solamente un 15 % del 5-FdU a la hidroxiapatita, mientras que la adsorción de 5-FdU-ale fue aproximadamente seis veces mayor (87 %). El estudio de unión también se usó para una evaluación indirecta de la estabilidad del nucleósido-BP en condiciones ácidas. La unión se redujo en un 13 % en comparación con el compuesto sin tratar cuando se acidificó la solución de 5-FdU-ale a pH 2 y se mantuvo a 50 °C durante 24 h antes de la adsorción a la hidroxiapatita. La relación UV de  $A_{250/260}$  y  $A_{280/260}$  sin cambios indica que no se produce escisión de 5-FdU-ale en el monómero 5-FdU + ale durante el tratamiento con hidroxiapatita en las condiciones usadas.

Un análisis de TLC del sobrenadante no reveló ningún compuesto con actividad UV como 5-fluorouracilo o 5-FdU. Por lo tanto, la ausencia de compuestos con actividad UV permite concluir que 5-FdU-ale es muy estable en condiciones ácidas.

**Tabla 2:**

Unión de 5-FdU y 5-FdU-alendronato (5-FdU-ale) a hidroxiapatita							
Fármaco	Fármaco (mg)	Hidroxiapatita (g)	Adsorción UV			Fármaco unido	
			Unidades $A_{260}$	Relación		mg	%
				250/260	280/260		
5-FdU	246	0	8050	0,61	1,01	0	0
5-FdU	246	7	6860	0,63	1,10	37	15

Unión de 5-FdU y 5-FdU-alendronato (5-FdU-ale) a hidroxiapatita							
Fármaco	Fármaco (mg)	Hidroxiapatita (g)	Adsorción UV			Fármaco unido	
			Unidades A <sub>260</sub>	Relación		mg	%
				250/260	280/260		
5-FdU-ale	475	0	7590	1,00	1,27	0	0
5-FdU-ale	475	5	4500	1,02	1,23	195	41
5-FdU-ale	475	7	990	1,04	1,17	414	87
5-FdU-ale*	475	7	1950	1,00	1,23	352	74

Las unidades A<sub>260</sub> de las soluciones/suspensiones acuosas (100 ml) que contienen 5-FdU o 5-FdU-ale se midieron antes y después de la adición de hidroxiapatita sólida. Se calcularon las cantidades de fármaco unido basándose en la disminución de unidades A<sub>260</sub> del sobrenadante.

\* Pretratamiento ácido.

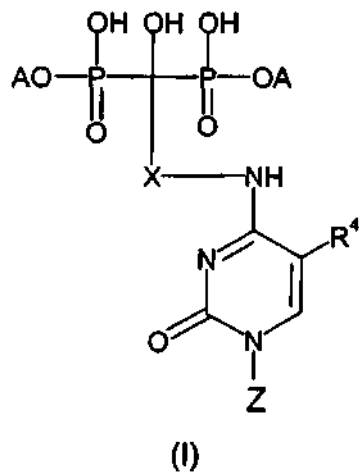
### Referencias y notas

1. Fleisch, H. *Drugs* 1991, 42, 919.
- 5 2. Vepsäläinen, J. J. *Curr Med Chem* 2002, 9, 1201.
3. Widler, L.; Jaeggi, K. A.; Glatt, M.; Muller, K.; Bachmann, R.; Bisping, M.; Born, A. R.; Cortesi, R.; Guiglia, G.; Jeker, H.; Klein, R.; Ramseier, U.; Schmid, J.; Schreiber, G.; Seltenmeyer, Y.; Green, J. R. *J Med Chem* 2002, 45, 3721.
4. Brown, J. E.; Cook, R. J.; Major, P.; Lipton, A.; Saad, F.; Smith, M.; Lee, K. A.; Zheng, M.; Hei, Y. J.; Coleman, R. E. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97, 59.
- 10 5. Coleman, R. E. *Br J Cancer* 2008, 98, 1736.
6. Ghosh, S.; Chan, J. M.; Lea, C. R.; Meints, G. A.; Lewis, J. C.; Tovian, Z. S.; Flessner, R. M.; Loftus, T. C.; Bruchhaus, I.; Kendrick, H.; Croft, S. L.; Kemp, R. G.; Kobayashi, S.; Nozaki, T.; Oldfield, E. *J Med Chem* 2004, 47, 175.
- 15 7. Sanders, J. M.; Gomez, A. O.; Mao, J.; Meints, G. A.; Van Brussel, E. M.; Burzynska, A.; Kafarski, P.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Oldfield, E. *J Med Chem* 2003, 46, 5171.
8. Adza mli, I. K.; Blau, M.; Pfeffer, M. A.; Davis, M. A. *Magn Reson Med* 1993, 29, 505.
9. Adza mli, I. K.; Johnson, D.; Blau, M. *Invest Radiol* 1991, 26, 143.
- 10 10. Bhushan, K. R.; Tanaka, E.; Frangioni, J. V. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, 46, 7969.
11. Kubicek, V.; Rudovsky, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A.; Lukes, I. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 16477.
12. Zhang, S.; Gangal, G.; Uludag, H. *Chem Soc Rev* 2007, 36, 507.
13. Vitha, T.; Kubicek, V.; Hermann, P.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A.; Lukes, I. *Langmuir* 2008, 24, 1952.
- 25 14. Sturtz, G.; Appéré, G.; Breistol, K.; Fodstad, O.; Schwartzmann, G.; Hendriks, H. R. *Eur. J. Med. Chem.* 1992, 27, 825.
15. Sturtz, G.; Couthon, H.; Fabulet, O.; Mian, M.; Rosini, S. *Eur. J. Med. Chem.* 1993, 28, 899.
16. Fabulet, O.; Sturtz, G. *Phosphorus, Sulfur, y Silicon* 1995, 101, 225.
17. Uludag, H.; Kousinioris, N.; Gao, T.; Kantoci, D. *Biotechnol Prog* 2000, 16, 258.
- 30 18. Budman, D. R.; Calabro, A. *Oncology* 2006, 70, 147.
19. Clezardin, P. *Cancer Treat Rev* 2005, 31 Sup. 3, 1.
20. Coleman, R.; Gnant, M. *Curr Opin Support Palliat Care* 2009, 3, 213.
21. Knight, L. A.; Conroy, M.; Fernando, A.; Polak, M.; Kurbacher, C. M.; Cree, I. A. *Anticancer Drugs* 2005, 16, 969.
- 35 22. Neville-Webbe, H. L.; Rostami-Hodjegan, A.; Evans, C. A.; Coleman, R. E.; Holen, I. *Int J Cancer* 2005, 113, 364.
23. Roelofs, A. J.; Thompson, K.; Gordon, S.; Rogers, M. J. *Clin Cancer Res* 2006, 12, 6222s.
24. Santini, D.; Vespasiani Gentilucci, U.; Vincenzi, B.; Picardi, A.; Vasaturo, F.; La Cesa, A.; Onori, N.; Scarpa, S.; Tonini, G. *Ann Oncol* 2003, 14, 1468.
- 40 25. Vogt, U.; Bielawski, K. P.; Bosse, U.; Schlotter, C. M. *Oncol Rep* 2004, 12, 1109.
26. Winter, M. C.; Coleman, R. E. *Curr Opin Oncol* 2009, 21, 499.
27. Winter, M. C.; Holen, I.; Coleman, R. E. *Cancer Treat Rev* 2008, 34, 453.
28. Song, Y.; Chan, J. M.; Tovian, Z.; Secrest, A.; Nagy, E.; Krysiak, K.; Bergan, K.; Parniak, M. A.; Oldfield, E. *Bioorg Med Chem* 2008, 16, 8959.
- 45 29. Migianu, E.; Monteilo, M.; Even, P.; Lecouvey, M. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005, 24, 121.
30. Kalek, M.; Jemielity, J.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E. *Tetrahedron Letters* 2005, 46, 2417.
31. Divakar, K. J.; Reese, C. B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1982, 1171.

32. Gao, Y.; Zhang, P.; Wu, L.; Matsuura, T.; Meng, J. *Synthetic Communications* 2003, 33, 2635.
33. Schott, H.; Häussler, M. P.; Schwendener, R. A. *Liebigs Ann. Chem.* 1994, 465.
34. Schott, H. In *Preparative Scale-Chromatography*; Grushka, E., Ed.: New York Basel, 1989; Vol. 46, 269.
- 5 35. Wingen, F.; Sterz, H.; Blum, H.; Moller, H.; Pittermann, W.; Pool, B. L.; Sinn, H. J.; Spring, H.; Schmahl, D. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986, 111, 209.
36. Monkkonen, H.; Kuokkanen, J.; Holen, I.; Evans, A.; Lefley, D. V.; Jauhiainen, M.; Auriola, S.; Monkkonen, J. *Anticancer Drugs* 2008, 19, 391.
37. Chen, H.; Wu, L.-Y.; Zeng, J.-C.; Wu, Y. *West China Journal of Pharmaceutical sciences* 2005, 2, 10.
38. Schott, S. *Pharm. Ztg.* 2001, 146, 24.
- 10 39. Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 8310.
40. Choi et al., *Dental Traumatology*, 2010; 26; 476-480.
41. Pan, H.; Sima, M.; Kopeckova P.; Wu, K.; Gao, S.; Liu, J.; Wang, D.; Miller, S.C.; Kopecek, J. *Mol. Pharmacol.* 2008, 5, 548.
- 15 42. Papapoulos S. E. *Bone* 2006, 38, 613.
43. Leu, C.T.; Luegmayer, E.; Freedman, L. P.; Rodan, G.A.; Reszka, A. A. *Bone* 2006, 38, 628.
44. Nancollas, G.H.; Tang, R.; Phipps, R.J.; Henneman, Z.; Guide, S.; Wu, W.; Man-good, A.; Russell, R.G.; Ebetino, F.H. *Bone* 2006, 38, 617.
- 20 El contenido de los documentos citados en el presente documento se incorpora por referencia.

## REIVINDICACIONES

1. Bisfosfonato de fórmula general I



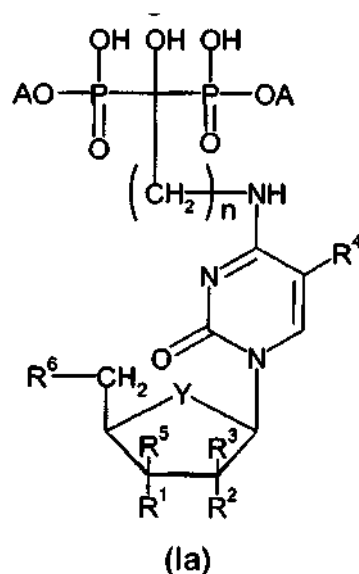
5 donde

los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón o un catión metálico monovalente;  
X representa un puente alquileo de cadena lineal o ramificado;

10 Z representa H o un anillo carbo o heterocíclico de 5 o 6 miembros, opcionalmente mono o polisustituido, y  
R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, trifluorometilo, alquilo lineal o ramificado, alcoxi lineal o ramificado o bromovinilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 de fórmula general Ia

15



donde

20 los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón, o un catión metálico monovalente;  
Y representa O o S;

n representa un número entero de 1, 2, 3 o 4;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente los unos de los otros hidrógeno, halógeno, fluorometileno, hidroxilo, azido, ciano, alcoxi lineal o ramificado, acilo, alquilo inferior;

25 R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, trifluorometilo, alquilo lineal o ramificado, alcoxi lineal o ramificado o bromovinilo;

R<sup>6</sup> representa hidrógeno, halógeno, amino, hidroxilo, fosfato, alquilo lineal o ramificado, alcoxi lineal o ramificado o acilo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, donde los restos A representan independientemente los unos de los otros un protón, o un catión metálico alcalino; Y representa O;

n representa un número entero de 2 o 3;

5 R<sup>1</sup> representa hidrógeno, halógeno, azido o hidroxilo;

R<sup>2</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>4</sup> representa hidrógeno, halógeno, o alquilo lineal o ramificado;

R<sup>5</sup> representa hidrógeno o alquilo inferior; y

10 R<sup>6</sup> representa hidroxilo o acilo.

4. El compuesto de la reivindicación 2 o 3, donde

los restos A representan independientemente los unos de los otros Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;

Y representa O;

15 n representa un número entero de 2 o 3;

R<sup>1</sup> representa azido o hidroxilo;

R<sup>2</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno o hidroxilo;

R<sup>4</sup> representa hidrógeno, fluoruro o metilo;

20 R<sup>5</sup> representa hidrógeno; y

R<sup>6</sup> representa hidroxilo.

5. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en medicina humana y animal.

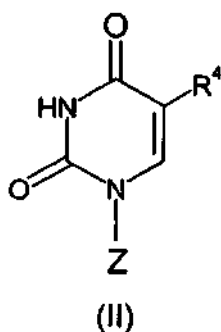
25 6. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de tumores o infecciones virales.

7. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de tumores óseos, incluyendo tumores óseos metastásicos.

30 8. Composición farmacéutica que comprende en un vehículo farmacéuticamente aceptable al menos un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 opcionalmente en combinación con al menos un ingrediente terapéuticamente activo adicional.

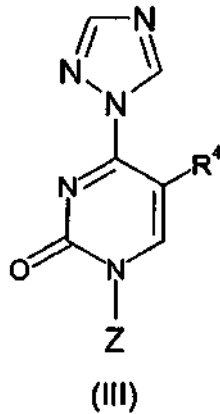
35 9. Método de preparación de un compuesto de fórmula general I como se define en la reivindicación 1, comprendiendo el método

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula general II

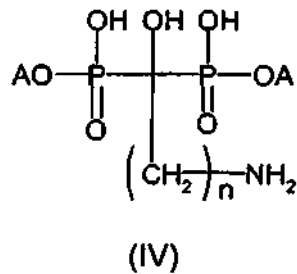


40 donde Z y R<sup>4</sup> son como se han definido anteriormente, con la condición de que si cualquiera de los restos Z y R<sup>4</sup> contiene un grupo hidroxilo dicho grupo hidroxilo es un grupo hidroxilo protegido, con triazol para formar un compuesto de fórmula III

45



b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula III con un aminofosfonato de fórmula general IV



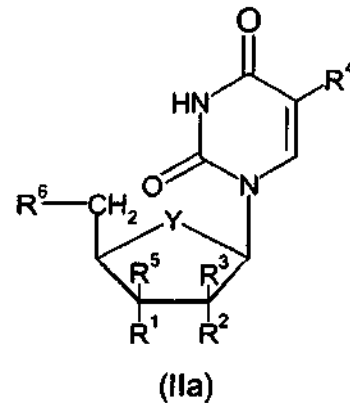
5

c) y aislar el producto deseado opcionalmente después de retirar cualquier grupo protector.

10. Método de preparación de un compuesto de fórmula general Ia como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, comprendiendo el método

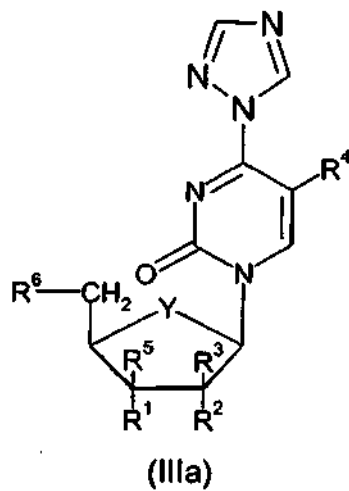
10

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula general IIa

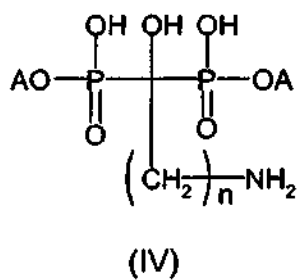


15

donde Y y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son como se han definido anteriormente, con la condición de que si cualquiera de los restos R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> fuera un grupo hidroxilo dicho grupo es un grupo hidroxilo protegido, con triazol para formar un compuesto de fórmula IIIa



b) hacer reaccionar un compuesto de fórmula IIIa con un aminofosfonato de fórmula general IV



5

c) y aislar el producto deseado opcionalmente después de retirar cualquier grupo protector.

10 11. El método de la reivindicación 10 u 11, donde el compuesto de aminofosfonato se selecciona entre alendronato y pamidronato.