

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 054**

51 Int. Cl.:

A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
C07D 235/18 (2006.01)
C07D 403/10 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.1996 E 09000547 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2044938**

54 Título: **Radioprotectores**

30 Prioridad:

28.07.1995 AU pn449295

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

02.06.2015

73 Titular/es:

**PETER MACCALLUM CANCER INSTITUTE
(100.0%)
SMORGON FAMILY BUILDING ST ANDREWS
PLACE
EAST MELBOURNE VIC 3002, AU**

72 Inventor/es:

**MARTIN, ROGER FRANCIS;
KELLY, DAVID PATTERSON y
WHITE, JONATHON MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 537 054 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

Radioprotectores

5 La invención se refiere a radioprotectores, procesos para su preparación y su uso en terapia, particularmente en radioterapia del cáncer en los que se pueden utilizar para proteger materiales biológicos del daño por radiación.

10 En general se acepta que el ADN es la diana crucial de los efectos citotóxicos de la radiación ionizante. Hay pruebas considerables que apoyan la idea de que las rupturas del ADN bicatenario (ds) son particularmente importantes. El daño del ADN resulta de la ionización directa en la molécula de ADN (efecto directo) y por los efectos indirectos mediados por los productos de radiólisis del agua. Se cree que los radicales de carbono centrados en el resto de desoxirribosa del ADN son los precursores de las rupturas de cadena.

15 El tratamiento de tumores con radiación ionizante (denominado a partir de aquí "radioterapia del cáncer") se utiliza extensamente en la terapia del cáncer. La meta de tal tratamiento es la destrucción de las células tumorales y la inhibición del crecimiento de las células tumorales presumiblemente por medio del daño al ADN, mientras que se minimiza el daño a las células y tejidos no tumorales. El daño a las células no tumorales a menudo limita la efectividad de la radioterapia de ciertos tumores, como se ejemplifica por los tumores cerebrales y los tumores de la cavidad abdominal.

20 La radioterapia del cáncer es una actividad muy significativa de salud pública. Dada la incidencia de cáncer en la población y la evaluación internacional de que más del 50 % de los pacientes con cáncer se benefician de la inclusión de la radioterapia en su tratamiento, es probable que más del 10 % de la población experimente radioterapia del cáncer durante su vida.

25 La consideración dominante en la prescripción de dosis de radiación en la radioterapia del cáncer es la evaluación de la tolerancia de la mayoría de los órganos/tejidos normales radiosensibles en el campo del tratamiento. Esta evaluación, junto con la dosis de radiación prevista para erradicar un tumor determina si la estrategia de tratamiento se implanta para la cura o será paliativa. En muchos casos, las dosis tolerables máximas son insuficientes para erradicar el tumor. Este dilema se plasma en el concepto de relación terapéutica, que representa la relación de probabilidades del control del tumor *frente* a morbilidad del tejido normal. Las estrategias para mejorar la relación terapéutica incluyen:

- 35 (a) optimizar la dirección física de la radiación al tumor,
 (b) fraccionar la dosis de radiación; y
 (c) el uso de radiomodificadores.

40 La mejora del suministro físico de la radiación ha tenido un impacto considerable en la práctica de radioterapia. Por ejemplo, el aumento de la energía de los fotones de rayos x desde varios cientos de kilovoltios hasta los haces de megavoltaje actual hace posible que la zona de radiación máxima se fije a profundidades de varios centímetros, mientras que con las máquinas más antiguas, la dosis máxima estaba cerca de la superficie cutánea. Existen varias estrategias más sofisticadas para "ajustar a medida" los haces de tratamiento en varios estadios de desarrollo e implementación. La braquiterapia, el uso de fuentes radioactivas implantadas en lugar de haces externos, es una estrategia más para mejorar la distribución física de la dosis.

45 Casi sin excepción, la radioterapia de haz externo curativa implica el fraccionamiento de la dosis de radiación. Un ejemplo de una programación convencional sería un total de 50 Grays administrada en dos fracciones de 25 Grays. Como las células tienen la capacidad para reparar el daño de la radiación entre las fracciones, el tratamiento fraccionado da como resultado mucha menos muerte celular que una sola dosis de 50 Grays. Aunque las células normales tienen una capacidad de reparación mayor que las células tumorales, el efecto "moderado" del fraccionamiento es más marcado en los tejidos normales. En resumen, el fraccionamiento mejora la relación terapéutica.

50 La exploración de radiomodificadores tales como radioprotectores y radiosensibilizadores se ha enfocado en los sensibilizadores de células hipóxicas tales como el metronidazol y misonidazol. Los radioprotectores han recibido mucha menos atención que los radiosensibilizadores a nivel clínico. La era nuclear ha generado un esfuerzo considerable en el desarrollo de radioprotectores, se sintetizaron y ensayaron más de 4000 productos en el Walter Reed Army Institute of Research en los Estados Unidos de América en los años 60. Con la excepción de un compuesto conocido como WR2727 ninguno de los compuestos era útil en el contexto militar o industrial (es decir, en la protección contra irradiación corporal total) o para la radioterapia del cáncer.

55 Es importante señalar la interacción entre estas tres estrategias para mejorar la relación terapéutica. Una combinación de dirección física, fraccionamiento y radiomodificadores mejorados podría transformar el propósito en algunas situaciones de radioterapia de paliativo a curativo. Para las programaciones curativas, la aplicación satisfactoria de radiomodificadores relajaría la necesidad de fraccionamiento y por lo tanto se reducirían los costes totales del tratamiento, que a largo plazo son proporcionales al número de fracciones de tratamiento por paciente.

Un papel particularmente importante de los radioprotectores ha surgido del reciente reconocimiento de que la repoblación acelerada de las células tumorales durante la radioterapia puede comprometer la eficacia del tratamiento. Las principales consecuencias de esto son las siguientes:

- 5 (i) El desarrollo de programaciones de tratamiento acelerado para reducir el tiempo total de tratamiento con radioterapia. En tales programaciones aceleradas, las reacciones agudas son un problema particular, por ejemplo, la mucositis oral aguda en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello indican una clara necesidad de radioprotectores.
- 10 (ii) El reconocimiento de que la interrupción del tratamiento con radioterapia debido a las reacciones del tejido normal reducirá la probabilidad del control del tumor. El uso de radioprotectores para evitar la interrupción del tratamiento inducida por toxicidad sería claramente beneficioso.

Las propiedades radioprotectoras del ligando Hoechst 33342 del grupo minoritario de unión al ADN se describieron por primera vez por Smith, P.J. y Anderson, C.O.¹, que utilizaron ensayos de supervivencia clonogénica de células cultivadas irradiadas. Young, S.D. y Hill, R.P.² comunicaron efectos similares en células cultivadas, pero extendían sus estudios a experimentos *in vivo*. Concluyeron que la falta de radioprotección en sus experimentos *in vivo* se debía a que se suministraban niveles insuficientes de Hoechst 33342 a las células diana después de la inyección intravenosa. Los hallazgos de Hill y Young resaltan una importante necesidad de radioprotectores eficaces, concretamente potentes. Si el radioprotector es más potente, entonces es más probable que se consigan las concentraciones necesarias en una situación *in vivo*.

Hay otro aspecto a considerar aparte de la potencia. La concentración necesaria para la radioprotección debe ser no tóxica independientemente de la potencia del radioprotector. Si el radioprotector se suministra por vía sistémica, entonces este requisito de falta de toxicidad incluye no solo las células y tejidos a proteger de la radiación, sino que se extiende a la toxicidad del sujeto como un todo. En el caso del Hoechst 33342, su toxicidad limita la extensión a la que es útil como radioprotector.

También hay un problema conceptual sustancial en el uso de radioprotectores en la radioterapia del cáncer. En un intento para disminuir el efecto de la radiación en los tejidos normales por la aplicación de radioprotectores, existe el temor de que algunos radioprotectores alcancen el tumor, comprometiendo de esta manera la muerte de células tumorales. Los radioprotectores existentes, por ejemplo WR2727, son moléculas relativamente pequeñas, que se pueden difundir que no se unen con avidéz a componentes tisulares y por lo tanto pueden penetrar eficazmente a través de las capas celulares, de forma que pueden alcanzar el tumor por medio de la circulación.

Existe una necesidad de radioprotectores que tengan una penetración limitada a través de las capas celulares. Tal propiedad capacita a los radioprotectores para que se puedan aplicar local o tópicamente en los tejidos normales radiosensibles críticos de la vecindad del tumor. La penetración limitada restringe la extensión a la que el radioprotector alcanza el lecho capilar y es captado en la circulación alcanzando de esta manera el tumor por suministro sistémico en concentraciones suficientes para producir una radioprotección significativa al tumor.

La difusión limitada de ligandos de unión al ADN tales como Hoechst 33342 a través de las capas celulares se conoce y se ha explotado en el mapeo de localización de células en esferoides multi-celulares e *in vivo*. Además del acceso restringido al tumor por captación sistémica tras la aplicación local o tópica en tejidos normales, hay una ventaja potencial más de la penetración limitada en el contexto de la radioterapia del cáncer. Esta ventaja surge porque el sistema vascular, en particular las células endoteliales, son dianas críticas que determinan los efectos dañinos de la radiación. Además la mayoría de las células radiorresistentes del tumor son las células viables que están a mayor distancia de los capilares. La radiorresistencia de estas células se debe a su estado hipóxico, que a su vez refleja su lejanía de los capilares.

En consecuencia, los radioprotectores que tienen una difusión limitada, cuando se administran por vía intravenosa, se suministrarán más eficazmente a las células radiosensibles críticas en tejidos animales, que a la subpoblación de células de los tumores (es decir, las células hipóxicas) lo que en general limitaría la eficacia de la radioterapia. Por lo tanto, el uso de tales radioprotectores hace posible que se utilicen dosis de radiación más altas, con mayor posibilidad de destruir las células hipóxicas del tumor.

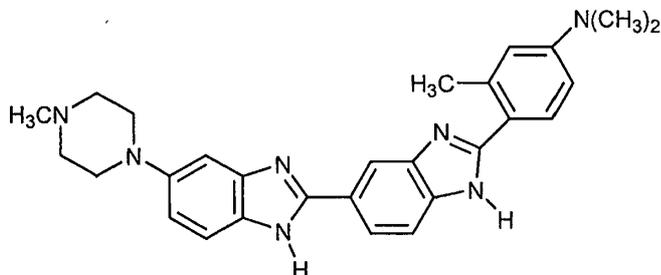
Sin embargo, el potencial de la combinación de estas características radiobiológicas y las características de unión al ADN de los radioprotectores solo pueden ser útiles en la radioterapia del cáncer siempre que exista un requisito fundamental y necesario de los radioprotectores, concretamente que los radioprotectores sean suficientemente potentes para conferir una radioprotección demostrable a concentraciones no tóxicas, cuando se aplican por vía tópica o sistémica. Un requisito más en la práctica es que la extensión de la penetración limitada sea suficiente para evitar una captación sistémica significativa tras la aplicación tópica, pero no tan pronunciada como para evitar que se alcancen concentraciones suficientes en las células que determinan la radiosensibilidad del tejido que se va a proteger de los efectos de la radiación ionizante, por aplicación tópica o local.

En consecuencia, existe un requisito para los radioprotectores que tienen una toxicidad reducida, una potencia radioprotectora aumentada y una penetración limitada a través de las capas celulares que se pueden utilizar en

radioterapia del cáncer, en particular por vía tópica para proteger tejidos tales como la piel, mucosa oral, mucosa esofágica, mucosa rectal, mucosa vaginal y epitelio de la vejiga y por vía parenteral para proteger órganos tales como el pulmón y el cerebro.

5 La presente invención proporciona:

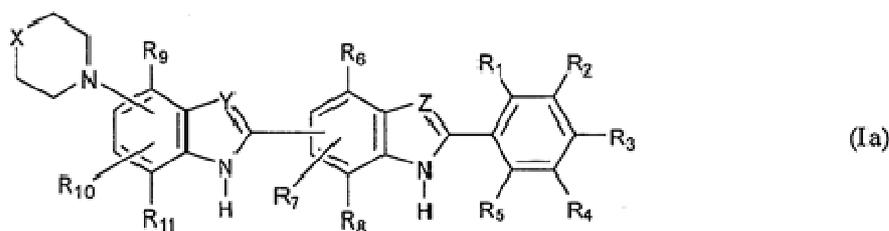
[1] Orto metil para NN dimetilamino Hoechst, que tiene la fórmula:



10 [2] Un compuesto de acuerdo con [1] para su uso en radioterapia del cáncer para minimizar el daño a las células y tejidos no tumorales, en el que el lugar de un tumor se somete a una fuente de radiación ionizante.

15 [3] Un compuesto de acuerdo con [1] para su uso en la protección de un sujeto humano o animal del daño por radiación que resulta de la exposición a la radiación ionizante.

[4] Un compuesto de fórmula (Ia):



20 en la que

- 25 X es NCH₃;
 Y y Z se seleccionan entre N o CH;
 R₃ es N(R)₂ o NHR en el que R es un alquilo de C₁ a C₃₀;
 R₁ es un alquilo de C₁ a C₃₀, un alquenilo de C₂ a C₃₀ u -OR, en el que R es un alquilo de C₁ a C₃₀;
 R₅, R₇ y R₁₀ se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo de C₁ a C₃₀, alquenilo de C₂ a C₃₀ y -OR en el que R es alquilo de C₁ a C₃₀; y
 30 R₂, R₄, R₆, R₈, R₉ y R₁₁ son hidrógeno;
 o una sal y/o tautómero del mismo.

35 [5] Un compuesto de acuerdo con [4] para su uso en radioterapia del cáncer para minimizar el daño a las células y tejidos no tumorales, en el que el lugar de un tumor se somete a una fuente de radiación ionizante.

[6] Un compuesto de acuerdo con [4] para su uso en la protección de un sujeto humano o animal del daño por radiación que resulta de la exposición a la radiación ionizante.

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implica la inclusión de un número entero establecido o grupo de números enteros pero no la exclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros.

45 El término "grupo donante de electrones" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio e incluye opcionalmente un alquilo sustituido, opcionalmente un alquenilo sustituido, NHR o NR₂, y OR, en el que R es hidrógeno u opcionalmente un alquilo sustituido. Preferentemente el grupo donante de electrones es NHR o NR₂. Se postula que la presencia de al menos un grupo donante de electrones aumenta la actividad radioprotectora.

50 El término "grupo con impedimentos estéricos" se utiliza en el presente documento para incluir un grupo voluminoso que restringe estereoquímicamente, por ejemplo, la rotación o la conformación de los compuestos de la presente

invención. Ejemplos de grupos con impedimentos estéricos incluyen los que se han descrito anteriormente como grupos donantes de electrones que se pueden situar, por ejemplo, adyacentes a los enlaces sencillos que unen los anillos de forma que restringen la rotación. Otros grupos con impedimentos estéricos incluyen opcionalmente anillos sustituidos que pueden contener heteroátomos. Se postula que la restricción estereoquímica también aumenta la actividad de radioprotección aumentando la extensión del grupo minoritario que se une al ADN. Este aumento puede conseguirse disminuyendo la extensión de otras formas de unión del ligando a sí mismo, al ADN (formas de unión distintas del grupo minoritario de unión) o a otros componentes celulares. Es posible que algunas de estas otras formas de unión puedan favorecerse por una conformación coplanar del sistema de anillos del radioprotector.

- 5
- 10 Sin el deseo de quedar limitados por teoría alguna se cree que la protección que confieren los compuestos de acuerdo con la invención se consigue por donación de electrones (reducción) del radioprotector a las especies oxidantes inducidas por radiación transitoria en el ADN. Como los radioprotectores pueden contener grupos básicos, se esperaría que la protonación de estos grupos disminuyera sustancialmente esta capacidad de donación de electrones. En este contexto un papel del grupo con impedimentos estéricos, en algunos compuestos, puede ser impedir la formación de la estructura de base conjugada en la que se puede conseguir la estabilización de resonancia por tautómeros en los que los sistemas de anillo son coplanares.
- 15

El término "alquilo" denota una cadena lineal o ramificada de alquilo de C₁ a C₃₀. Ejemplos de alquilo de cadena lineal y ramificada incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, amilo, isoamilo, sec-amilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetilpropilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, heptilo, 5-metilhexilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metilheptilo, 1-metilheptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-metilocilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-etilheptilo, 1-, 2- o 3-propilhexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-etiloctilo, 1-, 2-, 3- o 4-propilheptilo, undecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-metildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-etilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-propiloctilo, 1-, 2- o 3-butilheptilo, 1-pentilhexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- o 4-butiloctilo, 1- o 2-pentilheptilo.

- 20
- 25
- 30 El término "alqueno" denota grupos formados por alquenos de cadena lineal, o ramificados, específicamente alqueno C₂₋₃₀. Ejemplos de alqueno incluyen vinilo, alilo, 1-metilvinilo, butenilo, iso-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, 1-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 1-decenilo, 3-decenilo, 1,3-butadienilo, 1,4-pentadienilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo.

- 35 Las sales de los compuestos de la presente invención son preferentemente farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también se encuadran en el ámbito de la presente invención, mientras que estas sean útiles como intermediarios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amino y alquilamino; sales de adición ácida de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, místico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.
- 40
- 45

El término "tautómero" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio para incluir compuestos de fórmula (Ia) que son capaces de existir en un estado de equilibrio entre dos formas isoméricas. Tales compuestos se pueden diferenciar en el enlace que conecta dos átomos o grupos y la posición de estos átomos o grupos en el compuesto.

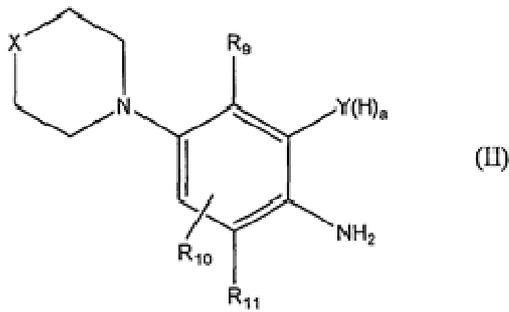
- 50
- Los compuestos de la invención pueden ser eléctricamente neutros o ser policationes con aniones asociados para dar la neutralidad eléctrica. Los aniones asociados adecuados incluyen sulfato, tartrato, citrato, cloruro, nitrato, nitrito, fosfato, perclorato, halosulfonato o trihalometilsulfonato.

- 55
- Un compuesto preferente es "orto metil para dimetilamino Hoechst".

Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (Ia) en la que Y y Z son N comprende o bien:

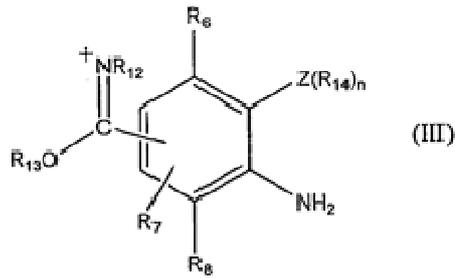
- 60 (A)

(i) acoplar un compuesto de fórmula (II):



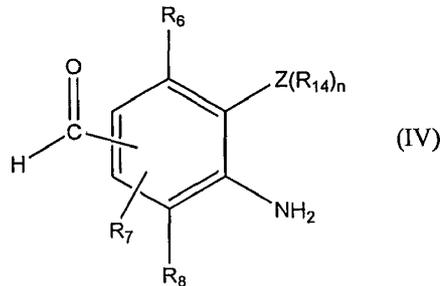
en la que X, R₉, R₁₀ y R₁₁ son como se han definido anteriormente, Y es N y n es 1 o 2 con (a) un compuesto de fórmula (III):

5



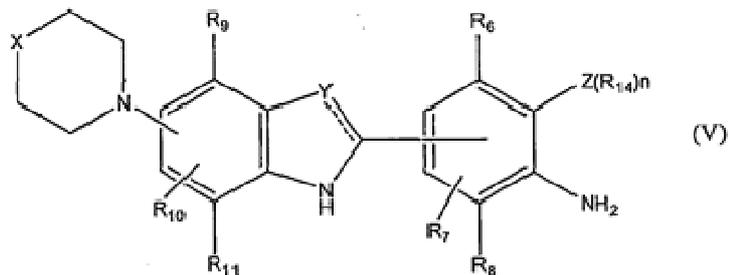
en la que Z es N, R₆, R₇, R₈ y n es como se han definido anteriormente, R₁₂ es un halógeno, R₁₃ es alquilo y R₁₄ es oxígeno, o con (b) un compuesto de fórmula (IV):

10

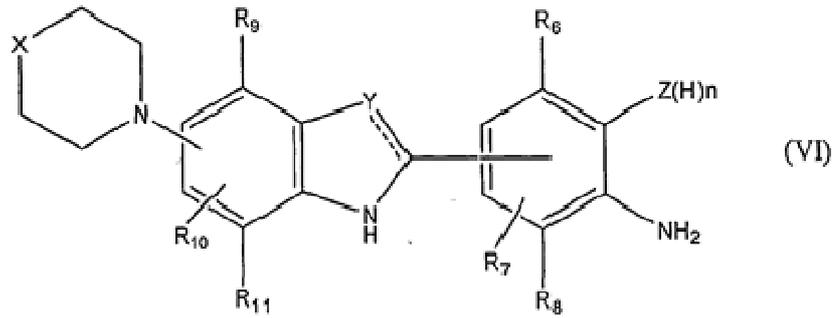


en la que R₆, R₇, R₈ y n son como se han definido anteriormente y R₁₄ es oxígeno; para formar un compuesto de fórmula (V):

15



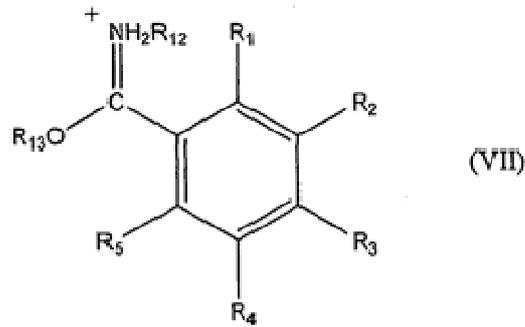
(ii) reducir el compuesto de fórmula (V) para formar un compuesto de fórmula (VI):



en la que X, Y, Z, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ y n son como se han definido anteriormente; y

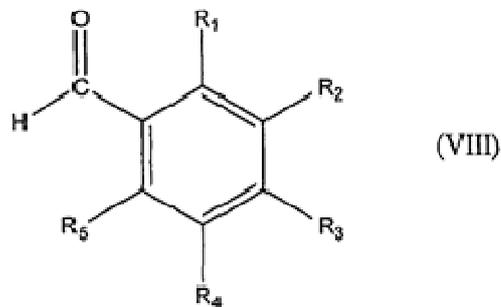
5

(iii) acoplar el compuesto de fórmula (VI) con cualquier compuesto de fórmula (VII):



10

en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₁₂ y R₁₃ son como se han definido anteriormente o un compuesto de fórmula (VIII):

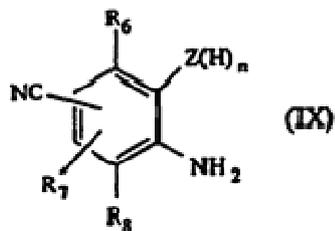


15

en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₁₂ y R₁₃ son como se han definido anteriormente; o

(B)

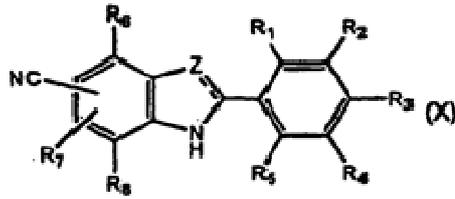
(i) acoplar un compuesto de fórmula (IX):



20

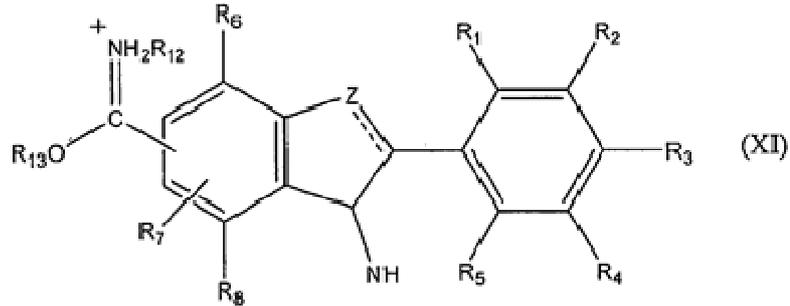
en la que R₆, R₇, R₈ y n son como se han definido anteriormente con un compuesto de fórmula (VIII), en la que R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son como se han definido anteriormente para formar un compuesto de fórmula (X):

25



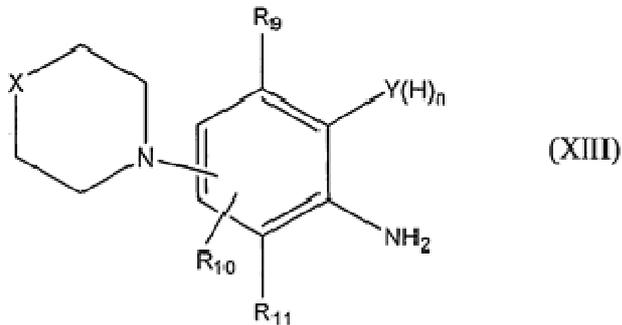
en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ y R₈ son como se han definido anteriormente;

5 (ii) convertir el compuesto de fórmula (X) en un compuesto de fórmula (XI):



en la que Z, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₂ y R₁₃ son como se han definido anteriormente;

10 (iii) acoplar el compuesto de fórmula (XI) con un compuesto de fórmula (XIII)

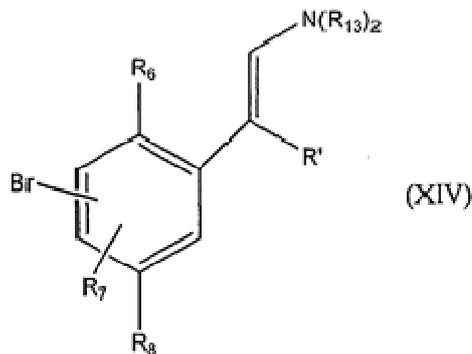


15 en la que X, R₉, R₁₀, R₁₁ y n son como se han definido anteriormente

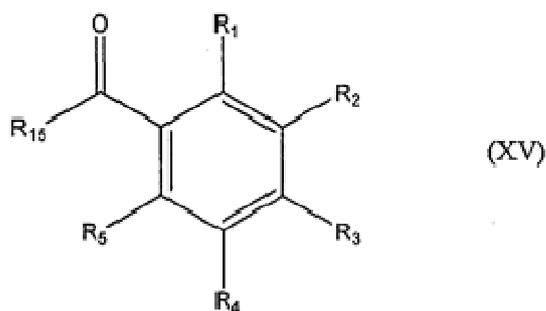
Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (1a) en la que uno de o ambos Y y Z es/son C(R'), en la que R' es H, comprende

20 A

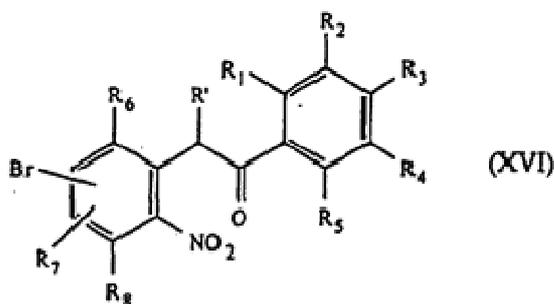
(i) acoplar un compuesto de fórmula (XIV):



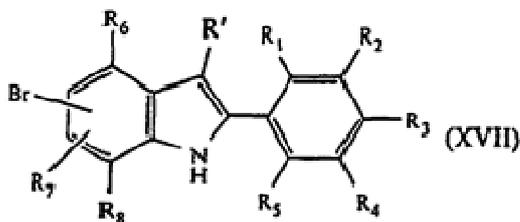
25 en la que R', R₆, R₇, R₈ y R₁₃ son como se han definido anteriormente con un compuesto de fórmula (XV);



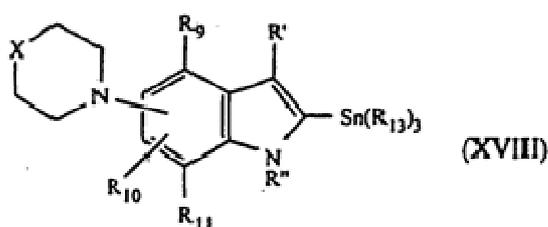
5 en la que R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son como se han definido anteriormente y R₁₅ es un grupo saliente, tal como un cloro, para formar un compuesto de fórmula (XVI):



(ii) ciclar el compuesto de fórmula (XVI) para formar un compuesto de fórmula (XVII):

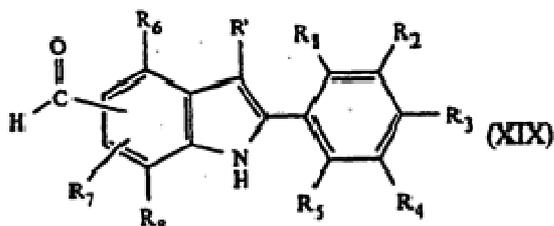


(iii) acoplar el compuesto de fórmula (XVII) con un compuesto de fórmula (XVIII):



15 en la que R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₃ y R' son como se han definido anteriormente y R'' es un grupo protector de nitrógeno tal como un grupo 2-trimetilsililetoximetil (SEM) en presencia de un Pd catalítico seguido por desprotección para formar un compuesto de fórmula (1a) en la que Y es C(R') y Z es C(R'');

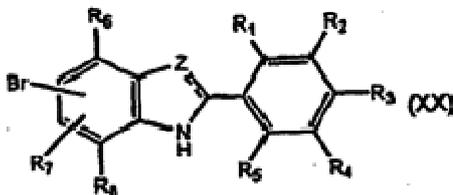
20 o (iv) formular el compuesto de fórmula (XVII) para formar un compuesto de fórmula (XIX):



(v) acoplar el compuesto de fórmula (XIX) con un compuesto de fórmula (II) en la que Y es N para formar un compuesto de fórmula (1a) en la que Y es N y Z es C(R')

5

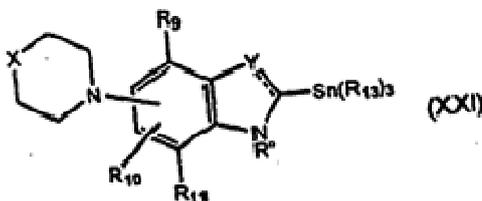
o B (i) acoplar un compuesto de fórmula (XVIII) con un compuesto de fórmula (XX):



en presencia de un Pd catalítico seguido por desprotección para formar un compuesto de fórmula (1a) en la que Y es C(R')

10

o C (i) acoplar un compuesto de fórmula (XXI):



15 con un compuesto de fórmula (XVII) en presencia de un Pd catalítico para formar un compuesto de fórmula (1a) en la que Z es C(R')

La presente invención se refiere a un radioprotector que comprende *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst.

20 La presente invención también se refiere a un método de protección de un sujeto del daño por radiación que comprende la administración de una cantidad eficaz de un *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst al sujeto.

La presente invención además se refiere a un método de radioterapia del cáncer que comprende la administración a un sujeto que necesita tal terapia de una cantidad eficaz de un *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst y someter el lugar del tumor a una fuente de radiación.

25

El sujeto que se protege del daño de la radiación puede ser un ser humano o un animal, tal como un animal doméstico o salvaje, particularmente un animal de importancia económica.

30 Como se utiliza en el presente documento fuente de radiación significa una fuente de radiación ionizante. El daño por radiación es resultado de la exposición a la radiación ionizante. La expresión "radiación ionizante" como se utiliza en el presente documento se refiere a fotones que tienen la energía suficiente para ionizar un enlace, tal como rayos α , β y γ de núcleos radioactivos y rayos x.

35 La expresión "radioterapia del cáncer", se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio e incluye la radioterapia que implica tumores que pueden ser benignos o malignos.

La expresión "Factor de Modificación de Dosis" (DMF) como se utiliza en el presente documento se refiere a la relación de la dosis de radiación necesaria para producir un efecto dado en presencia de protector, respecto a la que se necesita para producir el efecto equivalente en ausencia de protector.

40

La presente solicitud también desvela una composición radioprotectora que comprende un compuesto de fórmula (1a) como se ha definido anteriormente en asociación con un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

45 Los compuestos de la invención se pueden utilizar ventajosamente en terapia en combinación con otros medicamentos, tales como, agentes quimioterápicos, por ejemplo, agentes radiomiméticos que son agentes citotóxicos que dañan el ADN de tal manera que las lesiones producidas en el ADN son similares a las que resultan por la radiación ionizante. Ejemplos de agentes radiomiméticos que producen rupturas de la cadena de ADN incluyen bleomicina, doxorubicina, adriamicina, 5FU, neocarzinostatina, agentes alquilantes y otros agentes que producen aductos de ADN. Se anticipa que los radioprotectores de la presente invención protegerán el ADN del daño de alguno de estos agentes, de la misma manera que protegen contra los efectos de la radiación ionizante. En las aplicaciones clínicas, es improbable que el radioprotector se administre sistémicamente junto con el agente quimioterápico, ya que podría comprometer la acción de este agente sobre el tumor. Sin embargo, hay

50

circunstancias en las que la aplicación tópica en los tejidos con problemas podría ser ventajosa. Por ejemplo, la mucositis oral es un efecto secundario problemático de los agentes citotóxicos, tales como la doxorubicina y la administración del presente radioprotector como enjuague bucal antes de la administración del agente quimioterápico podría mejorar este efecto secundario sin comprometer la acción de este agente sobre un tumor no localizado en la cavidad oral. De manera similar, se podría proteger el tracto gastrointestinal por administración oral, los pulmones por inhalación de un aerosol o la vejiga por un suministro intravesical, por ejemplo, por medio de un catéter del radioprotector. Por lo tanto un método preferente utiliza un compuesto de fórmula (Ia) en conjunto con otro medicamento, tal como un agente radiomimético.

Los compuestos de la invención se pueden conjugar con agentes, por ejemplo, por medio del grupo interactivo, los cuales los suministrarán específicamente en un sitio tumoral deseado. Los agentes adecuados pueden incluir anticuerpos o proteínas, tales como, factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento hematopoyético que hará posible que se produzca radioprotección preferente de células madre hematopoyéticas en el contexto de irradiación total del cuerpo y trasplante de médula ósea.

También hay una aplicación *ex vivo* de los conjugados de los compuestos de la invención en el contexto del trasplante de médula ósea. El trasplante de médula ósea implica en general la obtención y almacenamiento de muestras de médula ósea de un sujeto antes del deterioro de su estado. Se le administra entonces una forma de quimioterapia bastante drástica (es decir, una dosis alta). Esta quimioterapia es tal que sería letal normalmente debido a la destrucción de las células madre normales, pero el sujeto se rescata administrándole sus propias células madre hematopoyéticas. El problema de este procedimiento es que la muestra inicial de células madre se contamina fácilmente con células tumorales y por lo tanto se utilizan varios procedimientos para purgar las preparaciones de médula ósea de células tumorales. Los radioprotectores conjugados con un factor de crecimiento hematopoyético se podrían utilizar en este contexto añadiéndose a una suspensión de células de médula ósea. La suspensión se podría irradiar entonces esperando que las células de médula ósea normales, pero no las células tumorales, se protegieran preferentemente de los efectos destructores de las células de la radiación.

El compuesto de fórmula (Ia) de aquí en adelante denominado "principio activo" se puede administrar para terapia por cualquier vía adecuada, incluyendo la oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intravesical y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraesternal e intradérmica). Preferentemente, la administración será por vía rectal, tópica, vaginal o parenteral, sin embargo se apreciará que la vía preferida variará con el estado y la edad del sujeto, el tejido/tumor que se va a tratar, su localización en el sujeto y el criterio del médico o veterinario. El compuesto de fórmula (Ia) se puede administrar directamente en los tejidos de alrededor o proximales a los tumores que se van a irradiar.

Las composiciones desveladas en el presente documento comprenden al menos un compuesto de fórmula (Ia), junto con uno o más vehículos, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros medicamentos. Cada vehículo, diluyente, adyuvante y/o excipiente debe ser farmacéuticamente "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no ser perjudicial para el sujeto. Las composiciones incluyen las adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intravesical o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes o vehículos sólidos divididos finamente o ambos, y luego si es necesario se da forma al producto.

Las composiciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades individuales tales como en cápsulas, papelillos o comprimidos que contiene cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo se puede presentar también como una embolada, electuario o pasta.

Se puede fabricar un comprimido por compresión o modelado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en forma de fluido libre tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un agente aglutinante (por ejemplo, un diluyente inerte, un desintegrante conservante (por ejemplo, glucolato de almidón sodio, povidona reticulada, carboximetil celulosa reticulada) agente de superficie activa o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o ranurar opcionalmente y se pueden formular de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo con la utilización de, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos se pueden proporcionar opcionalmente con un revestimiento entérico, para producir la liberación en partes del intestino distintas del estómago.

- 5 Las composiciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base de saborizante, habitualmente sacarosa y goma arábica o de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales o pulverizadores que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.
- Para aplicación tópica en la piel, el principio activo puede estar en forma de crema, ungüento, gel, solución o suspensión.
- 10 Para la aplicación tópica en el ojo, el principio activo puede estar en forma de una solución o suspensión en un vehículo adecuado estéril acuoso o no acuoso. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo, tampones, conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas, tales como acetato o nitrato fenil mercúrico, cloruro de benzalconio o clorhexidina y agentes espesantes tales como hipromelosa.
- 15 Las composiciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ordinaria pero líquido a la temperatura rectal y que por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el principio activo. Tales excipientes incluyen manteca de cacao o un salicilato.
- 20 Las composiciones nasales se pueden presentar tópicamente como gotas nasales o pulverizadores o por vía sistémica en una forma adecuada para la absorción por medio de la mucosa nasal y/o células alveolares en los pulmones.
- 25 Las composiciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar como formulaciones en supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o pulverizadores que contienen además del principio activo tales vehículos como los que se sabe en la técnica que son apropiados.
- 30 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la composición isotónica con la sangre del supuesto sujeto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en envases sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en una forma desecada por congelación (liofilizada) que necesita solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la manera descrita anteriormente.
- 35 Las composiciones de dosificación unitaria preferentes son las que contienen una dosis o unidad diaria, una sub-dosis diaria, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o una fracción adecuada de la misma, de un principio activo.
- 40 El compuesto de fórmula (la) también se puede presentar para su uso en forma de composiciones veterinarias, que se pueden preparar, por ejemplo, por métodos que son convencionales en la técnica. Ejemplos de tales composiciones veterinarias incluyen las que se adaptan para:
- 45 (a) administración oral, aplicación externa, por ejemplo brebajes (por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); comprimidos o bolos; polvos, gránulos o microgránulos para mezcla con piensos; pastas para aplicación en la lengua;
- (b) administración parenteral por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ejemplo, como una solución o suspensión estéril; o (si es apropiado) por inyección intramamaria en la que la suspensión o solución se introduce en la ubre por medio del pezón.
- 50 (c) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o pulverización aplicados en la piel; o (d) por vía intravaginal, por ejemplo, un supositorio vaginal, crema o espuma.
- 55 Se debería entender que además de los ingredientes mencionados en particular anteriormente, las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de composición en cuestión, por ejemplo, las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes tales como aglutinantes, edulcorantes, espesantes, agentes saborizantes, agentes desintegrantes, agentes de revestimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardantes en el tiempo.
- 60 Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen el almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, saborizante de fresa, naranja, frambuesa. Los agentes de revestimiento adecuados incluyen polímeros y copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno, o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato magnésico, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes retardantes en el tiempo incluyen gliceril monoestearato o diestearato de glicerilo.
- 65

La aplicación primaria del radioprotector de la presente invención es en radioterapia del cáncer. Muchos de los tejidos normales que tienen un problema en la radioterapia tales como la piel, la mucosa oral, mucosa esofágica, mucosa rectal, mucosa vaginal y epitelio de la vejiga se pueden proteger tópicamente con los radioprotectores de la presente invención.

5 Hay dos escenarios distintos de tales radioprotectores tópicos. En primer lugar, existe un potencial para disminuir las reacciones agudas dolorosas que se producen a menudo en estos tejidos. Aunque estas reacciones agudas pueden ser transitorias, su mejoría obviamente sería beneficiosa para un sujeto. Un escenario diferente es la situación en la que las reacciones agudas limitan la dosis de radiación que se pueden suministrar al tumor. Un ejemplo es el del régimen de fraccionamiento acelerado, en el que las reacciones agudas pueden ser limitantes de la dosis. Por lo tanto, la aplicación de radioprotectores, podría posibilitar el uso de dosis de radiación más alta, y por tanto aumentar las perspectivas de curación.

15 Aparte de la aplicación tópica, las propiedades de distribución farmacológica de los radioprotectores de la presente invención ofrecen otras vías potenciales para conseguir una mejor relación terapéutica. Ejemplos incluyen los tumores en el cerebro y el pulmón.

20 En el caso del cerebro, se cree que las células endoteliales son una importante diana radiosensible en términos de efectos perjudiciales de la radiación en el tejido cerebral normal. La administración del radioprotector de la presente invención protegería las importantes células endoteliales en el cerebro normal. Las células correspondientes del tumor también se protegerían, pero estas células están bien oxigenadas y por lo tanto son las células más radiosensibles del tumor. Las células más distantes en el tumor que son hipóxicas por lo tanto estarían fuera del alcance del radioprotector. Esto significa que las células endoteliales y las células óxicas (radiosensibles) del tumor se protegerían igualmente. Esta radioprotección posibilitaría entonces el uso de una dosis de irradiación más alta lo que aumentaría la probabilidad de eliminar las células hipóxicas del tumor. El hecho de que las células endoteliales del tejido tumoral y normal se afecten igualmente no tiene impacto sobre la relación terapéutica. Se produce un aumento en la relación terapéutica debido al aumento de la destrucción de las células tumorales hipóxicas, sin menoscabo en términos de daño del tejido normal.

30 En el caso de tumores en el pulmón, el radioprotector de la presente invención se suministraría a las células alveolares. Aunque las células endoteliales del tumor de pulmón también se pueden proteger, no sucede lo mismo en las células más distantes en el tumor. Además, la circulación de algunos tumores pulmonares no se proporciona por la arteria pulmonar sino por la circulación bronquial, a la que no se accede hasta la siguiente pasada del radioprotector en la circulación y por tanto se expone a concentraciones más bajas.

35 La dirección de radioprotectores también puede conseguir mejores relaciones terapéuticas en radioterapia. Un ejemplo adecuado es la conjugación del radioprotector de la presente invención con el factor de crecimiento hematopoyético para conseguir una radioprotección preferente de las células madre hematopoyéticas en el contexto de la irradiación total del cuerpo y el trasplante de médula ósea.

40 Fuera del contexto de la radioterapia del cáncer, los radioprotectores de la presente invención se podrían utilizar de manera profiláctica en situaciones de alto riesgo de radiación. Por ejemplo, el conjugado con factor de crecimiento hematopoyético que se ha descrito anteriormente se podría administrar para este fin.

45 La invención se describirá ahora en referencia a los siguientes Ejemplos.

En los Ejemplos, se hará referencia a las figuras adjuntas en las que:

50 La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de Hoechst 33258 (\diamond), Hoechst 33342 (∇) y *para* dimetilamino Hoechst (\circ) sobre la supervivencia de células V79 bien solos o en combinación con irradiación de 12 Gy;

55 La Figura 2 es un gráfico que muestra la supervivencia de las células V79 tras el tratamiento con Hoechst 33258 (\diamond), Hoechst 33342 (∇) y *para* dimetilamino Hoechst (\circ) con irradiación (12 Gy) y el efecto de la concentración nuclear del radioprotector;

60 La Figura 3 es un gráfico que muestra las curvas de supervivencia a continuación del tratamiento con Hoechst 33342 (21 μ M - \square), *para* NNdimetilamino (84 μ M - Δ), *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst (30 μ M - \bullet) y controles sin tratar (\circ);

La Figura 4 es un gráfico de la dosis de radiación frente a las muertes acumuladas tras irradiación bilateral de pulmones de ratón para Hoechst 33342 (\square), *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst (\blacktriangle) y controles sin tratar (\blacksquare);

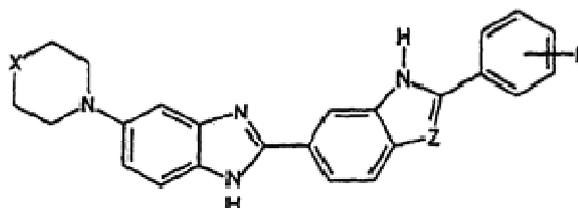
65 La Figura 5 es un gráfico de la dosis de radiación frente a la tasa respiratoria máxima para *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst (\bullet) y controles sin tratar (\circ); y

La Figura 6 es un gráfico de dosis frente a densidad celular (células endoteliales de cerebro de ratón) para Hoechst 33342 (○) e irradiación solo de controles (□).

En los Ejemplos también se utilizan las siguientes abreviaturas:

Hoechst 33258 - 4-hidroxi-1-{5'''-(4'''-metilpiperazin-1'''-il) benzimidazol-2''-il} benzimidazol-2'-il} benceno; y
Hoechst 33342 - 4-etoxi-1-{5'''-(4'''-metilpiperazin-1'''-il) benzimidazol-2''-il} benzimidazol-2'-il} benceno.

En los Ejemplos se preparó el siguiente compuesto.



Compuesto N°	Z	R	X
1	N	2-Me, 4-NMe ₂	NMe

Ejemplo de referencia 1 - Preparación de 4-dimetilamino-2-metilbenzaldehído (Compuesto de Referencia 1)

El compuesto de referencia 1 se obtuvo por medio del procedimiento de Campaigne *et al*⁶. Se añadió con cuidado oxiclورو de fósforo (4,17 g, 27,22 mmol) a una solución enfriada de DMF (7,24 g, 99 mmol). Se añadió 3-Dimetilaminotolueno² (3,66 g, 27,22 mmol) en DMF gota a gota y se calentó la mezcla a 80-90 °C durante 2 horas. Se enfrió la solución, se vertió en hielo y se neutralizó a un pH de 6-8 con acetato sódico. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó para conseguir el Compuesto de Referencia 4 como un sólido amarillo claro (2,58 g, 58 %) p.f. 66-68 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,62, s, 3H; 3,06, s, 6H; 6,425, d, J 2,53 Hz, 1H; 6,56, dd, J 2,53, 8,67 Hz, 1H; 8,65, d, J 8,67 Hz, 1H; 9,97, s, 1H.

Ejemplo 1 - Preparación de *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst (Compuesto 1)

(a) Una diamina aromática que tenía un sustituyente N-metilpiperazina se acopló a un imino éter para conseguir una benzimidazol nitro amina. Se llevó a cabo la reducción de la benzimidazol nitro amina inmediatamente antes de su uso por hidrogenación catalítica sobre paladio o carbono. Una mezcla de metanol/acetato de etilo al 30 % demostró que era el sistema de disolvente óptimo para esta reducción, ya que el alcohol solo daba como resultado la formación de cantidades excesivas de productos de oxidación/descomposición, aunque el uso de acetato de etilo daba lugar a tiempos de reacción excesivamente largos y baja solubilidad. La benzimidazol diamina se acopló entonces al Compuesto de Referencia 1 para conseguir el Compuesto 1.

(b) Se añadió a un 2-amino-4-[5'-(4''-metilpiperazin-1''-il) benzimidazol-2 il] anilina (915 mg, 2,84 mmol) recién preparada en etanol (13 ml) una solución de complejo de aldehído tiosulfato (preparado añadiendo tiosulfato sódico (810 mg, 4,26 mmol) en etanol/agua (4,5:4,5 ml) a una solución refluente de 4-N,N-dimetil-2-metilbenzaldehído (695 mg, 0,208 mmol) en etanol (13,7 ml)). La solución resultante se calentó a reflujo durante 24 h. La solución se enfrió, se basificó con hidróxido amónico y se puso en el congelador durante varias horas. La solución se filtró y el sólido se lavó con agua, dietil éter y el producto se secó al vacío. El material en bruto se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex LH-20, metanol/ácido acético, 98:2) para dar un compuesto titulado como un sólido amarillo al secarse (1,05 mg, 79 %) p.f. 198 °C (descomp.), RMN ¹H [400 MHz, CD₃OD+CF₃CO₂H] δ 8,55, d, J 1,5 Hz, 1H, H4'; 8,245, dd, J 8,6, 1,65 Hz, 1H, H6"; 8,05, d, J 8,7 Hz, 1H, H7"; 7,765, d, J 9 Hz, 1H, H7"; 7,715, d, J 8,6 Hz, 1H, H5; 7,45, dd, J 9,1, 2,2 Hz, 1H, H6"; 7,365, d, J 2,2 Hz, 1H, H4"; 6,835, dd, J 8,85, 2,45 Hz, 1H, H4; 6,805, d, J 2,2 Hz, 1H, H3; 3,975, s a, J 13,5 Hz, 2H; 3,685, s a, J 12 Hz, 2H; 3,345, dt a, J 12,25, 2,35 Hz, 2H; 3,21, dt a, J 12,775, 2,3 Hz, 2H; 3,12, s, 6H, N(CH₃)₂; 3,0, s, 3H, NCH₃; 2,66, s, 3H, ArCH₃.

Ejemplo 2 - Estudios de cultivo celular

(i) Estudios de Citotoxicidad

Se mantuvieron monocapas de células V79 en matraces de plástico Falcon de 25 cm² en medio alfa-MEM con un 10 % de suero fetal bovino (FCS). Los cultivos en fase log se trataron añadiendo la cantidad necesaria de Hoechst 33258, Hoechst 33342 o para dimetilamino Hoechst (25-500 nmoles) disueltos en 50 µl de ácido acético 10 µM en metanol al 50 %. Los matraces se invirtieron inmediatamente antes de añadir el compuesto para asegurar en mezclado completo del compuesto con el medio, antes de ponerlo en contacto con la monocapa.

Tras dos horas de incubación a 37 °C, las células se recolectaron y ensayaron respecto a la supervivencia clonogénica. La eficacia de la colocación en placa del control, de células sin tratar era del 70-80 %. Todos los resultados de supervivencia clonogénica se expresan con respecto a los controles sin tratar.

5 (ii) Irradiaciones

Los cultivos se irradiaron en un ¹³⁷Cs Gammacell-40 (Atomic Energy of Canada Ltd.) a una tasa de dosis de 0,84 Gy/min. Las células tratadas con ligando se irradiaron dos horas antes de comenzar con la exposición al ligando. En todos los casos, la supervivencia clonogénica se retrasó hasta una hora después de completar la irradiación.

(iii) Medición de la concentración del ligando en los núcleos

15 Dos horas después de la adición del ligando, las monocapas se trataron con pronasa. El tratamiento con pronasa se terminó por dilución en medio enfriado en hielo con un 10 % de FCS, y se lavaron una vez las células con PBS/EDTA frío, y otra vez con tampón nuclear frío (MgCl₂ 5 μM, tampón Tris 10 μM a pH 7,4, NaCl 0,14 M).

20 Los núcleos se prepararon suspendiendo las células en tampón nuclear frío que contenía un 1 % de Triton x100. Los núcleos aglomerados se resuspendieron en 1 ml de tampón de sonicación (KCl 20 μM, TRIS 20 μM a pH 7,4, NaCl 0,14 M), se sonicaron (Disruptor celular Sonificador Branson Modelo B 15; 10 seg, a un ajuste del control de salida de 3,5) y se añadieron 40 ml de SDS al 20%. La concentración de ligando se determinó por espectrometría, utilizando un lisado sonificado a partir de células sin tratar como blanco. Las referencias se prepararon a partir de los lisados de control, por la adición de una cantidad conocida del ligando.

25 (iv) Experimentación

(a) Efecto de la concentración de fármaco sobre la supervivencia de las células V79, o bien solo o en combinación con irradiación de 12 Gy

30 Se añadió Hoechst 33258, Hoechst 33342 o *para* dimetilamino Hoechst al medio de monocapas de células V79, a las concentraciones finales indicadas. Algunos cultivos (curvas inferiores) se irradiaron 2 horas después de la adición del fármaco; los otros no se irradiaron (curvas superiores). Todos los cultivos se dejaron en reposo durante una hora más antes de colocarlas en placas para la supervivencia clonogénica. Los resultados se muestran en la Figura 1.

(b) Supervivencia de las células V79 tras el tratamiento con el fármaco, con irradiación (12 Gy) y el efecto de la concentración nuclear del radioprotector

40 Los cultivos monocapa de células V79 se expusieron a varias concentraciones de los tres radioprotectores como se ha descrito anteriormente en (a). Tras dos horas, las células se refrescaron y se mantuvieron en frío durante el aislamiento de los núcleos, utilizando 0,08 % de w.v. Triton X-100. Tras el recuento de una alícuota de suspensión nuclear, se extrajeron los ligandos y se cuantificaron por espectrometría y se calculó el contenido nuclear. Los resultados de supervivencia que se muestran en la parte inferior de la Figura 1 se representaron utilizando los datos de captación nuclear y los resultados se muestran en la Figura 2.

(c) Curvas de supervivencia

50 Los cultivos de células V79 que se habían tratado como se ha descrito anteriormente en (a) con Hoechst 33342, 21 μM, *para* dimetilamino Hoechst 84 μM y *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst 30 μM y los controles sin tratar se irradiaron a las dosis indicadas (¹³⁷Cs-γ) y se determinó la supervivencia clonogénica.

Resultados

55 La Figura 1 muestra los efectos de la concentración de protector añadida sobre la citotoxicidad (parte superior), y sobre la supervivencia tras una sola dosis de 12 Gy (¹³⁷Cs-γ). El Hoechst 33342 llega a ser claramente citotóxico a concentraciones por encima de 20-30 μM, mientras que el dimetilamino Hoechst no tenía efecto sobre la supervivencia hasta 100 μM. Para los cultivos que se irradiaron con 12Gy, las concentraciones crecientes de los ligandos daban como resultado radioprotección creciente hasta que se encontraron concentraciones citotóxicas.

60 Con el fin de comparar la potencia radioprotectora de los ligandos, se ha hecho un intento para medir la concentración de ligandos en el núcleo de las células en el momento de la irradiación. Las células tratadas con ligando se trataron con pronasa y se trataron con un detergente enfriado en hielo para preparar los núcleos aislados. Los ligandos se extrajeron de los núcleos y se ensayaron espectrofotométricamente, y los resultados se expresaron en términos de captación por 10⁶ núcleos. Esto permitía entonces expresar la supervivencia tras 12 Gy en términos

de contenido nuclear de los radioprotectores. Los resultados se muestran en la Figura 2 y sugieren que el *para* dimetilamino Hoechst es un radioprotector más potente.

Las curvas de supervivencia en la Figura 3 muestran la mejoría progresiva en la actividad radioprotectora, en términos de factores de modificación de dosis (DMF), desde:

- 5
- Hoechst 33342 (DMF 1,3), a
 - *para* NNdimetilamino Hoechst (DMF 1,7), a
 - *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst (DMF 2,1).
- 10 En particular, la potencia del *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst destaca en comparación con el Hoechst 33342, dado la similitud de las concentraciones utilizadas (30 μ M y 21 μ M, respectivamente).

Esta potencia de los nuevos radioprotectores con respecto a los radioprotectores existentes se demuestra en la Tabla 1.

15

Tabla 1

Línea celular	Radioprotector	Concentración	DMF
HT29	Hoechst 33342	8,7 μ M	1,5
V79	Hoechst 33342	21 μ M	1,3
V79	<i>para</i> NN dimetilamino Hoechst	84 μ M	1,7
V79	<i>orto</i> metil <i>para</i> NN dimetilamino Hoechst	30 μ M	2,1
CHO	WR1065	4 mM	1,9

Ejemplo 3 - Estudios en cultivo celular

- 20 La actividad radioprotectora de *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst (Compuesto 1) se comparó con el Hoechst 33342 de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 5 anterior. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

25

Tabla 2

Protector solo (sin irradiación)	Solo irradiación (12 Gy)	Protector más irradiación (12 Gy)	Factor de Protección
Compuesto 1 (20 μ M):			
0,63	0,036	0,145	4,0
0,88	0,028	0,12	4,3
0,71	0,034	0,15	4,4
Hoechst 33342 (21 μ M):			
0,80	[0,022]	0,05	2,3
0,87	[0,022]	0,06	2,7
0,76	[0,022]	0,051	2,3
<i>para</i> nitro Hoechst (20 μ M):			
0,89	[0,022]	0,011	[0,5]*

* Un factor de protección < 1 denota sensibilización más que protección.

- 30 Las primeras tres columnas muestran la fracción de supervivencia respecto a la de las células de control sin tratar. Cada fila representa un experimento por separado y las figuras son las medias de duplicados. Las cifras entre corchetes son la media de varios resultados de varios experimentos realizados durante el periodo relevante. El factor de protección es la relación entre las fracciones de supervivencia de las células irradiadas, con y sin protector.

- 35 Los resultados de la Tabla 2 demuestran el aumento de la actividad radioprotectora del compuesto con restricción de la rotación por el grupo *orto* metilo. Esta característica diseñada de restricción estereoquímica, además de favorecer el modo de unión del grupo minoritario, también puede tener la ventaja de reducir la unión de los protectores a componentes no ADN de la célula, tales como proteínas y lípidos.

- 40 La Tabla 2 también muestra la actividad radiosensibilizante del *para* nitro Hoechst. Se deduce de este resultado que la incorporación de sustituyentes donantes de electrones tales como los grupos dimetilamino aumenta la actividad radioprotectora y que por el contrario la incorporación de los sustituyentes que retiran electrones (tales como un grupo nitro) disminuirá la actividad radioprotectora.

Ejemplo 4 - Modelo de pulmón de ratón

Descripción del modelo

5 La irradiación del pulmón de ratón, a dosis apropiadas, da como resultado la pérdida fatal de la función pulmonar. La aparición del daño se señala por un aumento de la tasa respiratoria. La dosis respuesta y características cinéticas de la pérdida de la función pulmonar después de la irradiación de ambos pulmones varía entre las diferentes estirpes de ratón.

10 Detalles experimentales

Los procedimientos de irradiación y la medición de la tasa respiratoria fueron esencialmente como los que se describen en Travis *et al*³. Se anestesiaron y se irradiaron grupos de 5-6 ratones machos DBA/2J con rayos x a 250 kV (dosis única) utilizando una guía que protegía todo el cuerpo excepto ambos pulmones. Se utilizó una tira de plomo en la línea media para proteger la médula espinal entre los pulmones. Algunos ratones recibieron una inyección intravenosa (vena de la cola) de Hoechst 33342 o de *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst (2 mg/25 g), 30 minutos antes de la irradiación.

20 A intervalos semanales desde las 4-6 semanas post-irradiación, se midió la tasa respiratoria de cada ratón. El ratón se colocó en una pequeña cámara equipada con un micrófono y se analizó la producción en un PC. Se determinó la media de tasa respiratoria para cada 3 periodos de 2 segundos y la media de estas lecturas se registró como la tasa respiratoria. Las tasas respiratorias registradas para cada grupo de ratones se promediaron y se calculó el error estándar.

25 Se controlaron los signos de insuficiencia respiratoria diariamente de todos los ratones (aspecto encorvado, pelo erizado), prestando una atención especial a los ratones que presentaban una tasa respiratoria elevada.

30 La actividad radioprotectora *in vivo* del Hoechst 33342 y *orto* metil *para* dimetilamino Hoechst se ha demostrado en modelos de pulmón de ratón. Esto demuestra claramente que se puede suministrar un radioprotector en concentraciones suficientes a las células críticas en el pulmón (es decir, las células que determinan radiosensibilidad de la función pulmonar) por medio de inyección intravenosa.

35 Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 4 que muestra las muertes acumuladas a las 15 semanas tras la irradiación bilateral de los pulmones de ratón. Se administró el radioprotector (2 mg/25 g de ratón) 30 minutos antes de la dosis única de irradiación.

40 Este desplazamiento (a la derecha) de las curvas de respuesta a la dosis para los ratones tratados con Hoechst 33342 es una clara demostración de radioprotección. Basándose en la comparación de los valores de DE₅₀, el factor de modificación de la dosis es aproximadamente de 1,2. También está claro que el *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst es incluso más eficaz (1,35).

45 Los resultados de la tasa respiratoria para un experimento aparte se muestran en la Figura 5. En este experimento la tasa respiratoria máxima registrada para cada animal hasta las 24 semanas se utilizó para calcular la media de cada grupo. Esta figura muestra un DMF de 1,4 para el *orto* metil *para* NNdimetilamino Hoechst.

Ejemplo 5 - Estudios en piel de cerdo

50 El modelo de piel de cerdo se describe en J.W. Hopewell⁴. Las similitudes estructurales entre la piel humana y de cerdo sostienen la relevancia del modelo.

Aunque algunos estudios en piel de cerdo implican irradiación de haz externo, una fuente de radiación particularmente conveniente se basa en discos que contienen isótopos β-emisores, habitualmente ⁹⁰Sr. Las fuentes se pueden agarrar a la piel, o para dosis más altas, pegar con cinta adhesiva al animal, durante los periodos de tiempo apropiados para suministrar la dosis necesaria. Los discos tienen habitualmente aproximadamente 2 cm de diámetro de forma que se puede colocar una matriz de diferentes dosis en los costados de un solo animal.

60 Las reacciones "agudas" (3-9 semanas tras la irradiación) resultan del daño por radiación de las células basales de la epidermis, y se manifiesta como eritema, y descamación seca y húmeda. Las reacciones "tardías" (10-16 semanas) que resultan de los efectos de la radiación en el tejido conjuntivo dérmico vascular, se caracterizan por un eritema malva oscuro y necrosis. Se describe también el sistema de puntuación.

65 Los radioprotectores se formularon en una crema de propilenglicol que contenía un 10 % de DMSO. La extensión y características cinéticas de penetración se continuaron con microscopía de fluorescencia de secciones de piel congeladas, para hacer posible la optimización del suministro.

Las curvas de respuesta a la dosis de radiación se construyeron solo para campos de radiación. Los resultados de los campos con cremas radioprotectoras se muestran en la Tabla 3 a continuación, con los respectivos controles solamente con crema (vehículo). La disminución en extensión de la reacción cutánea para los campos de ensayo es evidente.

5

Tabla 3

Dosis (Gy)	Crema* (0,15 g/campo) Principio Activo	Conc. (µg/g)	Campos que muestran descamación húmeda (10 semanas post-Irr.)	
			n°	%
36	blanco	-	5/7	71 %
36	Hoechst 33342	5000	3/7	43 %
36	para dimetilamino Hoechst	5000	4/7	57 %
40	blanco	-	7/7	100 %
40	Hoechst 33342	500	4/6	83 %
40	sin crema	-	7/8	88 %
40	metil para dimetilamino Hoechst	5000	4/8	50 %
44	"	5000	4/8	50 %

* La crema se preparó con los siguientes ingredientes como se ha indicado:

Crema Cetomacrogol acuosa

10 Crema no iónica
Crema de Sorboleno

Cera emulsionante Cetomacrogol.....	15
Parafina Líquida (por peso).....	10
Vaselina blanca.....	10
Clorocresol.....	0,1
Propilenglicol.....	5
Agua purificada, recién hervida y enfriada.....	hasta 100

15 La cera emulsionante cetomacrogol se funde con las parafinas a aproximadamente 70 °C. El clorocresol y el propilenglicol se disuelven en aproximadamente 50 partes del agua purificada calentada a aproximadamente la misma temperatura. Los componentes se mezclan entonces, se ajustan al peso, y se agitan hasta que se enfría.

Ejemplo 6 - Protección de las células endoteliales de cerebro de ratón

20 La irradiación del cerebro de roedores da como resultado la pérdida de un subgrupo de células endoteliales cerebrales a las 24 horas tras la irradiación. La Figura 6 muestra la extensión de la pérdida de las células endoteliales del cerebro de ratón, con dosis de radiación crecientes (en una única dosis), y se compara los controles con solo irradiación (□) con los resultados para los ratones que se protegieron con una inyección intravenosa de Hoechst 33342 (80 mg/kg) 10 minutos antes de la irradiación (○).

25 Se valoró el número de células endoteliales como ha descrito Lyubimova *et al.* Cada punto representa la media de 3-4 ratones; se evaluaron 3 secciones para cada animal, se puntuaron un total de 30 campos de cada sección, y la figura indica el número medio de células por campo. Las barras de error indican los errores estándar.

30 Dada la rapidez de la pérdida de células (en 24 horas), se postula que un subgrupo de células endoteliales particularmente sensible experimenta apoptosis en respuesta a la radiación, y que el tratamiento radioprotector disminuye sustancialmente la radiosensibilidad de ese subgrupo.

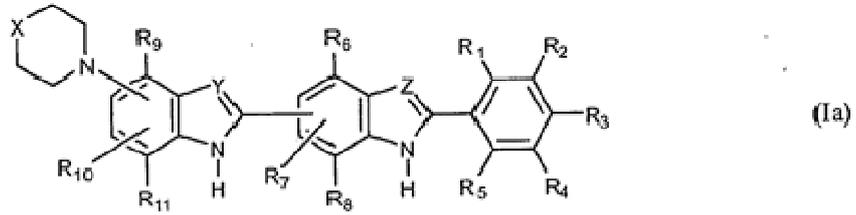
Referencias

- 35
1. Smith, P.J. y Anderson, C.O., *Int. J. Radial. Biol.*, 46, 331 (1984).
 2. Young, S.D. y Hill, R.P., *Brit. J. Cancer*, 60, 715-721 (1989).

3. Travis, E.L., Down I.D., Holmes S.J. y Hobson B., "Radiation pneumonitis and fibrosis in mouse lung assayed by respiratory frequency and histology", *Radiat. Res.* 84, 133-143 (1980).
- 5 4. van den Aardweg G.J.M.J., Hopewell J.W. y Simmonds R.H., *Radiother. Oncol.* 11,73-82 (1988).
5. Campaigne, E., Archer, W.L., *Org. Synth. Coll.*, Vol. 4,331.
6. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Longman Scientific and Technical, Quinta edición, 1989, 905.
- 10 7. Moyer, M.P., Shiurba, J.F., Rapoport, H., *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 5106.
8. Kosuge, T., Ishida, A., Inaba, A., Nukaya, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33,1414.
- 15 9. Garcia, E.E., Fryer, R.I., *J. Heterocyclic Chem.*, 1974, 11, 219.
10. Kelly, D.P., Bateman, S.A., Martin, R.F., Reum, M.E., Rose, M., Whittaker, A.R.D., *Aust. J. Chem.*, 1994, 47, 247.
- 20 11. Withers HR y Elkind MM, "Microcolony survival assay for cells of the intestinal mucosa exposed to radiation".
12. Lyubimova N.V., M.K. Levitman, E.D. Plotnikova y L.K. Eidus, *Brit. J. Radio.* 64 934-40 (1991)].

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (Ia):

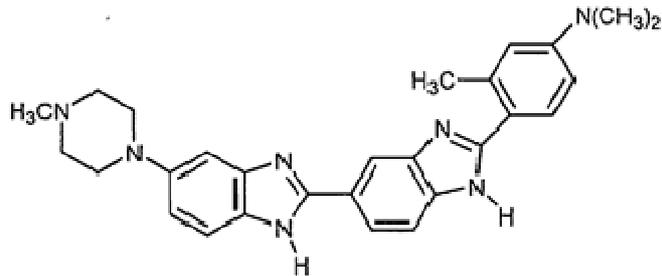


5

en la que

- 10 X es NCH₃;
 Y y Z se seleccionan entre N o CH;
 R₃ es N(R)₂ o NHR en el que R es un alquilo de C₁ a C₃₀;
 R₁ es un alquilo de C₁ a C₃₀, un alquenilo de C₂ a C₃₀ u -OR, en el que R es un alquilo de C₁ a C₃₀;
 R₅, R₇ y R₁₀ se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo C₁ a C₃₀, alquenilo C₂ a C₃₀ y -OR en el que R es alquilo C₁ a C₃₀; y
 15 R₂, R₄, R₆, R₈, R₉ y R₁₁ son hidrógeno;
 o una sal y/o tautómero del mismo.

2. Un Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es *Orto* metil *para* NN dimetilamino Hoechst, que tiene la fórmula:



20

3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en radioterapia del cáncer para minimizar el daño a las células y tejidos no tumorales, en el que el lugar de un tumor se somete a una fuente de radiación ionizante.

25

4. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en la protección de un sujeto humano o animal del daño por radiación resultante de la exposición a la radiación ionizante.

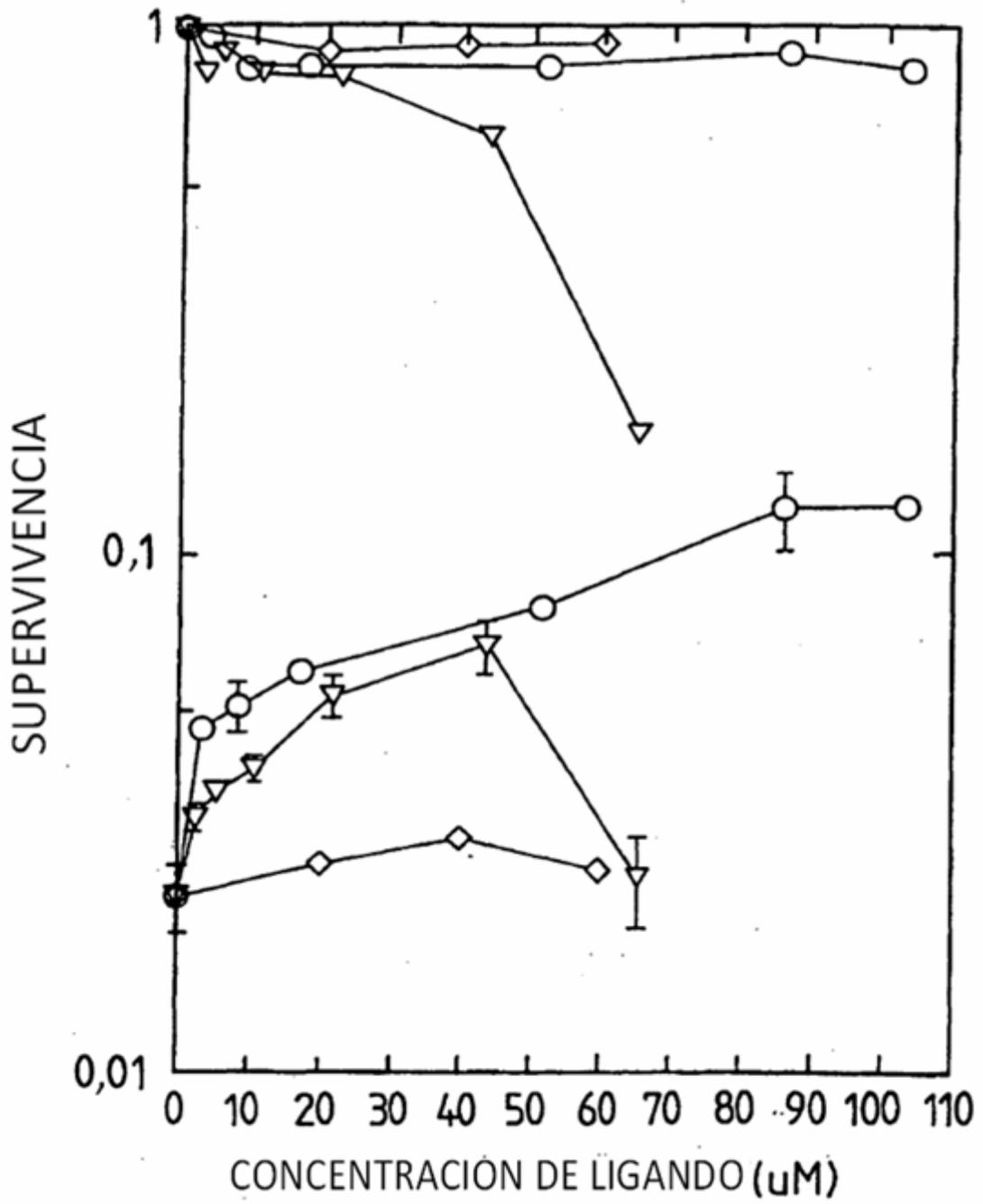


FIG 1

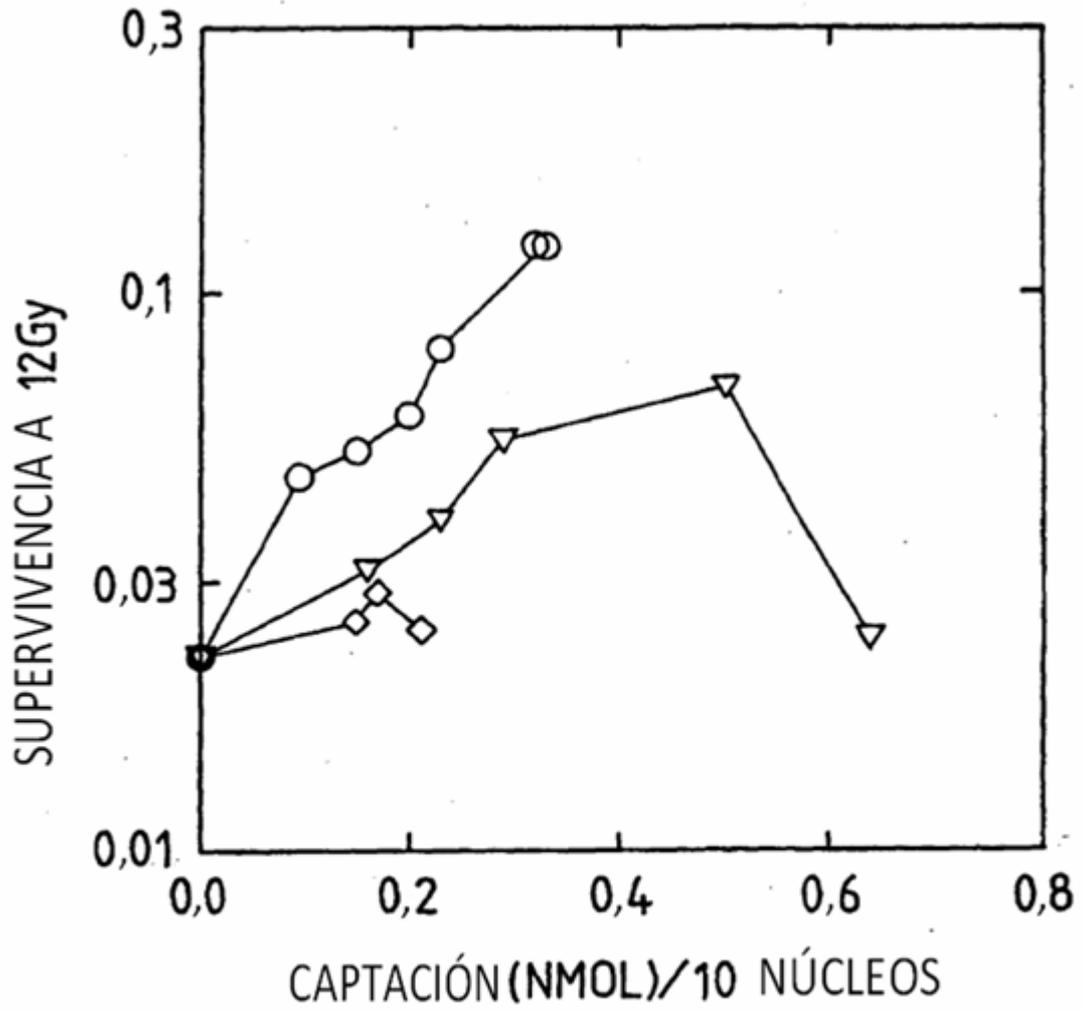


FIG 2

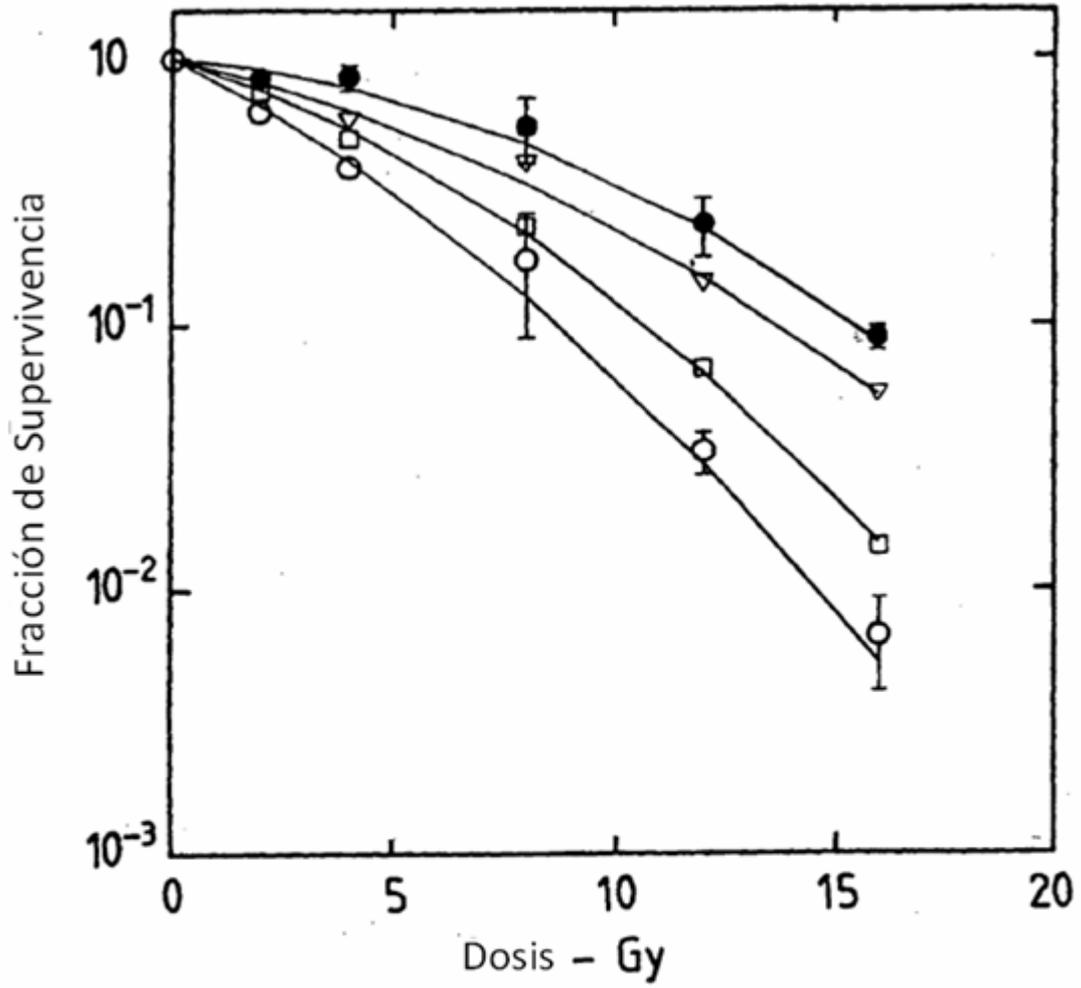
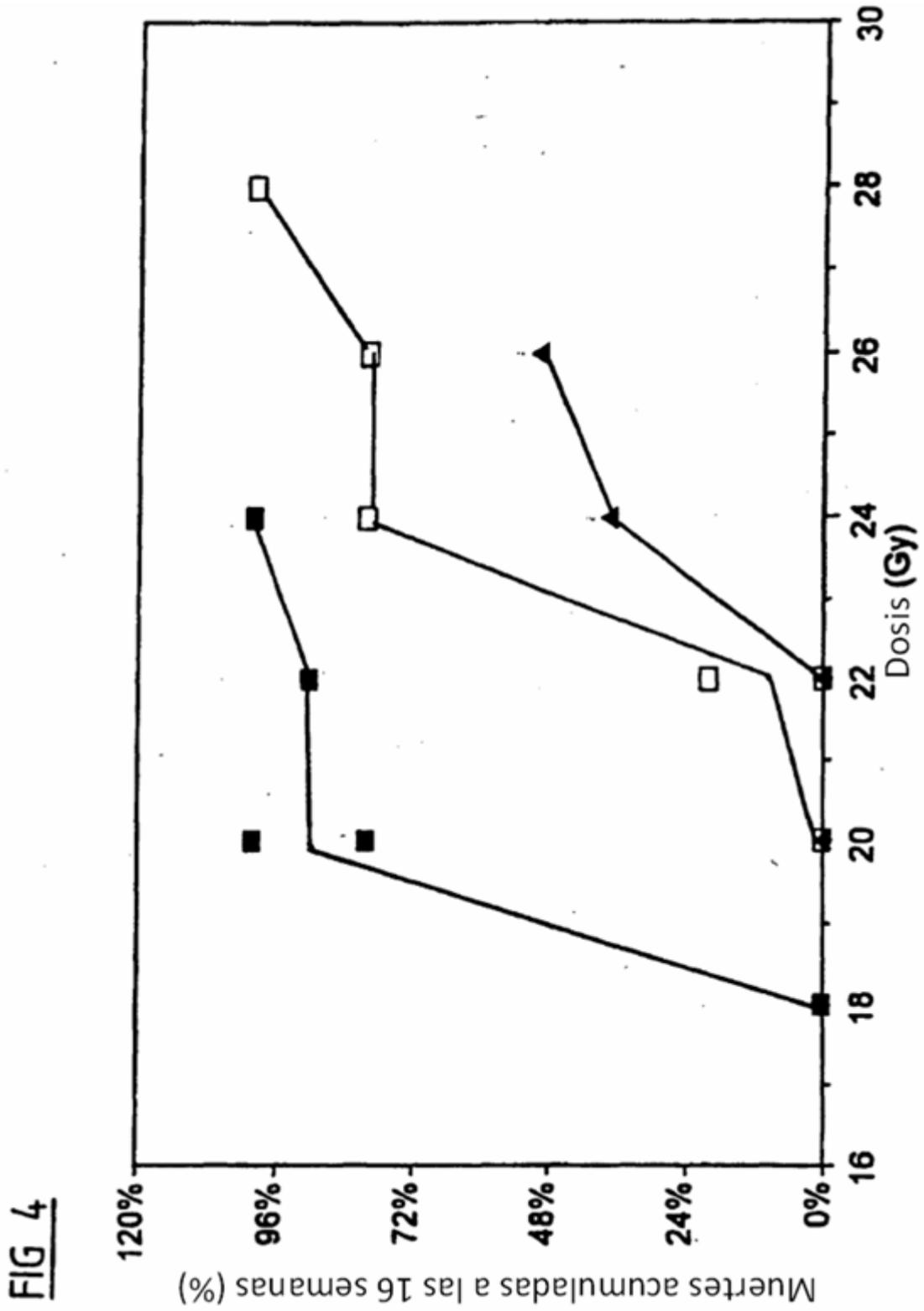


FIG 3



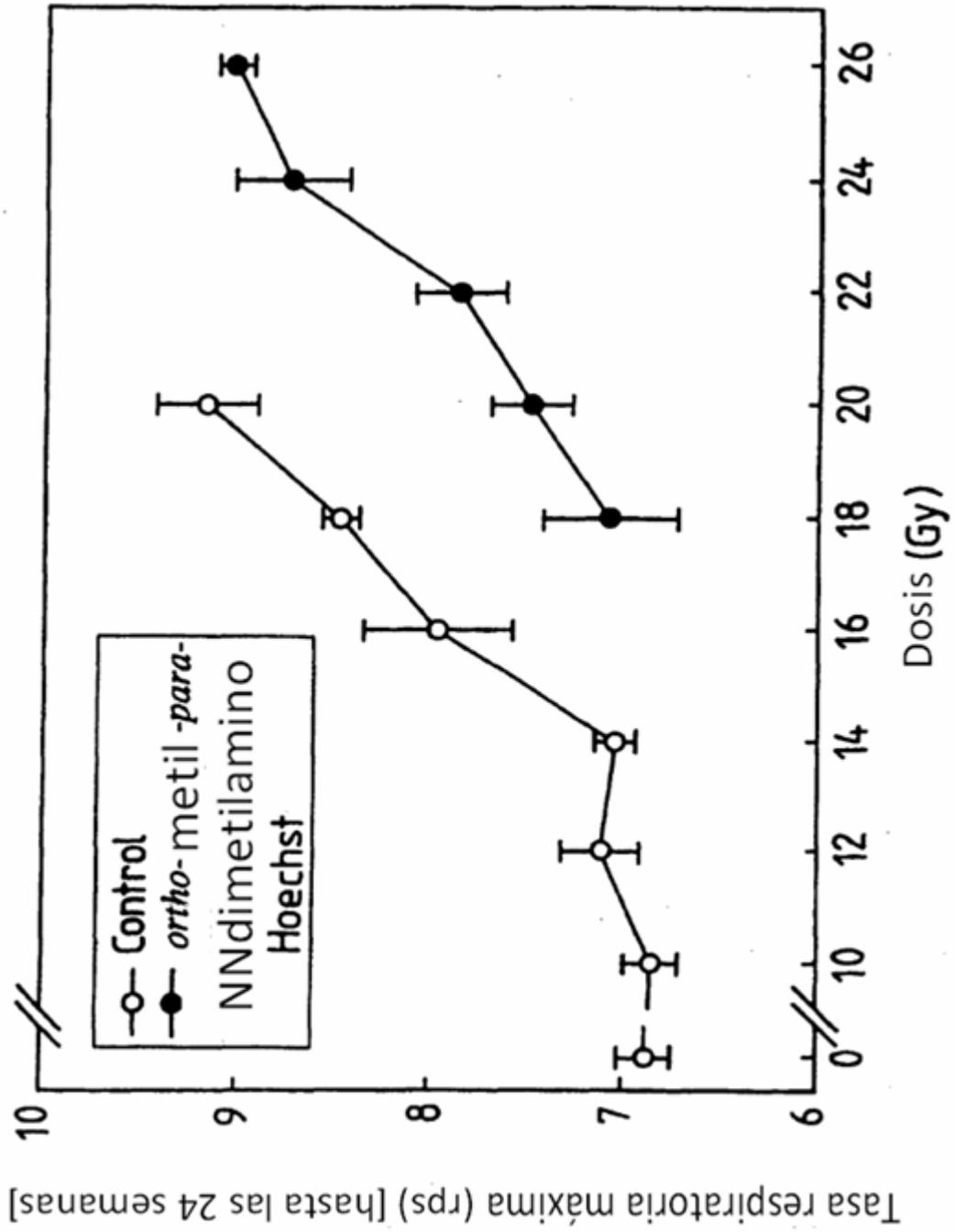


FIG 5

Tasa respiratoria máxima (rps) [hasta las 24 semanas]

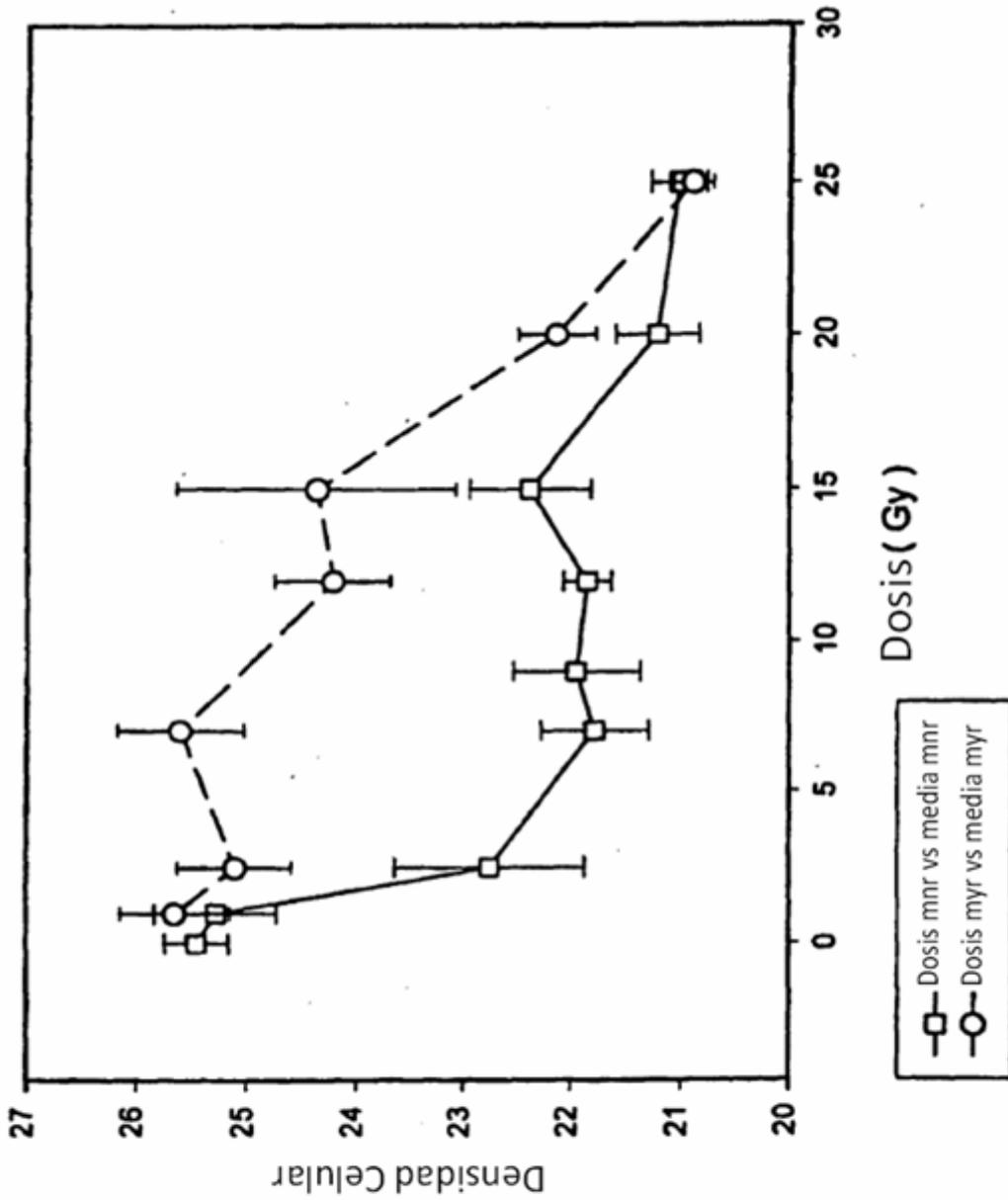


FIG 6