

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 069**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/74** (2006.01) **C07C 279/14** (2006.01)

**C07F 9/24** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/13** (2006.01)

**A61K 31/133** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61K 31/4409** (2006.01)

**A61K 31/664** (2006.01)

**C07C 211/35** (2006.01)

**C07C 215/10** (2006.01)

**C07C 229/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 13150037 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2581367**

54 Título: **Sales de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas**

30 Prioridad:

**06.04.2007 US 922148 P**

**02.05.2007 US 927363 P**

**15.06.2007 US 934914 P**

**30.10.2007 US 1237 P**

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

**31.03.2016**

73 Titular/es:

**ZIOPHARM ONCOLOGY, INC. (100.0%)**  
**One First Avenue Parris Building No. 34 Navy**  
**Yard Plaza**  
**Boston, MA 02129, US**

72 Inventor/es:

**AMEDIO, JOHN C.;**  
**WALLNER, BARBARA P. y**  
**KOMARNITSKY, PHILIP B.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 565 069 T3**

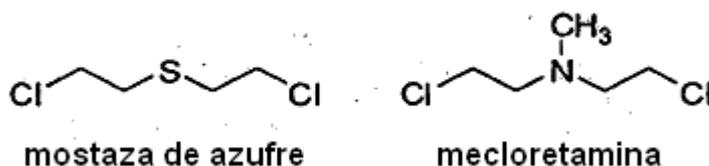
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

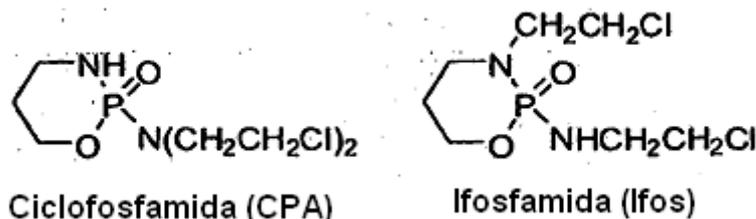
Sales de mostaza de isofosforamida y análogos de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

Las autopsias de soldados muertos por gas mostaza en la Primera Guerra Mundial indicaban que la mostaza de azufre tiene un efecto desproporcionado en las células que se dividen rápidamente y sugiere que los compuestos de mostaza de azufre pueden tener efectos antitumorales. De hecho, los primeros investigadores intentaron tratar el  
10 **cáncer mediante inyección directa de mostaza de azufre en los tumores.** Esta investigación estaba limitada por la extrema toxicidad de los compuestos de mostaza de azufre y se investigaron algunos análogos de mostaza de nitrógeno, tales como mecloretamina, como alternativas menos tóxicas.



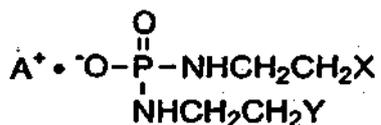
Debido a la falta de selectividad de la mayoría de los análogos de mecloretamina, se han investigado algunos  
15 **profármacos, tales como compuestos de fosforamida, que se pueden activar por la alta concentración de fosforamidasa** presentes en células neoplásicas. Se ha demostrado que dos agentes de alquilación de fosforamida, ciclofosfamida (CPA) y el compuesto isomérico lfosfamida (lfos), son particularmente eficaces.  
20



Con referencia a la Figura 1, la mostaza de isofosforamida (IPM) es un metabolito común de CPA e lfos. Se cree que  
25 **la IPM es responsable de al menos una parte de la actividad antitumoral presentada por CPA e lfos.** Los documentos de EE.UU. 2006/0089333 y WO 00/71134 describen sales de IPM y análogos de las mismas para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los esfuerzos para usar IPM como un agente anticáncer directamente han sido en gran medida insatisfactorios debido en parte a la inestabilidad del compuesto. La IPM se ha sintetizado y se han realizado evaluaciones biológicas preliminares del compuesto, pero desafortunadamente la IPM es demasiado inestable para su aislamiento y para su uso para tratamiento en seres humanos.  
30

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a liofilizados que comprenden un análogo de IPM que tiene una estructura de fórmula (I)



(I)

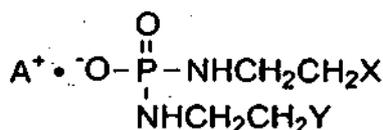
35 y de 1% a 10% (p/v) de manitol, en la que  $\text{A}^+$  es un contraión de amonio alifático hidroxilado; y X e Y representan independientemente grupos salientes, seleccionados entre halógenos.  
40

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden un liofilizado del

compuesto de fórmula (I) según la invención y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describen algunos métodos para preparar tales compuestos y composiciones.

5 En el presente documento también se desvelan un liofilizado y un método para producir un liofilizado que comprende una mostaza de isofosforamida (IPM) y/o un análogo de IPM, uno o más equivalentes de una base, y un excipiente. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una sal cristalina de IPM o un análogo de la misma y una amina alifática, tal como tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o una mezcla de IPM o un análogo del mismo y una o más aminas alifáticas (preferentemente en una proporción de aproximadamente 1:1 de IPM o análogo de la misma con respecto a la amina o aminas) con agua y liofilizar la mezcla resultante. En ciertas realizaciones, la  
10 mezcla y el liofilizado resultante comprenden un excipiente, tal como manitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40 o povidona (PVP K24), preferentemente manitol.

Tales formulaciones incluyen liofilizados, que comprenden preferentemente un excipiente, tal como manitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40 o povidona (PVP K24), preferentemente manitol, y un compuesto de  
15 fórmula



20 en la que A<sup>+</sup> representa una especie de amonio seleccionada entre las formas protonadas (ácido conjugado) o formas cuaternarias de aminas alifáticas y aminas aromáticas, que incluyen aminoácidos básicos, aminas heterocíclicas, piridinas, guanidinas y amidinas sustituidas y sin sustituir; y X e Y representan independientemente grupos salientes.

En el presente documento también se desvelan composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral, que comprenden un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto tal como se desvela en el  
25 presente documento.

También se describen en la presente memoria métodos para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, p. ej. con los compuestos o formulaciones que se discuten en la presente memoria. Se describe el tratamiento de un  
30 trastorno hiperproliferativo seleccionado entre leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritrocítica), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica, y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (indolente y formas de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de  
35 Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Algunos ejemplos adicionales de afecciones que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones que se desvelan incluyen tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, que incluyen, pero no se limitan a,  
40 fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, sarcomas resistentes a ciclofosfamida, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar,  
45 adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer del cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de vejiga, y tumores del SNC (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma del nervio acústico, oligodendroglioma, menangioma,  
50 melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema que ilustra el metabolismo de la ifosfamida incluyendo la producción de acroleína y  
55 mostaza de isofosforamida.

La Figura 2 muestra la difracción de rayos X con el método de polvo de IPM•Tris.

La Figura 3 muestra la calorimetría de barrido diferencial (DSC) de IPM•Tris.

60 La Figura 4 muestra el análisis termogravimétrico (TGA) de IPM•Tris.

- La Figura 5 muestra imágenes de barrido con microscopio electrónico (SEM) de IPM·Tris cristalina.
- 5 La Figura 6 muestra una comparación de IPM·(LYS)<sub>2</sub> con IPM·Tris en xenoinjertos de cáncer de mama MX-1 humano.
- La Figura 7 muestra una comparación de la actividad antitumoral de IP y la administración oral de IPM·Tris en xenoinjertos de cáncer de mama MX-1 humano.
- 10 La Figura 8a muestra la viabilidad de células de rhabdomyosarcoma RD y RH30 cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones.
- La Figura 8b muestra la viabilidad de células de sarcoma de Ewing SKES1 y SKPNDW cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones.
- 15 La Figura 8c muestra la viabilidad de células de osteosarcoma OS230, OS229, OS222, y SaOS cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones.
- La Figura 8d muestra la viabilidad de células de sarcoma sinovial SYO1 y HSSYII cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones.
- 20 La Figura 9a muestra la viabilidad de células de rhabdomyosarcoma RH30 cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones ya sea una vez al día o tres veces al día.
- 25 La Figura 9b muestra la viabilidad de células de osteosarcoma OS229 cuando se tratan con IPM·(LYS)<sub>2</sub> a diversas concentraciones ya sea una vez al día o tres veces al día.
- La Figura 10 muestra que la administración a la dosis máxima tolerada (MTD) en la línea de células de osteosarcoma OS31 resistentes a ciclofosfamida implantadas en ratones scid<sup>\*/\*</sup> hembra CB17 para cada una de las tres programaciones de dosis (control, 175 mg/kg diariamente x1, o 100 mg/kg diariamente x3), IPM·(LYS)<sub>2</sub> da como resultado un retraso significativo del crecimiento del tumor.
- 30 La Figura 11 a muestra resistencia a ciclofosfamida en células de osteosarcoma OS31 implantadas en ratones scid<sup>\*/\*</sup> hembra CB17 en términos de volumen tumoral relativo, en el que el tratamiento comprende la administración de ciclofosfamida en comparación con el control.
- 35 La Figura 11b muestra resistencia a ciclofosfamida en células de osteosarcoma OS33 implantadas en ratones scid<sup>\*/\*</sup> hembra CB17 en términos de volumen tumoral relativo, en el que el tratamiento comprende la administración de IPM·(LYS)<sub>2</sub> en comparación con el control.
- 40 La Figura 12 muestra la actividad de IPM·(LYS)<sub>2</sub> en términos de volumen tumoral relativo en el tratamiento de células de osteosarcoma OS31 resistentes a ciclofosfamida implantadas en ratones scid<sup>\*/\*</sup> hembra CB17 (100 mg/kg diariamente x 3 en comparación con el control).
- 45 La Figura 13 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 a IP y tratamiento oral con solución salina con una dosis de q1d x 5.
- La Figura 14 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 al tratamiento con IP con IPM·Tris, IPM e IPM·(LYS)<sub>2</sub> con una dosis de q1d x 5.
- 50 La Figura 15 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 al tratamiento oral con IPM·Tris, IPM e IPM·(LYS)<sub>2</sub> con una dosis de q1d x 5.
- La Figura 16 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 al tratamiento con IP y oral con solución salina con una dosis de q1d x 5.
- 55 La Figura 17 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 al tratamiento con IP con IPM·Tris, IPM e IPM·(LYS)<sub>2</sub> con una dosis de q1d x 5.
- 60 La Figura 18 muestra la respuesta de tumores de mama SC MX-1 al tratamiento oral con IPM·Tris, IPM e IPM·(LYS)<sub>2</sub> con una dosis de q1d x 5.
- La Figura 19 muestra el efecto de tumores de cáncer de mama MX-1 del tratamiento con IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 12 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.
- 65

La Figura 20 muestra el efecto en la supervivencia de IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 12 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.

5 La Figura 21 muestra el efecto en tumores de cáncer de mama MX-1 del tratamiento con IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 24 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.

10 La Figura 22 muestra el efecto en la supervivencia de IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 24 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.

La Figura 23 muestra el efecto en tumores de cáncer de mama MX-1 del tratamiento con IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 54 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.

15 La Figura 24 muestra el efecto en la supervivencia de IPM·Tris en combinación con doxorubicina con una dosis de 54 mg/kg/día de IPM·Tris Q1Dx5 y 8 mg/kg de doxorubicina Q4Dx3.

La Figura 25 muestra la toxicidad del régimen de combinación de IPM·Tris/doxorubicina.

20 La Figura 26 muestra el efecto en tumores de cáncer de mama MX-1 del tratamiento con IPM·Tris en combinación con docetaxel con una dosis de 54 mg/kg de IPM·Tris Q1Dx5 IP y 10 mg/kg de docetaxel Q6Dx3 IV.

La Figura 27 muestra el efecto en tumores de cáncer de mama MX-1 del tratamiento con IPM·Tris administrado ya sea a una dosis de 36 mg/kg de IP o a una dosis de 81 mg/kg de PO.

25 La Figura 28 muestra el efecto en la supervivencia de IPM·Tris administrada ya sea a una dosis de 36 mg/kg de IP o a una dosis de 81 mg/kg de PO.

30 La Figura 29 muestra la farmacocinética de IPM·Tris administrada por vía oral e IV en ratas Sprague-Dawley hembra.

La Figura 30 muestra el AUC con aumento de dosis de IPM·Tris administrada PO o por IV.

35 La Figura 31 muestra la  $C_{\text{máx}}$  con aumento de dosis de IPM·Tris administrada PO o por IV.

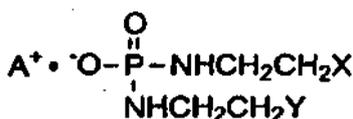
La Figura 32 muestra la estabilidad de la solución de IPM en tampón a pH 7,0 a 25°C.

### Descripción detallada de la invención

#### 40 I. Sales de IPM y Análogos de las mismas

Las composiciones que se desvelan en el presente documento incluyen sales cristalinas de IPM o análogos de las mismas. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, las sales desveladas incluyen uno o más cationes. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, los cationes pueden ser un ácido conjugado de una base de amina o pueden ser un catión de amonio cuaternario.

En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, los compuestos cristalinos desvelados comprenden sales de IPM o un análogo de las mismas. Tales compuestos incluyen compuestos cristalinos de fórmula (I)



(I)

50 en la que  $\text{A}^+$  representa una especie de amonio seleccionada entre las formas protonadas (ácido conjugado) o cuaternarias de aminas alifáticas hidroxiladas; y X e Y representan independientemente grupos salientes. En ciertas realizaciones X e Y son independientemente entre sí, halógeno. Preferiblemente, X e Y son iguales. En algunas de tales realizaciones, X e Y son ambos Cl.

55 Algunos ejemplos en particular de ácidos conjugados adecuados de bases de amina incluyen, pero no se limitan a, el ácido conjugado de mono-, bis- o tris-(2-hidroxi-etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, N,N-dimetil-N-(2-hidroxi-etil)amina, y tris(hidroxi-metil)aminometano (Tris). En algunas de tales realizaciones,  $\text{A}^+$  es el ácido conjugado

de Tris.

En la presente memoria se describen compuestos que comprenden una sal cristalina de IPM o análogo de la misma en la que la IPM o análogo de la misma, y el contraión, preferentemente Tris, están presentes en una proporción de 2:1 a 1:2, preferiblemente 1:1. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, la composición cristalina comprende más de una forma polimórfica de cristales, tal como dos, tres, cuatro, o incluso cinco formas polimórficas de cristales. En algunas de tales realizaciones alternativas descritas en la presente memoria, la composición cristalina comprende una sola forma polimórfica de cristales. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, tales sales son más estables que IPM y los análogos de IPM en forma de ácidos libres.

En algunas de tales realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto es una sal cristalina de una proporción 1:1 de IPM y Tris. En algunas de tales realizaciones descritas en la presente memoria, el punto de fusión del sólido cristalino está entre aproximadamente 100 y aproximadamente 110°C, aproximadamente 102 y aproximadamente 108°C, aproximadamente 103 y aproximadamente 106°C, o incluso de 105°C a 106°C.

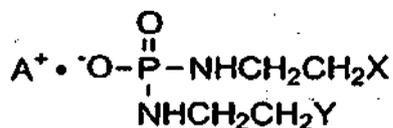
En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto, por ejemplo, una sal cristalina de una proporción 1:1 de IPM y Tris, es puro en al menos aproximadamente un 80%, puro en al menos aproximadamente un 85%, puro en al menos un 90%, puro en al menos un 95%, puro en al menos un 97%, puro en al menos un 98%, o incluso puro en al menos un 99%. En algunas de tales realizaciones, ninguna impureza individual supera un 1% en peso. En ciertas realizaciones, la pureza se mide con respecto a los demás componentes de la composición, aunque en otras realizaciones descritas en la presente memoria (por ejemplo, en las que el compuesto forma parte de una composición farmacéutica o mezcla liofilizada), la pureza se puede medir con respecto a los productos de degradación del compuesto (por ejemplo, productos de degradación del compuesto que contienen fósforo) o productos secundarios de la preparación del compuesto (por ejemplo, productos de degradación del compuesto que contienen fósforo), excluyendo de este modo otros componentes que se añaden de forma intencionada a la composición.

En ciertas realizaciones, los compuestos son sales de IPM o análogos de las mismas, en los que la sal tiene una semivida a temperatura ambiente (por ejemplo, a aproximadamente 23°C) en presencia de agua que es mayor que la semivida de IPM (es decir, en forma el ácido libre) en presencia de agua en las mismas condiciones. En algunas de tales realizaciones, una sal de IPM tiene una semivida en presencia de agua que es igual a o superior a dos veces siempre y cuando la IPM por sí misma en presencia de agua, más preferentemente, igual a o superior a cinco veces.

En ciertas realizaciones, los compuestos son sales de IPM y análogos de las mismas, en los que la sales son estables a temperatura ambiente en presencia de agua durante al menos un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, o incluso una semana.

Como se usa en el presente documento, el término "estable" se refiere a que la pureza de la sal de IPM o análogo de misma después de un periodo de tiempo (por ejemplo, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año, etc.) es al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, o incluso al menos un 99% de la pureza inicial, que se puede determinar, por ejemplo, mediante HPLC usando detección por dispersión de luz evaporativa (ELSD). Tal ensayo se puede realizar, por ejemplo, usando una columna C18 y un sistema isocrático con una fase móvil que comprende ácido heptafluorobutírico 0,005 M y ácido trifluoroacético al 0,1% en agua.

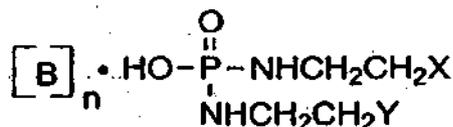
La invención se refiere a liofilizados que comprenden un compuesto de fórmula



y de 1% a 10% (p/v) de manitol, en la que A<sup>+</sup> es un contraión de amonio alifático hidroxilado; y X e Y representan independientemente grupos salientes, seleccionados entre halógenos.

Algunos ejemplos en particular de bases de amina adecuadas (y sus iones amonio correspondientes) para usar en los presentes compuestos incluyen, pero no se limitan a, piridina, N,N-dimetilaminopiridina, diazabicyclononano, diazabicycloundeceno, N-metil-N-etilamina, dietilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, mono-, bis- o tris- (2-hidroxietyl)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, tris(hidroxietyl)aminometano, N,N-dimetil-N-(2-hidroxietyl)amina, tri-(2-hidroxietyl)amina y N-metil-D-glucamina.

En el presente documento también se describen liofilizados que comprenden un compuesto de fórmula



Con referencia a la fórmula, B puede ser, para cada n, una molécula básica seleccionada de forma independiente. En una realización de la fórmula, B se puede seleccionar entre los aminoácidos básicos, aminas alifáticas acíclicas, di- y tri- alquil aminas, aminas alifáticas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas sustituidas y sin sustituir, guanidinas cíclicas y acíclicas, y amidinas cíclicas y acíclicas. Por lo general, n es de 1 a aproximadamente 3 de modo que la fórmula puede incluir diferentes moléculas básicas. Haciendo referencia continua a la fórmula, X e Y son grupos salientes. Una persona con una experiencia habitual en la materia entenderá que la estructura de mostaza de isofosforamida ilustrada incluye un protón ácido, y como tal existe predominantemente como su base conjugada al pH fisiológico y en presencia de una base tal como B. De forma análoga, B, siendo un grupo básico, existe predominantemente como su ácido conjugado al pH fisiológico y en presencia de mostaza de isofosforamida y análogos de mostaza de isofosforamida. Realizaciones ejemplares de los compuestos desvelados se representan en la Tabla 1.

15

Tabla 1

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

## II. Composiciones y Métodos

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una sal de IPM o análogo de la misma y un diluyente o excipiente farmacéutico. En algunas de tales realizaciones, la composición farmacéutica es una solución, preferentemente una solución salina que comprende IPM o un análogo de IPM. En algunas de tales realizaciones, la concentración de la sal de IPM o sal del análogo de IPM en solución es de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml o incluso superior. Tales soluciones salinas se pueden preparar, por ejemplo, por disolución de un compuesto cristalino de fórmula (I) o un liofilizado de IPM o un análogo de IPM tal como se desvela en el presente documento en una solución salina, por ejemplo, a la vez que se agita a temperatura ambiente. En algunas de tales realizaciones, la solución salina se prepara de modo que la concentración del cloruro sódico sea de aproximadamente 0,5%, 0,9%, 2,5%, 2,7%, 3,0%, 4,0%, o incluso 5,0%.

En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, una solución acuosa se puede preparar a partir de un compuesto cristalino de fórmula I o un liofilizado de IPM o un análogo de IPM tal como se desvela en el presente documento. Tal solución acuosa (por ejemplo, en agua o en una solución salina isotónica) es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 60 minutos, 80 minutos, 100 minutos, 120 minutos, 140 minutos, o incluso aproximadamente 160 minutos a temperatura ambiente.

En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, un compuesto cristalino de fórmula (I), tal como una sal de IPM y Tris, tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60

mg/ml, 70 mg/ml, o incluso de 80 mg/ml. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, un compuesto cristalino de fórmula (I), tal como una sal de IPM y Tris, tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 500 mg/ml, al menos aproximadamente 800 mg/ml, al menos aproximadamente 1000 mg/ml, al menos aproximadamente 1200 mg/ml, o incluso al menos 1400 mg/ml. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, el pH de una solución del compuesto cristalino en agua está entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 10, tal como entre aproximadamente 5,0 y 8,5, preferentemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0. En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, el pH de tal solución es aproximadamente 5,0.

En la presente memoria también se describe un kit, que comprende un compuesto cristalino de fórmula I y una solución salina.

Los liofilizados que se desvelan en el presente documento incluyen IPM y análogos de IPM que se formulan con uno o más equivalentes de una base. Dado que IPM y sus análogos son inestables en ácidos y son ácidos, los liofilizados que ahora se desvelan ofrecen una mayor estabilidad así como otras ventajas. Las ventajas de las formulaciones desveladas en términos de síntesis, estabilidad y biodisponibilidad serán evidentes para los expertos habituales en la materia después de la consideración de la presente divulgación. Algunas ventajas adicionales de la IPM y los análogos de IPM que se formulan con uno o más equivalentes de una base pueden incluir aumento de la solubilidad en agua o fluidos corporales.

En ciertas realizaciones, los liofilizados que se desvelan son sales de mostaza de isofosforamida o análogos de mostaza de isofosforamida que incluyen uno o más cationes. En ciertas realizaciones, los cationes pueden ser un ácido conjugado de una base de amina o puede ser un catión de amonio cuaternario. Algunos contraiones adecuados para la mostaza de isofosforamida y sus análogos incluyen los ácidos conjugados (tal como se usa en el presente documento, se entenderá que los términos que se refieren a aminas incluyen sus ácidos conjugados a menos que el contexto indique claramente que se pretende la amina libre) de bases que incluyen aminoácidos básicos, aminas alifáticas, aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, piridinas, guanidinas y amidinas. De las aminas alifáticas, las aminas alifáticas acíclicas, y las di- and tri-alkil aminas cíclicas y acíclicas son particularmente adecuadas para usar en los compuestos que se desvelan. Además, los contraiones de amonio cuaternario son ejemplos de contraiones adecuados que se pueden usar. En ciertas realizaciones, tal liofilizado puede comprender adicionalmente un excipiente. Algunos excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, manitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40 y povidona (PVP K24).

En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones, tales como los liofilizados que se desvelan en el presente documento, son estables a temperatura ambiente durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, o incluso al menos seis meses. En ciertas realizaciones, las sales son estables a temperaturas inferiores (por ejemplo, 0°C, 2°C, 4°C, 6°C, etc.) durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, o incluso al menos seis meses. En algunas de tales realizaciones, los compuestos y composiciones, tales como los liofilizados, son estables durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos cuatro meses, o incluso al menos seis meses a una temperatura inferior (por ejemplo, entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 20°C, entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, o incluso entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C). En ciertas realizaciones, el liofilizado comprende una sal de IPM o un análogo de la misma. En ciertas realizaciones, el liofilizado comprende IPM·Tris o IPM(LYS)<sub>2</sub>, preferentemente IPM·Tris, y en realizaciones particularmente preferentes, tales composiciones comprenden adicionalmente un agente para el aumento del volumen, tal como manitol.

En una realización más, las sales que se han descrito anteriormente pueden incluir un segundo grupo amina o amonio. En una realización, los liofilizados que se desvelan en el presente documento incluyen más de un equivalente de una amina para cada equivalente de mostaza de isofosforamida o análogo de mostaza de isofosforamida. Tales realizaciones incluyen las que tienen proporciones no enteras de amina con respecto a mostaza de isofosforamida o análogos de mostaza de isofosforamida. En ciertas realizaciones, los liofilizados tienen una proporción de dos a uno o de tres a uno de amina con respecto a mostaza de isofosforamida o un análogo de mostaza de isofosforamida. En realizaciones de trabajo, se produjeron sales que contenían dos equivalentes de base de amina por equivalente de mostaza de isofosforamida. En ciertas realizaciones, una base de amina usada para formar mostaza de isofosforamida y sales de análogo de mostaza de isofosforamida incluye más de un grupo amino; tales bases se pueden denominar "multibásicas". Más específicamente, ciertos ejemplos de bases multibásicas que se pueden usar tienen dos grupos amino; tales compuestos se pueden denominar "dibásicos". Por ejemplo, una molécula dibásica adecuada es la *N,N*-dimetilaminopiridina, que incluye dos grupos amino básicos. Ciertas realizaciones de un liofilizado que se desvelan en el presente documento incluyen mostaza de isofosforamida o un análogo de mostaza de isofosforamida y un equivalente de una amina dibásica.

Cierta mostaza de isofosforamida y liofilizados de análogo de mostaza de isofosforamida que se desvelan en el presente documento incluyen dos grupos salientes. Sin limitarse a la teoría, se cree que los dos grupos salientes se desplazan *in vivo* con nucleófilos biomoleculares, tales como ácidos nucleicos y proteínas, reticulando de este modo las biomoléculas. La expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo que se puede desplazar con un nucleófilo. Con referencia a los compuestos que ahora se desvelan, grupo saliente se refiere a un grupo que se puede desplazar

para formar un compuesto intermedio de aziridinio, o se puede desplazar directamente con un nucleófilo biomolecular, tal como un nucleófilo de ácido nucleico, para formar, por ejemplo, una especie de guanidinio 7-alquilada. Algunos ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen los halógenos y los sulfonatos (-SO<sub>2</sub>R). En una realización de las sales de análogo de isofosforamida que se desvelan, el compuesto es un compuesto "mixto" de grupo saliente, que incluye dos tipos diferentes de grupos salientes, por ejemplo un halógeno y un sulfonato o dos halógenos diferentes, tales como un bromuro y un cloruro. El documento de Patente de Estados Unidos N° 6.197.760 de Struck enseña métodos para preparar tales compuestos mixtos de grupo saliente.

En ciertas realizaciones, los liofilizados de sales que se desvelan aumentan la estabilidad de la reconstitución en comparación con una preparación de mostaza de isofosforamida liofilizada por sí misma. En algunas de tales realizaciones, un liofilizado preparado a partir de las sales de IPM o un análogo de las mismas que se desvelan y un excipiente, tal como de IPM o un análogo de la misma y Tris, que incluye opcionalmente un excipiente, por ejemplo, un agente para el aumento del volumen, tal como manitol, que se ha reconstituido en una solución salina (preferentemente cloruro sódico al 5%) mantiene > 90% de la potencia durante al menos aproximadamente 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 140 minutos, o incluso al menos aproximadamente 160 minutos.

En algunas de tales realizaciones, la disolución de una sal de IPM o un análogo de la misma, tal como IPM·Tris, o un liofilizado preparado a partir de una sal de IPM o un análogo de la misma, tal como IPM·Tris, y un excipiente opcional, por ejemplo, un agente para el aumento del volumen, tal como manitol, en una solución salina mantiene una pureza de al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o incluso al menos un 99% durante al menos aproximadamente 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 3 horas, o incluso 4,5 horas o más a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, tales soluciones reconstituidas son más estables que las soluciones de IPM·(LYS)<sub>2</sub> reconstituidas en condiciones idénticas. En algunas de tales realizaciones, el IPM·(LYS)<sub>2</sub> que se ha reconstituido se degrada al menos 1,25 veces más rápido, al menos 1,5 veces más rápido, al menos dos veces más rápido, o incluso al menos tres o cuatro veces más rápido que la sal de IPM o análogo de la misma.

En ciertas realizaciones en las que el liofilizado comprende una sal de IPM o un análogo de la misma y un excipiente, tal como un liofilizado que comprende IPM o análogo de la misma, Tris, and manitol, la mezcla tiene una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, o incluso 80 mg/ml.

En ciertas realizaciones, los liofilizados de las sales desveladas de IPM o análogo de la misma son más estables que una preparación liofilizada de mostaza de isofosforamida por sí misma, es decir, en forma del ácido libre. En algunas de tales realizaciones preferidas, el liofilizado de las sales desveladas tiene una vida en almacenamiento más larga que una preparación liofilizada de mostaza de isofosforamida por sí misma, preferentemente al menos dos veces más larga, más preferentemente al menos cinco veces más larga. En ciertas realizaciones, el liofilizado se forma a partir de la sal Tris de IPM, que puede ser cristalina o no antes de su disolución.

Como se ha descrito anteriormente, en ciertas realizaciones, tales liofilizados comprenden adicionalmente un excipiente, por ejemplo, un agente para el aumento del volumen, preferentemente manitol. En ciertas realizaciones, el liofilizado comprende un agente para el aumento del volumen seleccionado entre manitol, lactosa anhidra, sacarosa, D(+)-trehalosa, dextrano 40 y povidona (PVP K24), preferentemente manitol. En ciertas realizaciones, la adición de tal agente para el aumento del volumen puede aumentar la estabilidad del liofilizado con respecto a la formulación liofilizada en ausencia del agente para el aumento del volumen. En algunas de tales realizaciones, tal liofilizado es estable a aproximadamente -70°C, aproximadamente -20°C, o incluso 5°C, por ejemplo, durante un periodo de un mes, dos meses, tres meses, seis meses, nueve meses, un año, o incluso dos años o más.

En algunas de tales realizaciones en las que el liofilizado comprende un agente para el aumento del volumen, tal como manitol, el liofilizado comprende de 1% a 10%, o de 1% a 5% (p/v) de agente para el aumento del volumen, por ejemplo, manitol. Antes de la liofilización o después de la reconstitución, tales composiciones pueden comprender de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de IPM, y/o una amina tal como Tris en una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, preferentemente en una cantidad aproximadamente equimolar con respecto a la IPM. En ciertas realizaciones, cuando se prepara la solución antes de la liofilización, en lugar de añadir IPM y amina, tal como Tris, como componentes separados, se añaden en conjunto en forma de una sal cristalina de IPM·Tris tal como se desvela en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un kit, que comprende un liofilizado tal como se desvela en el presente documento y una solución salina.

Los compuestos que se desvelan en el presente documento se pueden administrar por vía oral, por vía tópica, por vía transdérmica, por vía parenteral, mediante inhalación o pulverización y se pueden administrar en formulaciones de dosificación unitaria que contienen medios de soporte, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales.

En ciertas realizaciones, es preferente la administración parenteral de las sales de IPM y análogos de las mismas que se desvelan mediante inyección. En ciertas realizaciones, es preferente la administración oral de las sales de

IPM y análogos de las mismas que se desvelan. En ciertas realizaciones, las sales de IPM y análogos de las mismas administrados por vía oral (PO) muestran parámetros farmacocinéticos (PK) similares a los observados con la administración intravenosa (IV). Los agentes se pueden administrar en una sola dosificación o de forma crónica, dependiendo de la enfermedad en particular, afección del paciente, toxicidad del compuesto y otros factores tal como lo reconocerá una persona con una experiencia habitual en la materia.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o compuestos administrados puede variar dependiendo de los efectos deseados y de los factores que se han indicado anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas para administración a un sujeto pueden incluir vehículos, agentes espesantes, diluyentes, agentes tampón, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula elegida. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos adicionales tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares. Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir componentes adicionales, tales como vehículos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles para estas combinaciones son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 21ª Edición (2006), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los compuestos que se desvelan en el presente documento.

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

En ciertas realizaciones, un compuesto desvelado se formula como una forma de dosificación oral, tal como una píldora, comprimido, o cápsula. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación oral es una cápsula.

En ciertas realizaciones, tales formas de dosificación oral comprenden al menos un excipiente, sustancia de deslizamiento, diluyente, lubricante, y/o agente disgregante. En algunas de tales realizaciones, algunos excipientes, sustancias de deslizamiento, diluyentes, lubricantes, y/o agentes disgregantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, talco, dióxido de silicio pirógeno, almidón, silicato cálcico, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato sódico, lactosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetil celulosa, dextrina, glucosa, sacarosa, almidón, derivados de almidón, carbonato de calcio, fosfato cálcico dibásico, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, estearato cálcico, estearil fumarato sódico, polietilenglicol 4000, polietilenglicol 6000, benzoato sódico, aceite mineral ligero, aceites vegetales hidrogenados, ácido esteárico, behenato de glicerilo, resinas de intercambio iónico insolubles, glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa sódica (croscarmelosa sódica), gomas (por ejemplo, goma de agar, guar, xantano), ácido alginico, alginato sódico, y crospovidona.

En algunas de tales realizaciones, la forma de dosificación oral comprende un compuesto tal como se desvela en el presente documento y al menos un excipiente, sustancia de deslizamiento, diluyente, lubricante, y/o agente disgregante; preferentemente al menos un excipiente, sustancia de deslizamiento, diluyente, lubricante, y/o agente disgregante que es adecuado para formulación con un principio activo higroscópico. En algunas de tales realizaciones, la forma de dosificación oral comprende al menos un excipiente, sustancia de deslizamiento, diluyente, lubricante, y/o agente disgregante seleccionado entre celulosa microcristalina, lactosa, carboximetilcelulosa sódica, estearato de magnesio, fosfato cálcico dibásico, glicolato sódico de almidón, hidroxipropilmetil celulosa y manitol.

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

En un aspecto, ciertas realizaciones de las composiciones farmacéuticas se formulan en formas de dosificación unitaria. Por ejemplo tales formas de dosificación unitaria pueden contener de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg o de 100 mg a aproximadamente 1500 mg, tal como de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg o de 200 mg a aproximadamente 1500 mg de una sal de IPM o análogo de la misma que se desvelan por unidad de dosificación. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación puede comprender aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, o incluso aproximadamente 77 mg de una sal de IPM o análogo de la misma que se desvelan.

En algunas realizaciones, se contempla de forma específica que los presentes compuestos se administran mediante

un depósito de fármaco inyectado y/o implantado, por ejemplo que comprende liposomas multivesiculares tal como en DepoFoam (SkyePharma, Inc, San Diego, CA) (véase, por ejemplo, Chamberlain et al. Arch. Neuro. 1993, 50, 261-264; Katri et al. J. Pharm. Sci. 1998, 87, 1341-1346; Ye et al., J. Control Release 2000, 64, 155-166; y Howell, Cancer J. 2001, 7, 219-227).

5 En el presente documento se desvelan métodos para tratar afecciones caracterizadas por una actividad o neoplasia proliferativa anómala o patológica mediante la administración de uno o más de los compuestos y composiciones desvelados a un sujeto.

10 Algunas de las afecciones que se pueden tratar de acuerdo con el método desvelado incluyen las que se caracterizan por un crecimiento y/o diferenciación celular anómalos, tal como cánceres y otras afecciones neoplásicas. Algunos ejemplos habituales de trastornos proliferativos que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones desvelados se enumeran a continuación.

15 Algunos ejemplos de tumores hematológicos que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones que se desvelan en el presente documento incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritrocítica), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica, y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (indolente y formas de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia,

25 Algunos ejemplos adicionales de afecciones que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones desvelados incluyen tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, sarcomas resistentes a ciclofosfamida (CPA), y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfoide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer del cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de vejiga, y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma del nervio acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

35 En ciertas realizaciones los compuestos que se describen en el presente documento son superiores para CPA o Ifos solos frente al crecimiento tumoral resistente a CPA y/o Ifos. Por lo tanto, un aspecto de un método que se desvela en el presente documento incluye el tratamiento de un sujeto que tiene una afección neoplásica resistente a CPA y/o Ifos con una sal de IPM o análogo de la misma que se desvela en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, los compuestos desvelados en el presente documento presentan una toxicidad reducida en comparación con CPA y/o Ifos. Por ejemplo, dosis elevadas de CPA y/o Ifos pueden dar como resultado un aumento de toxicidad en el riñón, vejiga, y/o sistema nervioso central debido a la presencia de ciertos metabolitos, tales como cloroacetaldehído y acroleína. En algunas realizaciones, los presentes compuestos reducen o evitan la producción de estos u otros metabolitos tóxicos a la vez que mantienen la eficacia. Por lo tanto, los presentes compuestos son capaces de proporcionar tratamiento terapéutico a la vez que se reducen los efectos secundarios perjudiciales, tales como muerte de células renales, de vejiga, o del sistema nervioso central, que se pueden unir a metabolitos de CPA y/o Ifos. Por consiguiente, los presentes compuestos son útiles como sustitutos para CPA y/o Ifos.

50 Por ejemplo, los presentes compuestos son útiles para la preparación de los pacientes para trasplantes de células sanguíneas y médula ósea. A menudo, CPA e Ifos se usan en trasplantes de células sanguíneas y médula ósea, y los presentes compuestos representan una alternativa ventajosa, por ejemplo, debido a la disminución del perfil de toxicidad y/o aumento de la potencia de los presentes compuestos. Además, los presentes compuestos también se pueden usar en trasplantes de células sanguíneas y médula ósea en los que CPA e Ifos son inapropiados, por ejemplo, en los que se demuestra que dosis elevadas de CPA e Ifos son tóxicas. Los presentes compuestos se pueden administrar minutos, horas, días, semanas, o meses antes del trasplante, en particular días o semanas antes del trasplante. Además, los presentes compuestos se pueden administrar en formas de dosificación individuales, múltiples, y/o de repetición y/o en asociación con otros agentes en la preparación del trasplante de células sanguíneas o médula ósea.

60 En ciertas realizaciones, los presentes compuestos son útiles en regímenes de acondicionamiento para trasplantes de células sanguíneas y médula ósea, por ejemplo, como sustitutos para CPA y/o Ifos. Además, los presentes compuestos se pueden administrar sin usar medidas de protección, tales como mesna y/o hidratación intravenosa que a menudo se usan en asociación con CPA e Ifos.

En otra realización, los presentes compuestos se pueden usar en combinación con CPA y/o Ifos, por ejemplo, en la preparación de pacientes para trasplantes de células sanguíneas y médula ósea y en regímenes de acondicionamiento para trasplantes de células sanguíneas y médula ósea. Las composiciones que comprenden uno o más de los presentes compuestos en combinación con CPA y/o Ifos ofrecen beneficios adicionales, tales como disminución de la toxicidad y/o aumento de la potencia, con respecto a CPA y/o Ifos solos.

En ciertas realizaciones del método, a un sujeto se le administran de aproximadamente 0,2 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día de una sal de IPM o análogo de la misma que se desvelan. Por ejemplo, a un sujeto se le pueden administrar de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, tal como de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 7,5 mg/kg/día de un compuesto desvelado.

En ciertas realizaciones, IPM, un análogo o una sal de la misma se administra a un sujeto a una dosis (por ejemplo, una dosis diaria) superior a aproximadamente 1,0 g, superior a aproximadamente 1,5 g, superior a aproximadamente 2,0 g, o incluso superior a aproximadamente 2,5 g. En ciertas realizaciones, la sal de IPM es IPM·Tris, por ejemplo, hasta aproximadamente 2,0 g, 2,5 g, o incluso 3,0 g.

En ciertas realizaciones, la IPM o análogo de la misma se administra a un sujeto en forma de una sal de modo que la dosis (por ejemplo, dosis diaria) de IPM o el análogo de la misma (es decir, teniendo en cuenta solamente el anión IPM de la sal y descontando el peso del contraión u otros componentes de la composición) es superior a aproximadamente 0,4 g, superior a aproximadamente 0,6 g, superior a aproximadamente 0,8 g, o incluso superior a aproximadamente 1,0 g. En ciertas realizaciones, la IPM se administra en una composición tal como se desvela en el presente documento a una dosis superior a aproximadamente 0,4 g, superior a aproximadamente 0,6 g, superior a aproximadamente 0,8 g, o incluso superior a aproximadamente 1,0 g, por ejemplo, hasta aproximadamente 2,0 g, 2,5 g, o incluso 3,0 g.

En ciertas realizaciones, un tratamiento con una sal de IPM o análogo de la misma puede comprender una cantidad total de IPM o análogo de la misma (es decir, teniendo en cuenta solamente el anión IPM de la sal y descontando el peso del contraión u otros componentes de la composición) que es superior a aproximadamente 0,8 g, superior a aproximadamente 1,0 g, superior a aproximadamente 1,5 g, o incluso superior a aproximadamente 2,0 g.

En ciertas realizaciones, una dosis de sal de IPM o análogo de la misma se puede administrar desde una vez a la semana, tres veces a la semana, cinco veces a la semana, una vez al día, o incluso dos veces al día, preferentemente una vez al día. En algunas de tales realizaciones, se puede administrar un tratamiento con una sal de IPM o análogo de la misma, en el que un tratamiento es de dos o más dosis consecutivas. En ciertas realizaciones el transcurso del tratamiento puede comprender la administración de una dosis de una sal de IPM o análogo de la misma una vez al día durante dos, tres, cuatro o incluso cinco días, preferentemente tres días. Tales dosis pueden ser en días consecutivos o no consecutivos.

En ciertas realizaciones, una sola dosis (por ejemplo, una dosis diaria) puede comprender más de una forma de dosificación, por ejemplo, una sola dosis puede comprender dos o más cápsulas, comprimidos, o píldoras. En ciertas realizaciones, una dosis diaria que comprende múltiples formas de dosificación se puede administrar de una vez, o subconjuntos de las formas de dosificación se pueden administrar en intervalos durante todo el día.

En otra realización del método, se administra al sujeto una dosis (por ejemplo, una dosis diaria) de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 700 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1000 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 700 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 600 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1200 mg/m<sup>2</sup>; de aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 1500 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 600 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 600 mg/m<sup>2</sup>, o de aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> de una sal de IPM o análogo de la misma tal como se desvela en el presente documento. Por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 12 mg/m<sup>2</sup>, o incluso 14 mg/m<sup>2</sup>.

En ciertas realizaciones del método para el tratamiento de los trastornos hiperproliferativos que se desvelan en el presente documento, un compuesto desvelado se administra a un sujeto en un programa de dosificación múltiple diariamente. En tales realizaciones, el compuesto se administra al menos dos días y en como mucho cinco días diferentes. En un aspecto de programas de dosificación múltiple diariamente, el compuesto se administra al sujeto en días consecutivos, tal como de dos a cinco días consecutivos. Como alternativa, el compuesto se administra al sujeto en días no consecutivos, tal como cada dos días.

En ciertas realizaciones del método, uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran a un sujeto además de los compuestos y composiciones que ahora se desvelan. Por ejemplo, algunos agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaldadores o reticuladores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y/o ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores genéticos, y/o inhibidores de la angiogénesis.

5 Agente de unión a microtúbulos se refiere a un agente que interactúa con la tubulina para estabilizar o desestabilizar la formación de microtúbulos inhibiendo de este modo la división celular. Algunos ejemplos de agentes de unión a microtúbulos que se pueden usar en conjunto con IPM, un análogo, o una sal de la misma incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vindesina, vinorelbina (navelbina), las epotilonas, colchicina, dolastatina 15, nocodazol, podofilotoxina y rizoxina. También se pueden usar análogos y derivados de tales compuestos y serán conocidos por las personas con experiencia habitual en la materia. Por ejemplo, algunas epotilonas y análogos de epotilona adecuados para incorporación en los presentes compuestos se describen en la Publicación Internacional N° WO 2004/018478. En la actualidad se cree que algunos taxoides, tales como paclitaxel y docetaxel son particularmente útiles como agentes terapéuticos en los compuestos que ahora se desvelan. Algunos ejemplos de taxoides útiles adicionales, que incluyen análogos de paclitaxel se enseñan en los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 6.610.860 de Holton, 5.530.020 de Gurrum et al. y 5.912.264 de Wittman et al.

15 Algunos reguladores de la transcripción de ADN y/o ARN adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, actinomicina D, daunorrubicina, doxorubicina y derivados y análogos de los mismos también son adecuados para usar en combinación con los compuestos que ahora se desvelan.

20 Algunos agentes intercaladores y de reticulación de ADN que se pueden incorporar en los compuestos que se desvelan incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mitomicinas, tales como mitomicina C, bleomicina, clorambucilo, ciclofosfamida y derivados y análogos de los mismos.

Algunos inhibidores de la síntesis de ADN adecuados para su uso como agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo y análogos de los mismos.

25 Algunos ejemplos de inhibidores enzimáticos adecuados para usar en combinación con los compuestos que ahora se desvelan incluyen, pero no se limitan a, camptotecina, etopósido, formestano, tricostatina y derivados y análogos de los mismos.

30 Algunos agentes terapéuticos adecuados para usar con los compuestos que ahora se desvelan influyen en la regulación genética incluyen agentes que dan como resultado un aumento o una disminución de la expresión de uno o más genes, tales como, pero no se limitan a, raloxifeno, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona y derivados y análogos de los mismos.

35 En la técnica se conocen inhibidores de la angiogénesis y algunos ejemplos de inhibidores de la angiogénesis adecuados incluyen, pero no se limitan a, angiostatina K1-3, estaurosporina, genisteína, fumagilina, medroxiprogesterona, suramina, interferón-alfa, inhibidores de metaloproteínasa, factor 4 plaquetario, somatostatina, tromboespondina, endostatina, talidomida, y derivados y análogos de los mismos.

40 Otros agentes terapéuticos, en particular agentes anti tumorales, que pueden entrar o no en una o más de las clasificaciones mencionadas anteriormente, también son adecuados para administración en combinación con los compuestos que ahora se desvelan. A modo de ejemplo, tales agentes incluyen adriamicina, apigenina, rapamicina, zebularina, cimetidina, y derivados y análogos de los mismos.

45 En ciertas realizaciones, la sal de IPM o de análogo de misma se administra en combinación con un regulador de la transcripción de ADN y/o ARN tal como doxorubicina. En ciertas realizaciones alternativas, la sal de IPM o análogo de misma se administra en combinación con un agente de unión a microtúbulos tal como docetaxel o paclitaxel.

50 En ciertas realizaciones, las combinaciones que se describen en el presente documento pueden tener una naturaleza sinérgica, lo que significa que el efecto terapéutico de la combinación de la sal de IPM o análogo de misma y el otro agente o agentes terapéuticos es mayor que la suma de los efectos individuales cuando los dos o más agentes se administran por separado en la misma cantidad.

55 En algunas de tales realizaciones, tal efecto sinérgico puede permitir la administración de dosis subterapéuticas de la sal de IPM o análogo de misma. En algunas de tales realizaciones, la administración de una dosis subterapéutica puede reducir o evitar un efecto secundario asociado con dosis más elevadas de la sal de IPM o análogo de misma, por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden ser ventajosos sobre terapias de combinación existentes al permitir que los agentes anticáncer convencionales ejerzan un efecto mayor a una cosificación menor.

60 En ciertas realizaciones, la eficacia del agente adicional aumenta cuando se administra en combinación con una sal de IPM o análogo de la misma. En algunas de tales realizaciones, el agente adicional es un agente quimioterapéutico, que incluye, pero no se limita a, agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o reticuladores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y/o ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores genéticos, y/o inhibidores de la angiogénesis. En algunas de tales realizaciones, la eficacia de un agente de unión a microtúbulos, tal como docetaxel o paclitaxel, aumenta cuando se administra en combinación con una sal de IPM o análogo de la misma. En algunas de tales realizaciones alternativas, la eficacia de un inhibidor de la transcripción de ADN y/o ARN, tal como doxorubicina, aumenta cuando

65

se administra en combinación con una sal de IPM o análogo de la misma. En ciertas realizaciones, la sal de IPM o análogo de misma es IPM•Tris.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "dosis subterapéutica" incluye una dosis que puede estabilizar o reducir el volumen tumoral, pero que no se consideraría un tratamiento eficaz a esa dosis, o incluso una dosis que sola no proporciona un efecto terapéutico mensurable.

10 En ciertas realizaciones, la sal de IPM o análogo de misma se administra a una dosis de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 400 mg, o incluso de aproximadamente 175 mg a aproximadamente 300 mg. En ciertas realizaciones, la sal de IPM o análogo de misma se administra a una dosis de aproximadamente 150 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 185 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 225 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 275 mg, aproximadamente 285 mg, aproximadamente 290, o incluso aproximadamente 300 mg. En algunas de tales realizaciones la sal de IPM o análogo de misma que se administra a tales dosis se administra por vía oral.

15 En algunas de tales realizaciones la sal de IPM o análogo de misma se administra en combinación con doxorubicina a una dosis de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 110 mg a aproximadamente 180 mg, o incluso de aproximadamente 115 a aproximadamente 150 mg. En algunas de tales realizaciones la sal de IPM o análogo de misma se administra en combinación con doxorubicina a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 185 mg, o incluso aproximadamente 200 mg.

20 En algunas de tales realizaciones la sal de IPM o análogo de misma se administra en combinación con docetaxel a una dosis de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 g, de aproximadamente 75 mg a aproximadamente 195 mg, o incluso de aproximadamente 80 a aproximadamente 190 mg. En algunas de tales realizaciones la sal de IPM o análogo de misma se administra en combinación con docetaxel a una dosis de aproximadamente 50 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, o incluso aproximadamente 200 mg.

### 35 *III. Definiciones*

Las siguientes explicaciones de expresiones y ejemplos se proporcionan para describir mejor los presentes compuestos, composiciones y métodos, y para guiar a los expertos habituales en la materia en la práctica de la presente divulgación. También se entiende que la terminología usada en la divulgación es solamente con el fin de describir realizaciones y ejemplos en particular y no pretende ser limitante.

40 En el presente documento, los intervalos se pueden expresar como de "aproximadamente" un valor en particular, y/o a "aproximadamente" otro valor en particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye de un valor en particular y/o al otro valor en particular. De forma análoga, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor en particular forma parte de otra realización. También se entenderá que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con respecto al otro punto final, como independientemente del otro punto final.

50 La expresión "amina alifática acíclica" se refiere a una amina alifática como se ha mencionado anteriormente, en la que al menos uno de los grupos alifáticos es acíclico.

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

55 En el presente documento, la expresión "inhibidor de la angiogénesis" se usa para hacer referencia a una molécula que incluye, pero no se limita a, biomoléculas tales como péptidos, proteínas, enzimas, polisacáridos, oligonucleótidos, ADN, ARN, vectores recombinantes, y moléculas pequeñas que funcionan para inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos. La angiogénesis está implicada en ciertos procesos patológicos, tales como los implicados en trastornos tales como retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, dermatitis, psoriasis, úlceras estomacales, y la mayoría de los tipos de tumores sólidos humanos.

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

65 La expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo que se puede desplazar con un nucleófilo. Con referencia a los

compuestos que ahora se desvelan, grupo saliente se refiere a un grupo que se puede desplazar para formar un compuesto intermedio de aziridinio, o se puede desplazar directamente mediante un nucleófilo biomolecular, tal como un nucleófilo de ácido nucleico, para formar, por ejemplo, una especie de guanidinio 7-alquilada. Algunos ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen los halógenos y los sulfonatos (-SO<sub>2</sub>R). En ciertas realizaciones de las sales de análogos de isofosforamida que se desvelan, el compuesto es un compuesto de grupo saliente "mixto", que incluye dos tipos diferentes de grupos salientes, por ejemplo un halógeno y un sulfonato o dos halógenos diferentes, tales como un bromuro y un cloruro. El documento de Patente de Estados Unidos N° 6.197.760 de Struck enseña métodos para preparar tales compuestos de grupo saliente.

"Neoplasia" se refiere al proceso de un crecimiento celular anómalo y descontrolado. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo. El producto de la neoplasia es una neoplasia (un tumor), que es un crecimiento anómalo de tejido que resulta de una división celular excesiva. Un tumor que no forma metástasis se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede hacer metástasis se denomina "maligno".

"Opcional" u "opcionalmente" se refiere a que el suceso o circunstancia que se describe posteriormente se puede producir, pero no es necesario que se produzca, y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia se produce y casos en los que no se produce.

Como se usa en el presente documento, el término estable se refiere a que el compuesto no se degrada más de un 5%, preferentemente no más de un 2% o incluso un 1% durante al menos cinco días, o el periodo de tiempo especificado. Tal degradación se puede controlar mediante RMN <sup>1</sup>H, HPLC, u otros medios adecuados.

Como se usa en el presente documento, y tal como se entiende bien en la técnica, el "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Algunos resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del alcance de la enfermedad, patología estabilizada (es decir, que no empeora), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o disminución de la evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede hacer referencia a prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada sino se recibe tratamiento.

#### IV. Ejemplos

La divulgación mencionada anteriormente se explica adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

##### Ejemplo 1

Un reactor se cargó con Tris (103,3 mg) y MeCN (3 ml) seguido de la adición de IPM (200,5 mg) en MeCN (3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche. El sólido se recogió a continuación por filtración y la torta se lavó con MeCN. La torta se secó al vacío hasta peso constante para proporcionar el producto final (296 mg). El producto final se sometió a difracción de rayos X con el método de polvo para confirmar la cristalinidad (Figura 2). La cristalinidad estaba apoyada adicionalmente por DSC cuando apareció un pico pronunciado al 105,77 (Figura 3). Además, la sal de IPM·Tris presentaba una pérdida de peso de un 0,7692% aproximadamente a 125°C por TGA (Figura 4). Por último, SEM mostró que IPM·Tris presentan una forma cristalina similar a la de una placa.

La estabilidad de la IPM·Tris cristalina se controló por RMN <sup>1</sup>H y se encontró que permanecía estable a temperatura ambiente hasta seis días. La estabilidad de la estructura cristalina se controló por DSC que indicaba que los cristales de IPM·Tris no habían absorbido agua ni cambiado en su estructura durante el transcurso de diez días a temperatura ambiente.

##### Ejemplo 2

Un reactor se cargó con Tris (8,563 g) y DMF (40 ml) y se calentó para formar una solución transparente. Después de haber enfriado la solución a temperatura ambiente, se añadió IPM. La mezcla se agitó para formar una solución transparente. A continuación se añadieron a la solución acetonitrilo (40 ml) y una pequeña cantidad de semillas, seguido de la adición lenta de MTBE (240 ml) para dar una suspensión. La suspensión se agitó durante otra hora momento en el que el precipitado se recogió por filtración, y la torta de filtro se lavó con MTBE (80 ml). La torta de filtro se secó al vacío hasta peso constante a temperatura ambiente para proporcionar el producto final (23,2 g).

##### Ejemplo 3

Se implantaron fragmentos de 30 a 40 mg de tumores de mama humanos MX-1 a partir de un pasaje *in vivo* por vía subcutánea en ratones nu/nu en el pániculo adiposo mamario y se permitió que alcanzaran un peso de 75-200 mg antes del comienzo del tratamiento. El tratamiento comenzó el Día 10 después del implante del tumor; la administración se realizó por vía intraperitoneal una vez diariamente durante 5 días. IPM·(LYS)<sub>2</sub> (IPM al 43% y Lys al 57%) y IPM·Tris presentaban una actividad similar con respecto a tumores de MX-1 cuando las dosis se normalizaban con respecto a IPM (véase la Figura 6).

*Ejemplo 4*

Se implantaron fragmentos de 30 a 40 mg de tumores de mama humanos MX-1 a partir de un pasaje *in vivo* sc en ratones nu/nu en el pániculo adiposo mamario y se permitió que alcanzaran un peso de 75-200 mg antes del comienzo del tratamiento. El tratamiento comenzó el Día 10 después del implante del tumor; la administración se realizó por vía intraperitoneal o por vía oral una vez diariamente durante 5 días. IPM-Tris, que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, a las dosis máximas toleradas para cada administración, era igualmente activa con respecto a los tumores de MX-1 cuando se administraba por vía oral o por vía sistémica (véase la Figura 7).

*Ejemplo 5**Ensayo de Proliferación Celular*

La inhibición del crecimiento se determinó mediante el método de tetrazolio en microcultivo. En resumen, se sembraron semillas en placas de microtitulación con fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 500 células/pocillo en 100  $\mu$ l de medios. Después de un periodo de incubación de una noche, se añadieron 100  $\mu$ l de medios que contenían IPM·(LYS)<sub>2</sub> para conseguir concentraciones finales específicas y un volumen final de 200  $\mu$ l/pocillo. Los puntos de datos representan la viabilidad media y las barras de error (desviación estándar de cada experimento realizada por triplicado). A las 120 horas, las actividades metabólicas relativas de las células tratadas y sin tratar se midieron mediante conversión mitocondrial de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazon-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma, St. Louis, MO) en formazina. Al finalizar el tratamiento farmacológico, se añadieron 250  $\mu$ g de MTT a cada pocillo y se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5% durante 6 horas. Los cristales de formazina se disolvieron en DMSO y la densidad óptica a 595 nm se midió en un espectrofotómetro VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La viabilidad se definió como la absorbancia a 595 nm en las muestras tratadas dividido entre la absorbancia a 570 nm en las muestras de control. La CI<sub>50</sub> se definió como la concentración a la que la viabilidad de las células tratadas era un 50% de la de los controles (tratado/control = 0,5).

*Modelos de Xenoinjerto Murino*

Ratones scid\*/\* hembra CB17 (Taconic Farms, Germantown, NY) se implantaron con tumor subcutáneo en el costado. La línea tumoral OS31 se estableció en el Hospital de Investigación del Cáncer Infantil de St. Judes y se ha descrito anteriormente (20). Para el trasplante con tumor OS1, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 4%. Después de realizar una pequeña incisión en el costado del ratón, se implantó una sección de tumor de 4 mm por 4 mm por vía subcutánea.

Ratones scid\*/\* hembra CB17 (Taconic Farms, Germantown, NY) se trataron con IPM·(LYS)<sub>2</sub> diariamente durante 1 o 3 días a través de inyección en la vena de la cola comenzando el día 1 cada 21 días durante 2 ciclos. Cinco ratones que no portaban tumor se asignaron a cada grupo de tratamiento. Los ratones se trataron con cualquiera de 75 mg/kg/día, 100 mg/kg/día, 150 mg/kg/día, o 200 mg/kg/día de IPM·(LYS)<sub>2</sub>. Un suceso tóxico se definió como una pérdida de peso superior o igual a un 20% del peso del animal en el momento de la clasificación al azar, o muerte. La MTD se define como la dosis más elevadas a la que no se produce toxicidad.

Cuando los tumores tenían un diámetro de aproximadamente 0,20 cm a 0,7 cm, los ratones que portaban tumor se clasificaron a lanzar en grupos de 5 a 8 ratones con 1 grupo de tratamiento y 1 grupo de control. Los ratones tratados recibieron tasidotina a una dosis de 90 mg/kg/día en forma de una inyección intraperitoneal diariamente durante 5 días comenzando en los días 1 y 21. Suponiendo un tumor esférico, el volumen se determinaba con la fórmula:  $\text{mm}^3 = \frac{1}{6}(D)d^2$ , en la que D es el diámetro máximo y d es el diámetro perpendicular a D. Los volúmenes se expresan como volúmenes tumorales relativos (RTV) en los que el volumen tumoral en cualquier punto temporal dado se divide entre el volumen tumoral de partida. El RTV para los ratones tratados y de control se midió un mínimo de una vez a la semana.

*Evaluación de la Respuesta Tumoral y Consideraciones Estadísticas en Ratones*

Usando los criterios que se han definido anteriormente por Houghton, *et al.*, la enfermedad progresiva se define como menos de un 50% de regresión a partir del volumen del tumor original durante todo el periodo del estudio (RTV > 0,5) y superior a un 25% de aumento en el volumen del tumor al final del periodo de estudio (RTV > 1,25). La regresión del tumor en la enfermedad estable que no supera un 50% del volumen tumoral original durante todo el periodo de estudio (RTV > 0,5) y menos de un 25% de aumento en el volumen del tumor al final del periodo de estudio (RTV < 1,25). Una respuesta parcial se define como más de un 50% de regresión en el volumen tumoral (RTV < 0,5) pero con una masa tumoral que se puede medir superior a 0,10 cm<sup>3</sup>. La pérdida de masa tumoral que se puede medir (< 0,10 cm<sup>3</sup>) en cualquier momento durante el periodo de tratamiento (6 semanas) se definía como una respuesta completa (CR). Una CR sostenida se definía como una pérdida de masa tumoral que se puede medir (< 0,10 cm<sup>3</sup>) en cualquier momento después del comienzo de la terapia sin recrecimiento durante el periodo de estudio de 6 semanas. Los ratones que morían antes de la semana 9 o antes de que el tumor alcanzara 4 veces el volumen inicial se excluyeron.

El análisis estadístico se basó en la supervivencia libre de sucesos (EFS). Un suceso se define como un volumen tumoral relativo de 4x (es decir, cuádruple del tamaño del tumor de partida), o muerte. La EFS se define como el tiempo desde el comienzo del estudio hasta un suceso. Para los tumores que no alcanzan un suceso hacia las 6 semanas, el final del periodo de estudio, el tiempo de EFS se excluía en ese momento. El ensayo de clasificación logarítmica exacta se usó para comparar distribuciones de supervivencia libres de sucesos entre grupos de tratamiento y de control. Además, el día 22, los RTV para los ratones de control y tratados se compararon usando el ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney. Esto permite la comparación del volumen tumoral después de un ciclo de tasidotina y en el momento o cerca del momento del suceso para los ratones sin tratar.

*Datos Biológicos*

Las líneas celulares tumorales usadas incluían líneas de rhabdomyosarcoma RD y RH30 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA), línea de osteosarcoma Saos-2, líneas de sarcoma de Ewing SKPNDW y SKES1, y líneas de sarcoma sinovial HSSYII y SYOI. Las células se cultivaron en monocapa a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en medios de MEM (Saos-2, SYO-1, HSSY-II), DME (SK-PN-DW, RD), o RPMI (RH30) complementados con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), y glutamina al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los resultados muestran a continuación (Figuras 8 y 9).

Línea Celular	Histología	Diariamente x 3 CI <sub>50</sub>	Diariamente x 1 CI <sub>50</sub>
SK-PN-DW	Sarcoma de Ewing	≤ 0,5 µg/ml	≤ 5,0 µg/ml
SK-ES-1	Sarcoma de Ewing	≤ 0,5 µg/ml	≤ 5,0 µg/ml
RH30	Rhabdomyosarcoma Alveolar	≤ 1,0 µg/ml	≤ 1,0 µg/ml
RD	Rhabdomyosarcoma Embrionario	≤ 5,0 µg/ml	≤ 1,0 µg/ml
SYO-1	Sarcoma Sinovial	≤ 1,0 µg/ml	≤ 1,0 µg/ml
HSSY-II	Sarcoma Sinovial	≤ 0,5 µg/ml	≤ 0,5 µg/ml
SaOS	Osteosarcoma	≤ 5,0 µg/ml	≤ 5,0 µg/ml
OS222	Osteosarcoma	≤ 5,0 µg/ml	≤ 10,0 µg/ml
OS229	Osteosarcoma	≤ 0,5 µg/ml	≤ 0,5 µg/ml
OS230	Osteosarcoma	≤ 5,0 µg/ml	≤ 5,0 µg/ml

La resistencia a ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFOS) es un obstáculo principal para superar el tratamiento para el cáncer. Los ratones con xenoinjertos de células de sarcoma humano resistentes a CPA presentaban una reducción de más de 5 veces en el crecimiento del sarcoma cuando se trataban con IPM·(LYS)<sub>2</sub>; la terapia con CPA no tenía efecto (Figuras 10 a 12).

*Ensayos Clínicos en Seres Humanos*

Los estudios en fase I de seguridad y de clasificación de dosis usaron IPM·(LYS)<sub>2</sub> administrada diariamente durante tres días consecutivos cada cuatro semanas (1 ciclo). Los resultados demostraron la evidencia de la actividad clínica en el sarcoma (2/11 sujetos incluyendo al menos uno que había fracasado en la terapia con IFOS) y mesotelioma (1 sujeto con enfermedad estable prolongada). La dosis máxima tolerada (MTD) de IPM·(LYS)<sub>2</sub> en este programa era de 400 mg/m<sup>2</sup>/d. Se producía una pequeña toxicidad en la médula ósea y ninguna cistitis hemorrágica (toxicidad en la vejiga) o toxicidad en el SNC. La toxicidad limitante de la dosis se caracterizaba por desequilibrios en los electrolitos. Esta MTD es comparable con las dosis de IFOS superiores a 25 g/m<sup>2</sup> y esta dosis consigue niveles en suero que son 25 veces superiores a las dosis que eliminan un 50% de las líneas celulares de sarcoma humano.

*Ejemplo 6*

*Materiales y Métodos*

Cuidado Animal: Se adquirieron ratones CD2F1 macho de cinco a seis semanas de edad en el Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MD).

Modelo Tumoral: Los ratones se implantaron ip con un millón de células de leucemia murina P388 usando una aguja de calibre 23. La línea tumoral P388 se mantuvo como un pasaje *in vivo*. El día del implante del tumor se designó

como el día 0, con el tratamiento comenzando el día 1 después del implante del tumor. Se implantó un número suficiente de ratones de modo que para el ensayo se seleccionaron los animales con pesos corporales en un intervalo lo más estrecho posible.

5 Formulación del Fármaco: IPM·(LYS)<sub>2</sub>, proporcionado en viales pesados previamente de 100 mg, se formuló en solución salina en el primer día de tratamiento (día 1) a una concentración de 70 mg/ml. A continuación, una parte de esta solución se diluyó hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 46,65 mg/ml, 23,35 mg/ml, 14 mg/ml, 9,35 mg/ml, 4,65 mg/ml, y 2,8 mg/ml. En los días de tratamiento posteriores, IPM·(LYS)<sub>2</sub> se formuló a 14 mg/ml y a continuación una parte de esa solución se diluyó hasta las concentraciones de dosificación más bajas. Todas las inyecciones se administraron sobre la base del peso corporal exacto con el volumen de inyección siendo 0,2 ml/10 g de peso corporal.

15 Tratamiento con el Fármaco: El estudio consistía en ocho grupos de tratamiento de ocho ratones por grupo y dos grupos de control tratados con vehículo con diez ratones para un total de 84 ratones en el primer día de tratamiento. IPM·(LYS)<sub>2</sub> se administró como una sola inyección el día 1 (q1d x 1) a dosificaciones de 1400 mg/kg, 933 mg/kg, y 467 mg/kg administradas po y a una dosificación de 280 mg/kg administrada ip. IPM·(LYS)<sub>2</sub> también se administró diariamente durante cinco días consecutivos (q1d x 5) a dosificaciones de 280 mg/kg/dosis, 187 mg/kg/dosis, y 93 mg/kg/dosis administradas po y a una dosificación de 56 mg/kg/dosis administrada ip. Un grupo de control se trató con solución salina administrada po como una sola inyección en el día 1. El segundo grupo de control se trató con solución salina administrada po en un programa de tratamiento de qld x 5.

Duración del Estudio: El estudio se terminó a los 61 días después del implante del tumor. Cualquier animal que llegaba estar moribundo se sacrificaba antes de la finalización del estudio.

25 Parámetros Evaluados: Número de muertes no específicas, media de días de muerte, y el aumento de la esperanza de vida basándose en el día medio de la muerte y expresado como porcentaje (% de ILS); tiempo medio de supervivencia y el % de ILS calculado basándose en el tiempo medio de supervivencia.

30 Análisis Estadístico: El tiempo de supervivencia de los animales individuales se usó como el punto final en un análisis de tablas de vida (estimación de Kaplan-Meier estratificada seguido del ensayo de clasificación logarítmica de Mantel-Haenszel) con el fin de comparar estadísticamente los datos de supervivencia entre grupos. Un análisis de las tablas de vida permite comparar los datos de supervivencia entre los grupos usando los animales que no alcanzaron el punto final excluyéndolos.

### 35 *Resultados*

El día medio de la muerte en ambos de los grupos de control tratados con vehículo fue 11,0, con las muertes produciéndose entre los días 10 y 14. La ascitis estaba presente en todos los animales.

40 La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada po como un solo tratamiento proporcionado el día 1, era tóxica para los ratones en dosificaciones de 1400 mg/kg y 933 mg/kg. En el grupo que recibe tratamiento con la dosificación de 1400 mg/kg, un animal murió y cuatro animales se sacrificaron. Debido a su estado moribundo en el día 5, dos animales se sacrificaron en el día 6, y el último animal murió el día 10. En el grupo que recibe tratamiento con la dosificación de 933 mg/kg, seis animales se sacrificaron en el día 5 debido a su estado moribundo y los dos animales restantes en el grupo murieron en el día 9. La necropsia no indicaba presencia de tumor en estos dos grupos de tratamiento. antes de la muerte o eutanasia de los animales, se observaron pérdidas de peso significativas de un 24% y un 22% en los grupos que recibían IPM·(LYS)<sub>2</sub> en las dosificaciones de 1400 mg/kg y 933 mg/kg, respectivamente. La IPM·(LYS)<sub>2</sub> administrada a una dosificación de 467 mg/kg como un solo tratamiento po se toleraba mejor; sin embargo, dos animales se sacrificaron en el día 8 debido a su estado moribundo. La pérdida máxima en peso corporal medio para este grupo era de un 8%. Los seis animales restantes en el grupo murieron entre los días 11 y 15 y se determinó que tenían ascitis presente después de la necropsia. El ILS para este grupo de tratamiento era de un 9% ya fuera si el cálculo se basaba en el día en medio de la muerte o tiempo medio de supervivencia. La comparación estadística de los datos de supervivencia para este grupo con la del grupo de control tratado con vehículo (grupo 1, tratado con q1d x 1) indicaba que la diferencia no era significativa.

55 La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada ip a una dosificación de 280 mg/kg como una sola inyección se toleró sin muertes y con una pérdida mínima de peso corporal medio (4%, 1 g). El día medio de la muerte para este grupo era 34,5 con un ILS de un 214%. El tiempo medio de supervivencia fue de 38,0 días con un ILS de un 245%. Además, dos animales sobrevivieron hasta la finalización del estudio en el día 61. La necropsia no indicaba tumor presente. El análisis estadístico de los datos de supervivencia para este grupo de tratamiento y el grupo de control tratado con vehículo (grupo 1, tratado con q1d x 1) indicaba que la indiferencia era significativa.

65 La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada po a dosificaciones de 280 mg/kg/dosis, 187 mg/kg/dosis, y 93 mg/kg/dosis en un programa de tratamiento con qld x 5, se toleró sin muertes relacionadas con el tratamiento. Se observó una pérdida mínima en el peso corporal medio (4%, 1 g) en el grupo que recibió IPM·(LYS)<sub>2</sub> a una dosificación de 280 mg/kg/dosis. No se observó pérdida de peso para los dos grupos de dosificación más baja. Los días medios de la

muerte y el tiempo medio de supervivencias fueron de 17,0 días, 17,0 días, y 15,0 días con valores de ILS de un 55%, un 55%, y un 36% para las dosificaciones de 280 mg/kg/dosis, 187 mg/kg/dosis, y 93 mg/kg/dosis, respectivamente. La comparación estadística de los datos de supervivencia para cada uno de estos tres grupos con datos de supervivencia para el control tratado con vehículo (grupo 6, tratado con q1d x 5) indicaba que el aumento de la esperanza de vida para cada grupo era estadísticamente significativo.

La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada ip a una dosificación de 56 mg/kg/dosis en un programa de inyección de q1d x 5, era bastante eficaz frente a la leucemia P388/0 con un día medio de muerte de 28,5. La primera muerte se produjo en el día 24 y la última muerte en el día 33, con cuatro de los ocho animales en el grupo sobreviviendo hasta el momento de la finalización del estudio en el día 61. El valor de ILS calculado basándose en el día medio de la muerte era de un 159%. El tiempo medio de supervivencia para este grupo de tratamiento fue > 47,0 días con un valor de ILS calculado de un 327%. Este régimen de tratamiento se toleró bien con ninguna muerte relacionada con el tratamiento y una pérdida de un 4% (1 g) en el peso corporal medio. Cuando los datos de supervivencia para este grupo se compararon estadísticamente con los del grupo de control tratado con vehículo (grupo 6, tratado con q1d x 5) se encontró que la diferencia era significativa.

*Sumario del Análisis Estadístico*

Pares del Grupo	valor de p
1 con respecto a 4	0,192
1 con respecto a 5	0,000
4 con respecto a 5	0,000
6 con respecto a 7	0,000
6 con respecto a 8	0,000
6 con respecto a 9	0,000
6 con respecto a 10	0,000
7 con respecto a 10	0,000

*Conclusiones*

La IPM·(LYS)<sub>2</sub> era tóxica para los ratones tanto cuando se administraba po como un solo tratamiento en las dosificaciones de 1400 mg/kg y 933 mg/kg. Un solo tratamiento con la dosificación de 467 mg/kg administrada po se toleraba pero obtenía solamente un aumento mínimo de la esperanza de vida que no era estadísticamente significativo. La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada como una sola inyección ip en una dosificación de 280 mg/kg, era bastante eficaz y daba como resultado dos supervivientes a los 61 días y un aumento significativo de la esperanza de vida.

La IPM·(LYS)<sub>2</sub>, administrada po en un programa de q1d x 5 en las dosificaciones de 280, 187, y 93, se toleraba mucho mejor y era mucho más eficaz frente a la leucemia P388/0 que los tratamientos individuales con dosis más elevadas. El tratamiento con las tres dosificaciones administradas po q1d x 5 producía aumentos estadísticamente significativos en la en esperanza de vida. Cuando se administraba ip en un programa de tratamiento con q1d x 5 en una dosificación de 56 mg/kg/dosis, la IPM·(LYS)<sub>2</sub> lograba aumentos significativos en la esperanza de vida con cuatro de ocho animales en el grupo sobreviviendo hasta la finalización del estudio en el día 61.

*Ejemplo 7*

*Materiales y Métodos*

**Cuidado Animal:** Se adquirieron ratones NCr-nu/nu atímicos hembra de cinco semanas de edad en Taconic Farms (Germantown, NY).

**Modelo Tumoral:** Se implantaron fragmentos de 30 mg a 40 mg de tumores de mama humanos MX-1 mantenidos en un pasaje *in vivo* sc en ratones en el panículo adiposo mamario usando una aguja trócar del calibre 12 y se permitió que crecieran. El día del implante del tumor se denominó día 0. Se permitió que los tumores alcanzaran 138-245 mg de peso (138-245 mm<sup>3</sup> de tamaño) antes del comienzo del tratamiento. Un número suficiente de ratones fueron implantados de modo que los tumores en un intervalo de peso lo más estrecho posible se seleccionaron para el ensayo en el día del comienzo del tratamiento (día 10 después del implante del tumor). Esos animales seleccionados con tumores en el intervalo de tamaño apropiado se asignaron a los diversos grupos de tratamiento de modo que los pesos medios del tumor en el primer día de tratamiento estaban tan próximos entre sí como era posible (172-197 mg).

Formulación del Fármaco: Tanto IPM·Tris (205 mg de IPM/vial) que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, como IPM se formularon en solución salina en el primer día de tratamiento (día 10) a una concentración de 6,0 mg/ml y después se diluyó con solución salina hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 4,05 mg/ml, 1,8 mg/ml, y 1,2 mg/ml. La IPM·(LYS)<sub>2</sub> (100 mg de IPM-Lisina/vial) se formuló en solución salina en el primer día de tratamiento a una concentración de 14 mg/ml y después se diluyó con solución salina hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 9,35 mg/ml, 4,2 mg/ml y 2,8 mg/ml. A continuación se tomaron alícuotas de cada concentración para uso diario, se congelaron, se almacenaron a -20°C, y se descongelaron para uso diario. Todas las inyecciones se administraron sobre la base del peso corporal exacto con el volumen de inyección siendo 0,2 ml/10 g de peso corporal.

Tratamiento con el Fármaco: El experimento consistía en 12 grupos de tratamiento de ocho ratones por grupo y dos grupos de control tratados con vehículo con diez ratones cada uno con un total de 116 ratones en el primer día de tratamiento. Todos los agentes (y vehículo) se administraron diariamente durante cinco días consecutivos (q1d x 5). Tanto IPM·Tris como IPM se administraron ip a dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis y po a dosificaciones de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis. IPM·(LYS)<sub>2</sub> se administró ip a dosificaciones de 84 mg/kg/dosis y 56 mg/kg/dosis y po a dosificaciones de 280 mg/kg/dosis y 187 mg/kg/dosis. Los grupos de control se trataron ya sea ip o po con el vehículo (solución salina).

Medidas del Tumor y Pesos Corporales: Los tumores sc se midieron y los animales se pesaron dos veces a la semana comenzando con el primer día de tratamiento. El volumen tumoral se determinó mediante medidas con calibre (mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide:

$$L \times W^2 / 2 = \text{mm}^3,$$

en la que L y W se refieren a las dimensiones perpendiculares mayor y menor tomadas en cada medida. Esta fórmula también se usa para calcular el peso del tumor, suponiendo una densidad unitaria (1 mm<sup>3</sup> = 1 mg).

Duración del Estudio: El estudio se terminó a los 50 días después del implante del tumor. Cualquier animal que llegaba a estar moribundo o cuyos tumores se habían ulcerado o alcanzado 4.000 mg se sacrificaron antes de la finalización del estudio.

Parámetros Evaluados: Se determinó el número de muertes no específicas, número de regresiones tumorales parciales y completas, número de supervivientes libres de tumor, y los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral de los animales individuales. El tiempo medio para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral en los grupos de tratamiento (T) y grupo de control (C) se usó en el cálculo del retardo global en el crecimiento del tumor medio (T-C).

Análisis Estadístico: El tiempo para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral del animal individual se usó como el punto final en un ensayo de t de Student/suma de clasificación de Mann Whitney o análisis de tablas de vida con el fin de comparar estadísticamente los datos de crecimiento entre grupos. Un análisis de tablas de vida (estimación de Kaplan-Meier estratificada seguido del ensayo de clasificación logarítmica de Mantel-Haenszel) permite la comparación de los datos de crecimiento entre grupos usando los animales cuyos tumores no alcanzaron el punto de evaluación excluyéndolos.

### Resultados

Los tumores en ambos grupos de control tratados con vehículo crecieron bien en los 10 ratones. El tumor medio alcanzó dos duplicaciones de la masa tumoral en 7,4 y 7,2 días, respectivamente, para los grupos tratados ip y tratados po. No se produjo pérdida en el peso corporal medio para estos dos grupos durante el estudio.

La administración intraperitoneal de IPM·Tris a dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis provocaron retrasos en el crecimiento del tumor (T-C) de 10,2 y 7,7 días, respectivamente. La dosificación más elevada presentó un superviviente libre de tumor. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 10% (2 g) y de un 0% para dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, respectivamente. La administración intraperitoneal de IPM a dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 5,2 y 2,6 días, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 0% y un 5% (1 g) para dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, respectivamente. Los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral para IPM eran estadísticamente menores que aquéllos para la dosificación correspondiente de IPM·Tris (p = 0,000 para la dosificación de 36 mg/kg/dosis; p = 0,021 para la dosificación de 24 mg/kg/dosis). La administración intraperitoneal de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a dosificaciones de 84 mg/kg/dosis y 56 mg/kg/dosis, que corresponden a dosificaciones de IPM de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 24,3 y 9,0 días, respectivamente. La dosificación más elevada de IPM·(LYS)<sub>2</sub> era tóxica - dos ratones murieron en el día 20 y dos se sacrificaron debido a su estado

moribundo o pérdida excesiva del peso corporal. La dosificación más baja de IPM·(LYS)<sub>2</sub> se toleraba con una pérdida máxima del peso corporal medio de un 15% (3 g). La dosificación de IPM·(LYS)<sub>2</sub> tolerada presentaba una actividad comparable con la de IPM·Tris a una dosificación correspondiente de 24 mg/kg/dosis (p = 0,766) y una actividad superior que la de IPM a una dosificación correspondiente de 24 mg/kg/dosis (p = 0,0047).

La administración oral de IPM·Tris a dosificaciones de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 8,7 y 9,0 días, respectivamente. La dosificación más elevada de IPM·Tris provocó una pérdida máxima en el peso corporal medio de un 15% (3 g) con un ratón siendo sacrificado debido a un peso corporal inferior a 14 g. La dosificación más baja se toleraba con una pérdida máxima del peso corporal medio de un 10% (2 g). La administración oral de IPM a dosificaciones de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 4,6 y 4,0 días, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con una pérdida máxima del peso corporal medio de un 5% (1 g). Los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral no eran estadísticamente diferentes de los tiempos para la dosificación correspondiente de IPM·Tris (p = 0,1174 para la dosificación de 120 mg/kg/dosis; p = 0,1152 para la dosificación de 81 mg/kg/dosis). La administración oral de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a dosificaciones de 280 mg/kg/dosis y 187 mg/kg/dosis, que corresponden a dosificaciones de IPM de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis, provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 5,0 y 3,5 días, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 5% (1 g) y un 0%. La dosificación más elevada de IPM·(LYS)<sub>2</sub> presentaba actividad comparable tanto con la de IPM·Tris como con la de IPM a una dosificación correspondiente de 120 mg/kg/dosis (p = 0,1000 y p = 0,9143, respectivamente). La dosificación más baja de IPM·(LYS)<sub>2</sub> presentaba una actividad inferior a la de IPM·Tris a una dosificación correspondiente de 81 mg/kg/dosis (p = 0,0290) y una actividad comparable con la de IPM a una dosificación correspondiente de 81 mg/kg/dosis (p = 0,3073).

Sumario de la Tabla de Análisis Estadístico

Pares del Grupo	Valor de p
2 con respecto a 4	0,000 <sup>1</sup>
3 con respecto a 5	0,021 <sup>1</sup>
3 con respecto a 7	0,766 <sup>1</sup>
5 con respecto a 7	0,0047 <sup>2</sup>
9 con respecto a 11	0,1174 <sup>3</sup>
9 con respecto a 13	0,1000 <sup>3</sup>
11 con respecto a 13	0,9143 <sup>3</sup>
10 con respecto a 12	0,1152 <sup>3</sup>
10 con respecto a 14	0,0290 <sup>3</sup>
12 con respecto a 14	0,3073 <sup>3</sup>
<sup>1</sup> Análisis de tablas de vida	
<sup>2</sup> Ensayo de suma de clasificación de Mann-Whitney	
<sup>3</sup> Ensayo de t de Student	

La respuesta de los xenoinjertos de tumor de mama humano MX-1 al tratamiento con (1) vehículo - ip y po, (2) IPM·Tris, IPM, e IPM·(LYS)<sub>2</sub> ip, y (3) IPM·Tris, IPM, e IPM·(LYS)<sub>2</sub> po se muestra en las Figuras 13, 14, y 15, respectivamente.

### Conclusión

Para la administración ip de dosificaciones de IPM equivalentes la actividad antitumoral de IPM·Tris era superior a la de IPM (ambas dosificaciones) y comparable con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> (ambas dosificaciones). Para la administración po de dosificaciones equivalentes de IPM, la actividad antitumoral de IPM·Tris era comparable con la de IPM (ambas dosificaciones), comparable con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a la dosificación más elevada, y superior a la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a la dosificación más baja.

### Ejemplo 8

#### Materiales y Métodos

Cuidado Animal: Se adquirieron ratones NCr-nu/nu atómicos hembra de cinco semanas de edad en Harlan (Prattville, AL).

5 Modelo Tumoral: Se implantaron fragmentos de treinta a cuarenta mg de tumor de mama humano MX-1 mantenidos en un pasaje *in vivo* sc en ratones en el panículo adiposo mamario usando una aguja trócar del calibre 12 y se permitió que crecieran. El día del implante del tumor se denominó día 0. Se permitió que los tumores alcanzaran un peso de 113-245 mg (tamaño de 113-245 mm<sup>3</sup>) antes del comienzo del tratamiento. Un número suficiente de ratones fueron implantados de modo que los tumores en un intervalo de peso lo más estrecho posible se seleccionaron para el ensayo en el día del comienzo del tratamiento (día 6 después del implante del tumor). Esos animales seleccionados con tumores en el intervalo de tamaño apropiado se asignaron a los diversos grupos de tratamiento de modo que los pesos medios del tumor en el primer día de tratamiento estaban tan próximos entre sí como era posible (144-162 mg).

15 Formulación del Fármaco: IPM·Tris (205 mg de IPM/vial, Cardinal Health) que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, se formuló en solución salina cada día de tratamiento a una concentración de 13,5 mg/ml y después se diluyó con solución salina hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 9 mg/ml, 6 mg/ml, 4,05 mg/ml, 2,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, y 1,2 mg/ml. La IPM (Eagle-Picher Pharmaceutical Service) se formuló en solución salina cada día de tratamiento a una concentración de 6,0 mg/ml y después se diluyó con solución salina hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 4,05 mg/ml, 1,8 mg/ml, y 1,2 mg/ml. La IPM·(LYS)<sub>2</sub> (100 mg de IPM-Lisina/vial, Universidad de Iowa) se formuló en solución salina cada día de tratamiento a una concentración de 14 mg/ml y después se diluyó con solución salina hasta las concentraciones de dosificación más bajas de 9,35 mg/ml, 4,2 mg/ml, y 2,8 mg/ml. Todas las soluciones de dosificación se mantuvieron en hielo después de la formulación y se administraron en 30 min. Todas las inyecciones se administraron sobre la base del peso corporal exacto con el volumen de inyección siendo 0,2 ml/10 g de peso corporal.

Tratamiento con el Fármaco: El experimento consistía en 16 grupos de tratamiento de ocho ratones por grupo y dos grupos de control tratados con vehículo con diez ratones para un total de 148 ratones en el primer día de tratamiento. Todos los agentes (y vehículo) se administraron diariamente durante cinco días consecutivos (q1d x 5). IPM·Tris ip a dosificaciones de 81 mg/kg/dosis, 54 mg/kg/dosis, 36 mg/kg/dosis, y 24 mg/kg/dosis y po a dosificaciones de 270 mg/kg/dosis, 180 mg/kg/dosis, 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis. La IPM se administró ip a dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis y po a dosificaciones de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis. La IPM·(LYS)<sub>2</sub> se administró ip a dosificaciones de 84 mg/kg/dosis y 56 mg/kg/dosis y po a dosificaciones de 280 mg/kg/dosis y 187 mg/kg/dosis. Los grupos de control se trataron ya sea ip (grupo n° 1) o po (grupo n° 10) con el vehículo (solución salina).

Medidas del Tumor y Pesos Corporales: Los tumores sc se midieron y los animales se pesaron dos veces a la semana comenzando con el primer día de tratamiento. El volumen tumoral se determinó mediante medidas con calibre (mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide:

$$L \times W^2 / 2 = \text{mm}^3,$$

en la que L y W se refieren a las dimensiones perpendiculares mayor y menor tomadas en cada medida. Esta fórmula también se usa para calcular el peso del tumor, suponiendo una densidad unitaria (1 mm<sup>3</sup> = 1 mg).

45 Duración del Estudio: El estudio se terminó a los 52 días después del implante del tumor. Cualquier animal que llegaba a estar moribundo o cuyos tumores se habían ulcerado o alcanzado 4.000 mg se sacrificaron antes de la finalización del estudio.

50 Parámetros Evaluados: Se determinó el número de muertes no específicas, número de regresiones tumorales parciales y completas, número de supervivientes libres de tumor, y los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral de los animales individuales. El tiempo medio para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral en los grupos de tratamiento (T) y grupo de control (C) se usó en el cálculo del retardo global en el crecimiento del tumor medio (T-C).

55 Análisis Estadístico: El tiempo para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral del animal individual se usó como el punto final en un ensayo de t de Student/suma de clasificación de Mann Whitney con el fin de comparar estadísticamente los datos de crecimiento entre grupos.

## 60 Resultados

Los tumores en ambos grupos de control tratados con vehículo crecieron bien en los 10 ratones. El tumor medio alcanzó dos duplicaciones de la masa tumoral en 9,2 y 8,9 días, respectivamente, para los grupos tratados ip y tratados po. No se produjo pérdida en el peso corporal medio para estos dos grupos durante el estudio.

La administración intraperitoneal de IPM·Tris a una dosificación de 81 mg/kg/dosis era tóxica para los ratones, provocando tres muertes y una eutanasia debido al estado moribundo y una pérdida máxima en el peso corporal medio de un 20% (4,5 g). Las dosificaciones más bajas de 54 mg/kg/dosis, 36 mg/kg/dosis, y 24 mg/kg/dosis se toleraban con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 5% (1,2 g), un 6% (1,3 g), y un 1% (0,2 g), respectivamente. Las dosificaciones de 54 mg/kg/dosis, 35 mg/kg/dosis, y 24 mg/kg/dosis provocaron retrasos en el crecimiento del tumor (T-C) de 4,4, 3,3, y 0,9 días, respectivamente. La administración intraperitoneal de IPM a dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis provocó retrasos en el crecimiento del tumor de 1,1 y 0,3 días, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 8% (1,8 g) y un 2% (0,4 g) para dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, respectivamente. Los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral para IPM eran estadísticamente menores que los de las dosificaciones toleradas más elevadas de IPM·Tris pero estadísticamente los mismos que la dosificación correspondiente de IPM·Tris ( $p = 0,0148$  para la dosificación de 54 mg/kg/dosis;  $p = 0,1879$  para la dosificación de 36 mg/kg/dosis). La administración intraperitoneal de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a dosificaciones de 84 mg/kg/dosis y 56 mg/kg/dosis, que corresponden a dosificaciones de IPM de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 0,5 y 0,3 día, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 1% (0,3 g) y un 0% para dosificaciones de 36 mg/kg/dosis y 24 mg/kg/dosis, respectivamente. Los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral para IPM·(LYS)<sub>2</sub> eran estadísticamente menores que para la dosificación tolerada más elevada de IPM·Tris el estadísticamente la misma que la dosificación correspondiente de IPM·Tris ( $p = 0,0104$  para la dosificación de 54 mg/kg/dosis;  $p = 0,1578$  para la dosificación de 36 mg/kg/dosis).

La administración oral de IPM·Tris a dosificaciones de 270 mg/kg/dosis, 180 mg/kg/dosis, y 120 mg/kg/dosis era tóxica para los ratones, provocando ocho muertes/eutanasia debido al estado moribundo, siete muertes, y tres muertes, respectivamente. Las dosificaciones de 180 mg/kg/dosis y 120 mg/kg/dosis provocaron pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 23% (5,3 g) y un 20% (4,7 g), respectivamente. La dosificación más baja de 81 mg/kg/dosis se toleraba con una pérdida máxima del peso corporal medio de un 10% (2,2 g). La dosificación de 81 mg/kg/dosis provocó un retraso del crecimiento tumoral de 2,6 días. La administración oral de IPM a una dosificación de 120 mg/kg/dosis era tóxica para los ratones, provocando dos muertes y una pérdida máxima del peso corporal medio de un 18% (3,8 g). La dosificación más baja de 81 mg/kg/dosis se toleraba con una pérdida máxima del peso corporal medio de un 9% (2 g) y provocó un retraso del crecimiento tumoral de 2,3 días. Los tiempos para alcanzar dos duplicaciones de la masa tumoral no eran estadísticamente diferentes de los tiempos para la dosificación correspondiente de IPM·Tris ( $p = 0,2932$  para la dosificación de 81 mg/kg/dosis). La administración oral de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a dosificaciones de 280 and 187 mg/kg/dosis, que corresponden a dosificaciones de IPM de 120 mg/kg/dosis y 81 mg/kg/dosis, provocaron retrasos en el crecimiento del tumor de 3,9 y 4,7 días, respectivamente. Ambas dosificaciones se toleraban bien con pérdidas máximas en el peso corporal medio de un 14% (3 g) y un 7% (1,6 g). La dosificación más baja de IPM·(LYS)<sub>2</sub> presentaba una actividad similar a la de IPM·Tris a una dosificación correspondiente de 81 mg/kg/dosis ( $p = 0,8785$ ).

40 Sumario de la Tabla de Análisis Estadístico

Pares del Grupo	Valor de p
1 con respecto a 3	0,00101
1 con respecto a 6	0,02302
1 con respecto a 8	0,1456 <sup>z</sup>
3 con respecto a 6	0,0148 <sup>1</sup>
3 con respecto a 8	0,0104 <sup>1</sup>
4 con respecto a 6	0,1879 <sup>z</sup>
4 con respecto a 8	0,1578 <sup>z</sup>
10 con respecto a 14	0,0053 <sup>z</sup>
10 con respecto a 16	0,0234 <sup>1</sup>
10 con respecto a 17	0,0039 <sup>1</sup>
14 con respecto a 16	0,2932 <sup>z</sup>
14 con respecto a 17	0,7209 <sup>1</sup>

Pares del Grupo	Valor de p
14 con respecto a 18	0,8785 <sup>1</sup>
<sup>1</sup> Ensayo de suma de clasificación de Mann-Whitney	
<sup>2</sup> Ensayo de t de Student	

La respuesta de los xenoinjertos de tumor de mama humanos MX-1 al tratamiento con (1) vehículo - ip y po, (2) IPM·Tris, IPM, e IPM·(LYS)<sub>2</sub> ip, y (3) IPM·Tris, IPM, e IPM·(LYS)<sub>2</sub> po se muestra en las Figuras 16, 17, y 18, respectivamente.

5

### Conclusiones

Para la administración ip de dosificaciones de IPM equivalentes la actividad antitumoral de IPM·Tris era comparable tanto con la de IPM como con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> (dosificación más elevada). La dosificación más baja era inactiva frente al tumor MX-1 en este estudio. La dosificación más elevada tolerada de IPM·Tris era superior a la dosificación más elevada sometida al ensayo de cualquiera de IPM o IPM·(LYS)<sub>2</sub>. Para la administración po de dosificaciones equivalentes de IPM, la actividad antitumoral de la IPM·Tris era comparable tanto con la de IPM como con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a la dosificación más baja. La dosificación de 120 mg/kg/dosis era tóxica para los ratones tanto para IPM·Tris como para IPM.

15

En el estudio de MX-1 mencionado anteriormente (Ejemplo 7) para administración ip de dosificaciones de IPM equivalentes la actividad antitumoral de IPM·Tris era superior a la de IPM (ambas dosificaciones) y comparable con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> (ambas dosificaciones). Para la administración po de dosificaciones equivalentes de IPM, la actividad antitumoral de IPM·Tris era comparable con la de IPM (ambas dosificaciones), comparable con la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a la dosificación más elevada, y superior a la de IPM·(LYS)<sub>2</sub> a la dosificación más baja.

20

Al comparar los dos estudios, la actividad de los tres agentes cuando se administran ip era inferior en este estudio (por ejemplo, para IPM·Tris a una dosificación de 36 mg/kg/dosis – valor de T-C de 10,2 días con respecto a 3,3 días; para IPM a una dosificación de 36 mg/kg/dosis – valor de T-C de 5/2 días con respecto a 1,1 días; y para IPM·(LYS)<sub>2</sub> a una dosificación de 56 mg/kg/dosis - valor de T-C de 9,0 días con respecto a 0,3 días). La actividad de IPM·Tris cuando se administraba po también era menor (valores comparables para IPM e IPM·(LYS)<sub>2</sub>) en este estudio (por ejemplo, para IPM·Tris a una dosificación de 81 mg/kg/dosis - valor de T-C de 9,0 días con respecto a 2,6 días; para IPM a una dosificación de 81 mg/kg/dosis - valor de T-C de 4,0 días con respecto a 2,3 días; y para IPM·(LYS)<sub>2</sub> a una dosificación de 280 mg/kg/dosis - valor de T-C de 5,0 días con respecto a 3,9 días). La razón o razones para la disminución de la actividad no son evidentes, dada la variación de estudio a estudio con tales sistemas biológicos. Con respecto al componente tumoral del estudio, los tumores de control tratados con vehículo crecieron a tasas comparables en los dos estudios. Los pesos medios del tumor en el primer día de tratamiento eran ligeramente mayores en el Ejemplo 7 (intervalo de 172-197 mg) que en este ejemplo (intervalo de 144-162 mg); sin embargo, esta pequeña diferencia no tendría efecto significativo en la actividad antitumoral.

35

### Ejemplo 9

#### Materiales y Métodos

Tres grupos de ocho ratones se trataron con IPM·Tris, que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, tres grupos de ocho ratones se trataron con doxorrubicina, un grupo de diez ratones se trató con vehículo, y dieciocho grupos de ocho ratones se trataron con la combinación de IPM·Tris/doxorrubicina. Se implantaron fragmentos de tumor MX-1 (30-40 mg, de un pasaje *in vivo*) por vía subcutánea en el pániculo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos hembra. La IPM·Tris (o su vehículo) se administró por vía intraperitoneal diariamente durante cinco días consecutivos (Q1dx5) a tres dosificaciones (12 mg/kg/dosis, 24 mg/kg/dosis, y 54 mg/kg/dosis), en las que la formulación de IPM·Tris está formada por 258,9 mg de IPM (PM 221,02), 141,9 mg de base de Tris (PM 121,14, proporción molar de IPM:base de Tris a 1:1), y Manitol al 3%. Se administró doxorrubicina (o su vehículo) por vía intravenosa cada cuatro días para tres inyecciones (Q4dx3) a 8 mg/kg/dosis). Las soluciones de dosificación se prepararon en el día de tratamiento y las soluciones de dosificación de IPM·Tris se mantuvieron en hielo una vez preparadas.

50

El tratamiento comenzó cuando los tumores tenían un tamaño de aproximadamente 175 mg (intervalo de 100 mg a 250 mg). Cada tumor se midió con calibre en dos dimensiones y se convirtió en masa tumoral usando la fórmula para una elipsoide alargada ( $a \times b^2/2$ ), en la que a es la dimensión mayor y b es la dimensión menor, suponiendo una densidad unitaria ( $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$ ). Las medidas del tumor se registraron dos veces a la semana y la actividad antitumoral se evaluó mediante el retardo del crecimiento tumoral en los grupos tratados en comparación con el grupo de control tratado con vehículo, regresiones parciales y completas, y supervivientes libres de tumor. Obsérvese que cuando IPM·Tris se administraba a 54 mg/kg/día en combinación con doxorrubicina a 8 mg/kg/día, dos animales en el grupo de combinación murieron pronto debido a la toxicidad. Los resultados se pueden observar

55

en las figuras 19-25.

La combinación de IPM·Tris con doxorubicina dio como resultado una actividad antitumoral significativa, en la que la inhibición del crecimiento tumoral por la combinación superaba la observada con la administración con un solo agente y la combinación aumentaba de forma significativa la supervivencia en comparación con la administración con un solo agente. De hecho, el efecto de la combinación muestra una eficacia sinérgica, es decir, mayor que la eficacia aditiva en comparación con los agentes administrados de forma individual en dosis similares, incluso cuando la dosificación de IPM·Tris sola es tan baja como para proporcionar poca o ninguna mejora cuando se compara con un animal de control tratado con vehículo. Aunque los pesos de los animales en los grupos de combinación se redujeron durante el tratamiento (los pesos medios del animal se redujeron en un 20% al final de la dosificación en el día 22), se recuperaron rápidamente una vez que la dosificación terminó (se observó una recuperación total hacia el día 38), lo que sugiere que la toxicidad era reversible. Estos datos sugieren que la terapia de combinación con IPM·Tris y doxorubicina puede servir para el tratamiento de cualquier cáncer que responde a cualquiera de doxorubicina o IPM·Tris como agentes individuales o en combinación, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de ovario, y sarcoma.

#### Ejemplo 10

Se implantaron fragmentos (de 30 a 40 mg cada uno) de tumores de mama humanos MX-1 a partir de un pasaje *in vivo* por vía subcutánea en ratones desnudos en el panículo adiposo mamario y se permitió que alcanzaran un peso de 75 mg a 198 mg antes del comienzo del tratamiento. La IPM·Tris (54 mg/kg), que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, y docetaxel (10 mg/kg) se administraron Q1Dx5 IP y Q6Dx3 IV, respectivamente, comenzando diez días después del implante del tumor. La combinación de los dos agentes demostró un aumento del efecto antitumoral en comparación con cualquier agente administrado como un solo agente tal como se observa en la Figura 26.

#### Ejemplo 11

Se implantaron fragmentos (de 30 a 40 mg cada uno) de tumores de mama humanos MX-1 a partir de un pasaje *in vivo* por vía subcutánea en ratones desnudos en el panículo adiposo mamario y se permitió que alcanzaran un peso de 75 mg a 198 mg antes del comienzo del tratamiento. Se encontró que IPM·Tris (36 mg/kg), que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, administrada IP suprimía el crecimiento del tumor hasta aproximadamente el mismo alcance que IPM·Tris (81 mg/kg) administrada PO como se observa en la Figura 27. Además, la administración oral o sistémica de IPM·Tris dio como resultado aumentos similares en la supervivencia de ratones portadores de xenoinjerto de MX-1. La supervivencia media del grupo IP fue de 39 días, la supervivencia media del grupo PO fue de 37,5 días, y la supervivencia media del grupo de control de vehículo fue de 30 días como se observa en la Figura 28. La actividad antitumoral equivalente de estas dosis PO e IP está dentro del intervalo esperado para la PK de IPM·Tris administrada por vía oral y por vía sistémica.

#### Ejemplo 12

Se administró IPM·Tris a ratas Sprague-Dawley, que se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 1, una vez al día mediante sonda (PO) o inyección IV en bolo. La IPM·Tris se administró en dosis de 20 mg/kg, 30 mg/kg, o 40 mg/kg y se obtuvieron muestras de sangre para evaluación PK antes de la dosis y a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, y 24 horas después de la dosis desde el seno retro orbital. Se muestrearon tres animales por grupo en cada punto temporal. Los resultados PK para la dosis previa, 0,5, 1, 2, y 4 horas se muestran en la Figura 29 en la que parece que el  $T_{m\acute{a}x}$  es de aproximadamente 0,5 horas. Los cálculos del  $t_{1/2}$  terminal variaban de 0,25 a 0,64 horas. Para cada dosis, se usaron valores del AUC para calcular la bioequivalencia absoluta de IPM·Tris administrada por vía oral como la proporción (AUC después de la dosis PO)/(AUC después de la dosis IV). Los valores del AUC para cada dosis se muestran en la Figura 30 y los valores de  $C_{m\acute{a}x}$  para cada dosis se muestran en la Figura 31. Los valores tanto de AUC como de  $C_{m\acute{a}x}$  aumentaron linealmente con el aumento de la dosis de IPM·Tris administrada PO o IV.

La biodisponibilidad de las dosis PO de 20 mg/kg, 30 mg/kg, y 40 mg/kg de IPM·Tris eran de un 48%, un 65%, y un 73%, respectivamente. La biodisponibilidad media global era de un 62% en hembras. Se observó una PK similar en ratas; sin embargo, se estimó que la biodisponibilidad media en machos era de un 41%.

#### Ejemplo 13

##### 60 Estabilidad de la Solución de IPM·Tris/Manitol e IPM·(LYS)<sub>2</sub>

La estabilidad reconstituida de la formulación de IPM·Tris se evaluó en solución de cloruro sódico al 5% para inyección. Se encontró que la concentración de IPM mantenía una potencia > 90% hasta durante 2,0 horas.

65 La formulación de IPM·(LYS)<sub>2</sub> se evaluó en solución de cloruro sódico al 0,9% para inyección. Se encontró que la concentración de IPM mantenía una potencia > 90% hasta durante 1,0 hora.

Estabilidad de la Solución de IPM·Tris/Manitol

5 La Tabla 1 presenta datos de estabilidad de reconstitución para IPM·Tris/manitol en presencia de 25 ml de solución de cloruro sódico al 5% para inyección. Se tomaron alícuotas en los tiempos objetivo de ~1 h, 1,5 horas, 2,5 horas, 3,5 horas, 4,0 horas, y 5,0 horas. Las muestras se analizaron en cuanto a la potencia de IPM.

Tabla 1. Estabilidad de Reconstitución de IPM·Tris/Manitol en Presencia de Solución de Cloruro Sódico al 5%

Tiempo de Reconstitución (horas)	% de Potencia basada en el Contenido del Vial de IPM Original
0	100
1	94
2	90
3	86
4	81
6	74

10

Estabilidad de la Solución de IPM·(LYS)<sub>2</sub>

15 La Tabla 2 presenta datos de estabilidad de reconstitución para IPM·(LYS)<sub>2</sub> en presencia de 25 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% para inyección. Se tomaron alícuotas en los tiempos objetivo de ~1 h, 2 horas, 2,5 horas, 3,5 horas, 4,0 horas, y 5,0 horas. Las muestras se analizaron en cuanto a la potencia de IPM·(LYS)<sub>2</sub>.

Tabla 2. Estabilidad de Reconstitución de IPM·(LYS)<sub>2</sub> en Presencia de Solución de Cloruro Sódico al 0,9%

Tiempo de Reconstitución (horas)	% de Potencia basada en el Contenido del Vial de IPM(LYS) <sub>2</sub> Original
0	100
1	90
2	79
2.5	71
3.5	64
4	57
5	51

20

Conclusión

25 La formulación de IPM/trometamina/manitol mantiene una potencia de un 90% durante 2,0 horas cuando se somete a cloruro sódico al 5% en solución. La formulación de IPM·(LYS)<sub>2</sub> mantiene una potencia de un 90% durante 1,0 hora en presencia de cloruro sódico al 0,9%. La diferencia en la estabilidad de reconstitución (potencia > 90%) entre las dos formulaciones es de 1,0 horas, un factor de dos. El aumento del tiempo de estabilidad puede ayudar a los trabajadores médicos durante la preparación y administración del producto farmacológico.

*Ejemplo 14*

30

Estabilidad de la Solución de IPM

La estabilidad reconstituida de la formulación de IPM se evaluó en tampón a pH 7 a aproximadamente 25°C durante 3,5 horas tal como se muestra a continuación en la Tabla 3 y en la Figura 32.

Tiempo de Reconstitución (horas)	% de Pureza
----------------------------------	-------------

Tiempo de Reconstitución (horas)	% de Pureza
0	100,00%
0,5	89,5%
1,0	80,3%
1,5	72,2%
2,0	64,8%
2,5	57,4%
3,0	52,1%
3,5	47,0%

Estabilidad de la Solución de IPM·Tris/Manitol

5 La Tabla 4 presenta datos de estabilidad de la reconstitución para IPM·Tris/Manitol en presencia de 25 ml de solución de cloruro sódico al 5% para inyección. Se tomaron alícuotas en los tiempos objetivo de 1,5 horas, 3,0 horas, y 4,5 horas.

Tiempo de Reconstitución (horas)	Pureza (%)
0	99,80
1,5	99,72
3,0	99,49
4,5	99,50

10 Estabilidad de la Solución de IPM·(LYS)<sub>2</sub>

La Tabla 5 presenta datos de estabilidad de la reconstitución para IPM·(LYS)<sub>2</sub> en presencia de 25 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% para inyección. Se tomaron alícuotas en los tiempos objetivo de 1,5 horas, 3,0 horas, y 4,5 h.

Tiempo de Reconstitución (horas)	Pureza (%)
0	97,48
1,5	96,97
3,0	92,54
4,5 <sup>s</sup>	95,37

15 *Ejemplo 15*

Estabilidad de IPMTris Sólida

		Un mes	Dos meses	Tres meses
Pureza (% de área)	-20°C	100,0%	100,0%	100,0%
	5°C	99,9%	100,0	100,0%
	25°C	100,0%	99,8%	99,9%
Potencia (% de contenido de IPM en p/p)	-20°C	100,5%	100,4%	102,4%
	5°C	101,3%	99,6%	102,3%

ES 2 565 069 T3

		Un mes	Dos meses	Tres meses
	25°C	97,8%	90,9%	80,8%

Estabilidad del liofilizado de IPMTris/Manitol Sólido

		Tiempo cero	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses
Pureza (% de área)	-70°C	98,5%	98,7%	98,7%	99,7%	99,8%
	-20°C	98,5%	98,6%	99,1%	99,3%	99,8%
	5°C	98,5%	99,1%	98,9%	99,2%	99,8%

5

Estabilidad del liofilizado de IPM(LYS)<sub>2</sub> Sólido

		Tiempo cero	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Pureza (% de área)	-70°C	99,8%	98,8%	98,8%	99,5%	99,8%	99,6%	100,0%	100,0%
	-20°C	99,8%	98,4%	98,5%	96,0%	96,9%	97,1%		
	5°C	99,8%	93,1%	54,8%	49,2%				

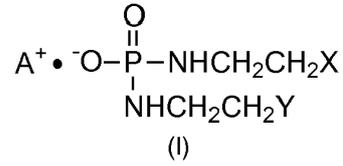
Ejemplo 16

10

Condición	Ácido Libre de IPM (API)	Sal de IPM-Tris (API)	IPM-lisina Inyectable	IPM-Tris-Manitol Inyectable
Sumario de Datos de Estabilidad Actual	Sin cambio en la pureza a -70°C, 2 años	Sin cambio en la pureza a 5°C, 3 meses	Sin cambio en la pureza a -70°C, 2 años	Sin cambio en la pureza a 5°C, 1 año
Temperatura de Almacenamiento a Largo Plazo	-70°C	5°C	-70°C	5°C
Solubilidad a 25°C (solución salina)	14 mg/ml	~1400 mg/ml	20 mg/ml	80 mg/ml
Tiempo de Solubilidad para Reconstitución	ND	ND	< 40 segundos	< 30 segundos
Estabilidad de Reconstitución a 25°C	ND	ND	45 minutos	2,5 horas
Estabilidad en 250 ml de solución salina al 0,9%	ND	ND	potencia > 90% durante 15 min	potencia > 90% durante 45 min
pH	3,02	ND	8,5	5,0

**REIVINDICACIONES**

1. Un liofilizado que comprende un análogo de IPM que tiene una estructura de fórmula (I)



5

y de 1% a 10% (p/v) de manitol,  
 en la que A<sup>+</sup> es un contraión de amonio alifático hidroxilado; y  
 X e Y representan independientemente grupos salientes seleccionados entre halógenos.

10

2. El liofilizado de la reivindicación 1, en el que A<sup>+</sup> representa una amina protonada seleccionada de mono-, bis- o tris-(2-hidroxi)etil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etil)amina, y tris(hidroxi)metil)aminometano (Tris), opcionalmente Tris, en la que el liofilizado opcionalmente es estable a temperatura ambiente durante al menos un mes, opcionalmente durante al menos dos meses.

15

3. El liofilizado de la reivindicación 1 ó 2, en el que el liofilizado comprende de 1% a 5% (p/v) de manitol.

4. El liofilizado de la reivindicación 1 ó 2, en el que X e Y son iguales.

20

5. El liofilizado de la reivindicación 4, en el que X e Y son ambos Cl.

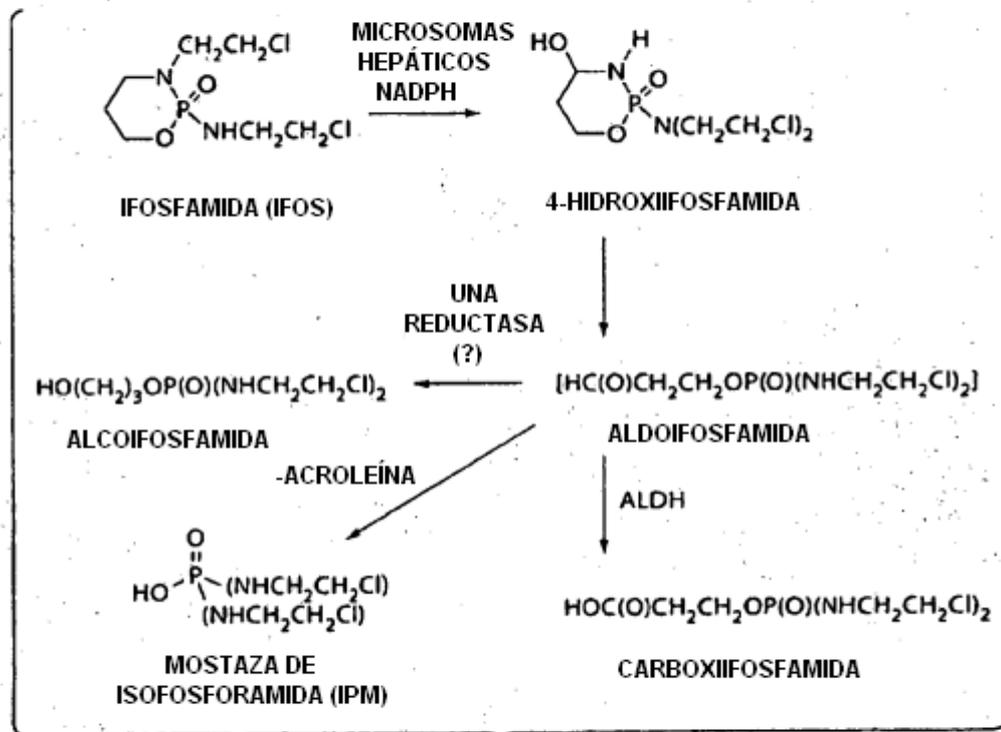


Fig. 1

[07012902.SINPROCESAR] 1736-525, SCAN: 3,0/45,0/0,02/0,6 (seg), Cu, I(máx)=3343, 01/29/07 03:47p

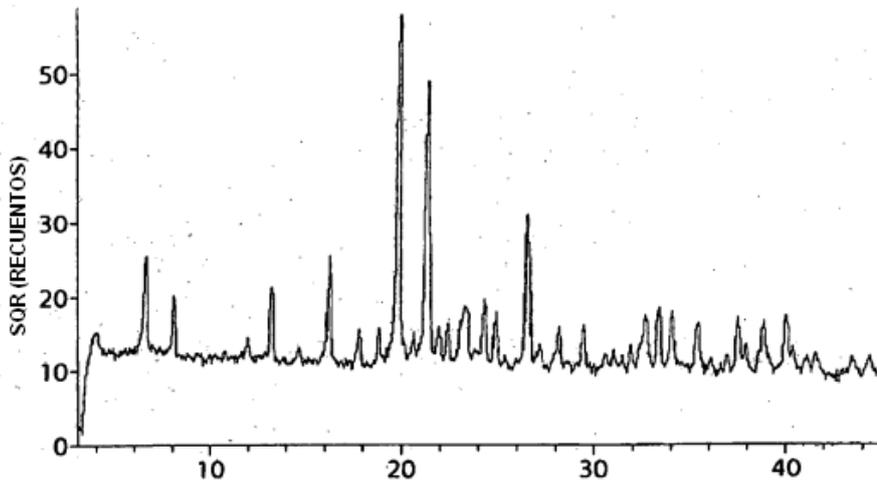


Fig. 2

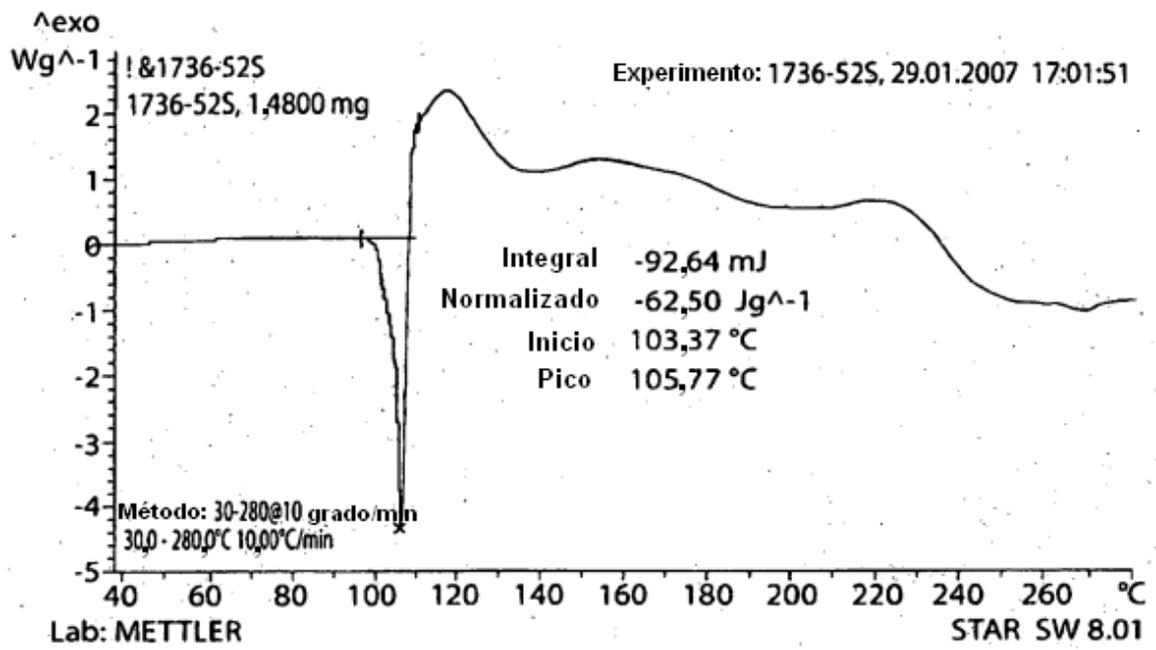


Fig. 3

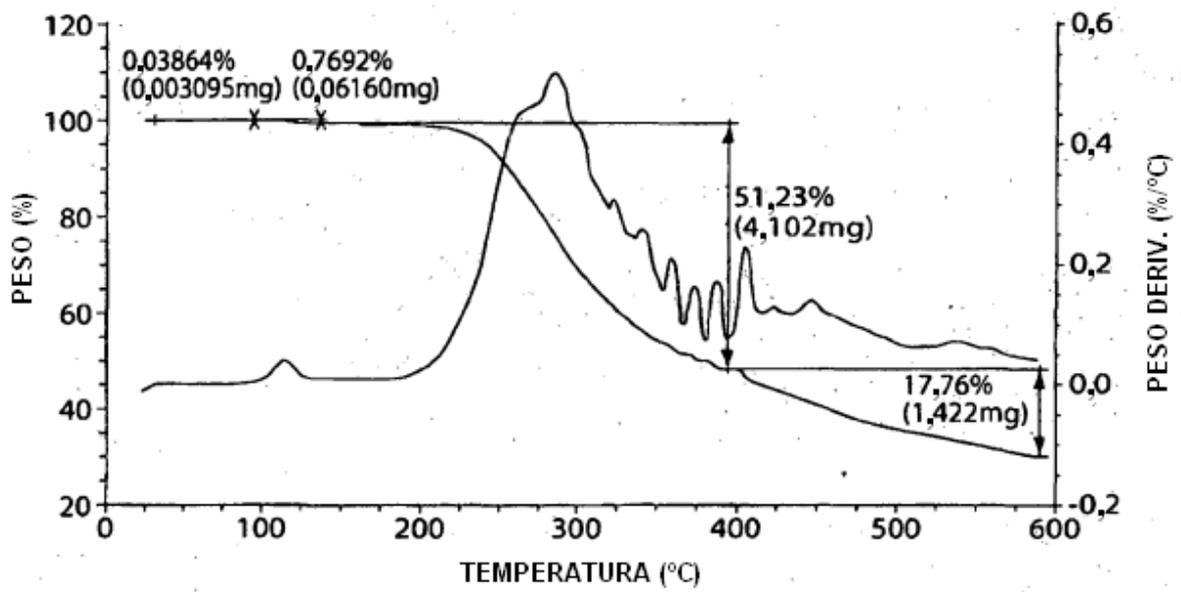


Fig. 4

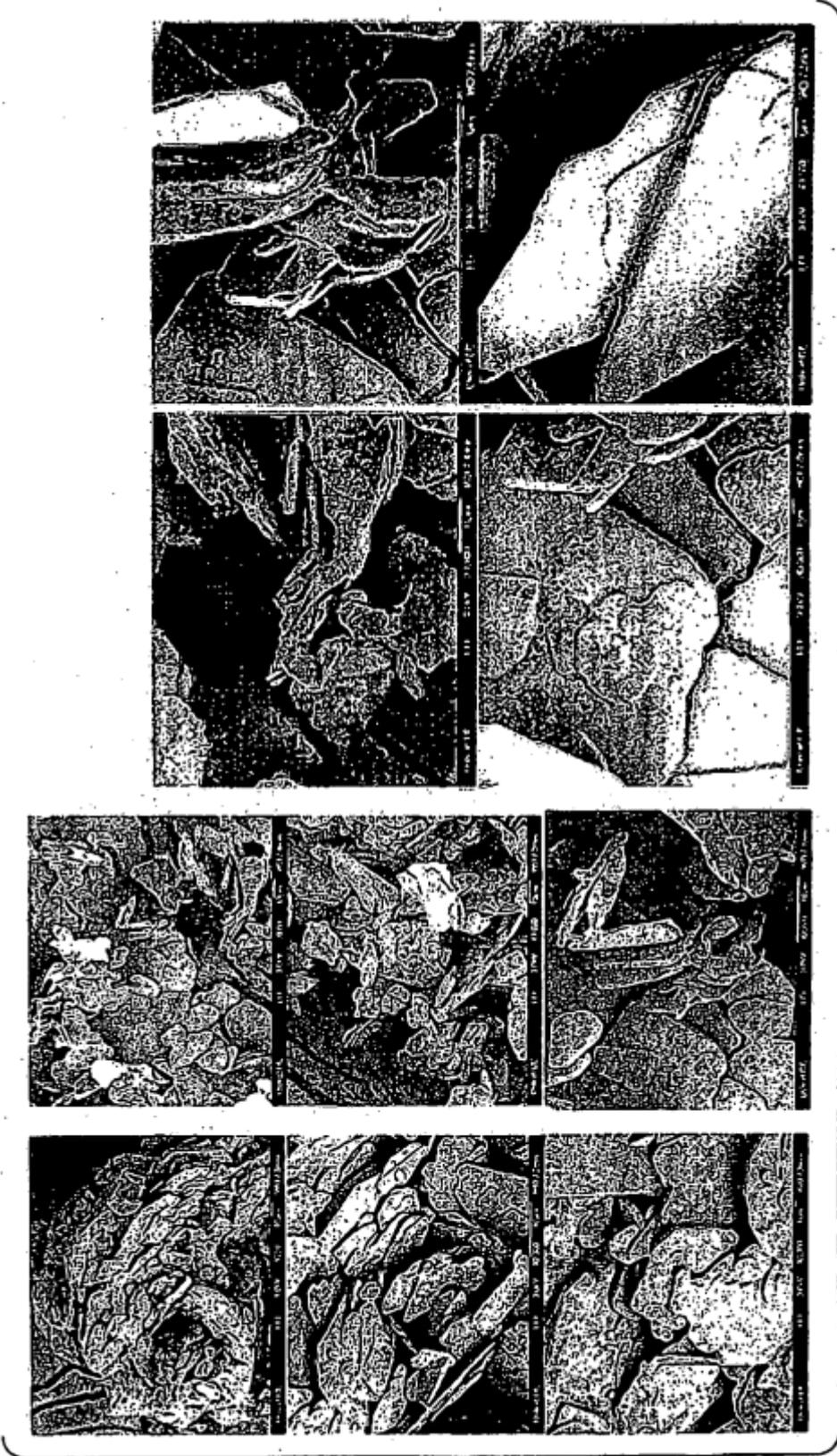


Fig. 5

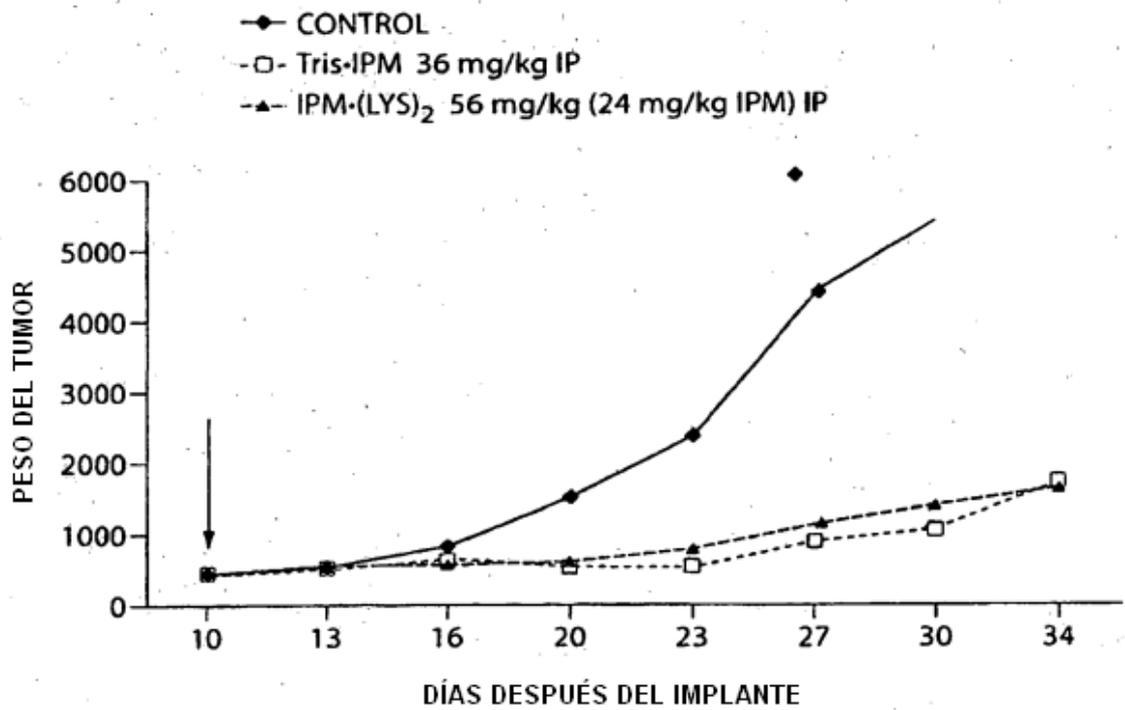


Fig. 6

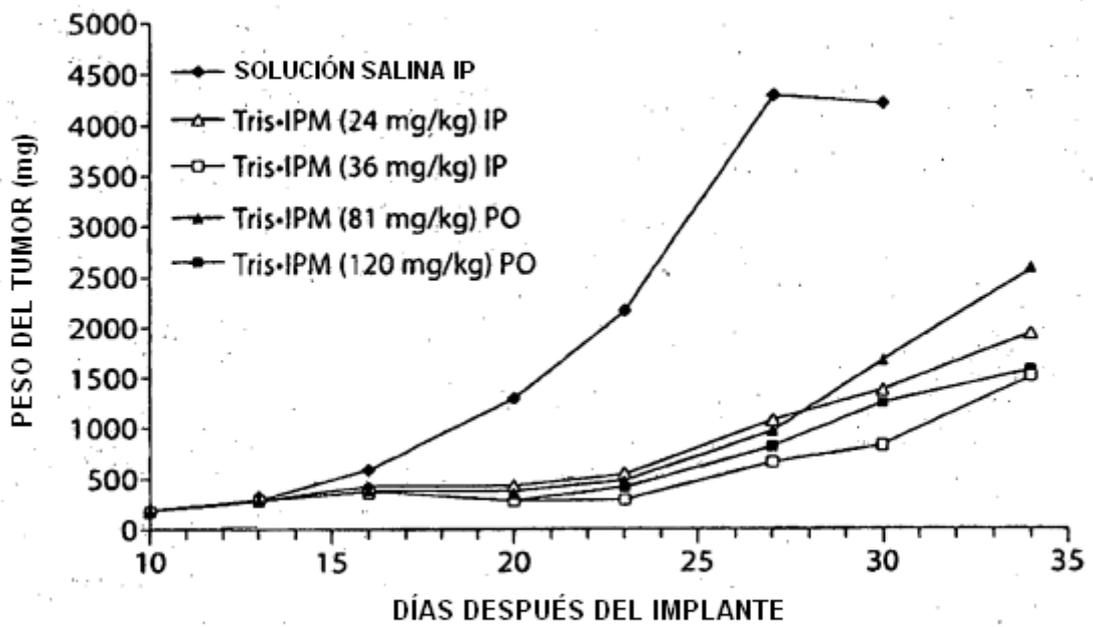


Fig. 7

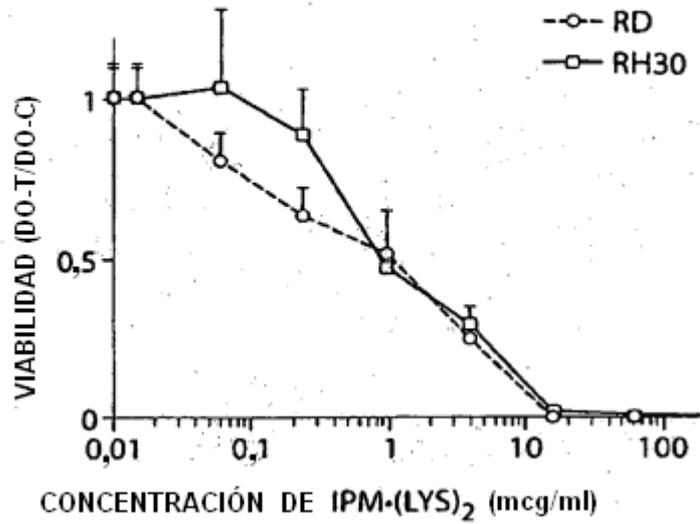


Fig. 8A

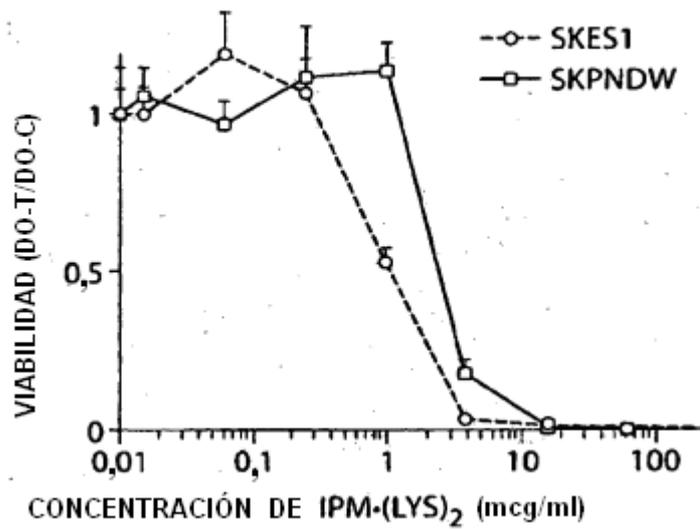


Fig. 8B

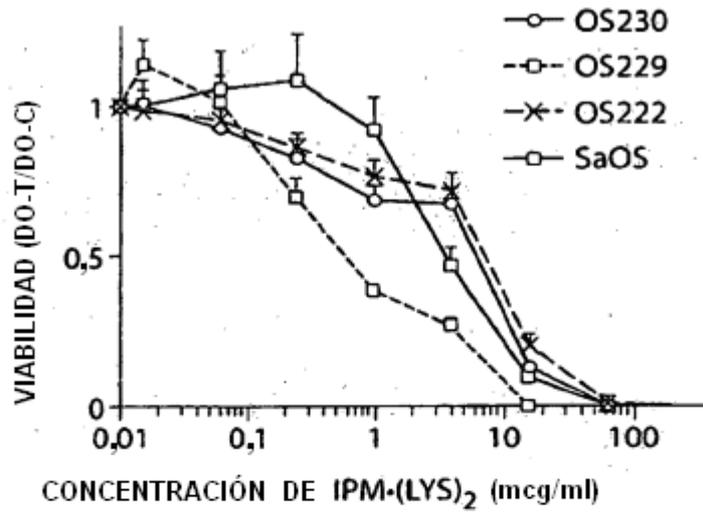


Fig. 8C

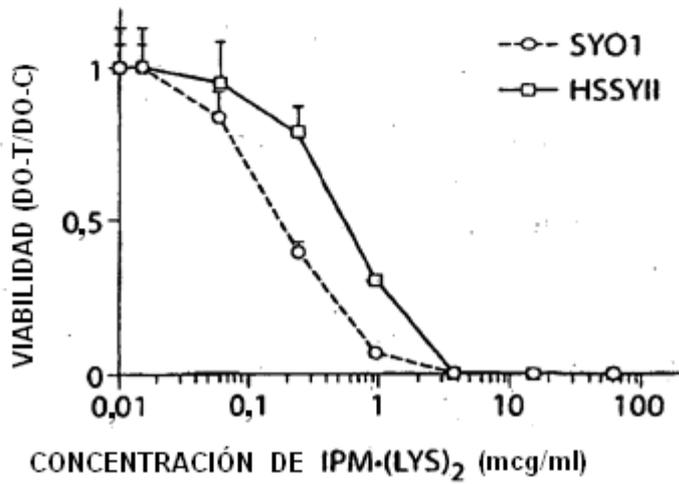


Fig. 8D

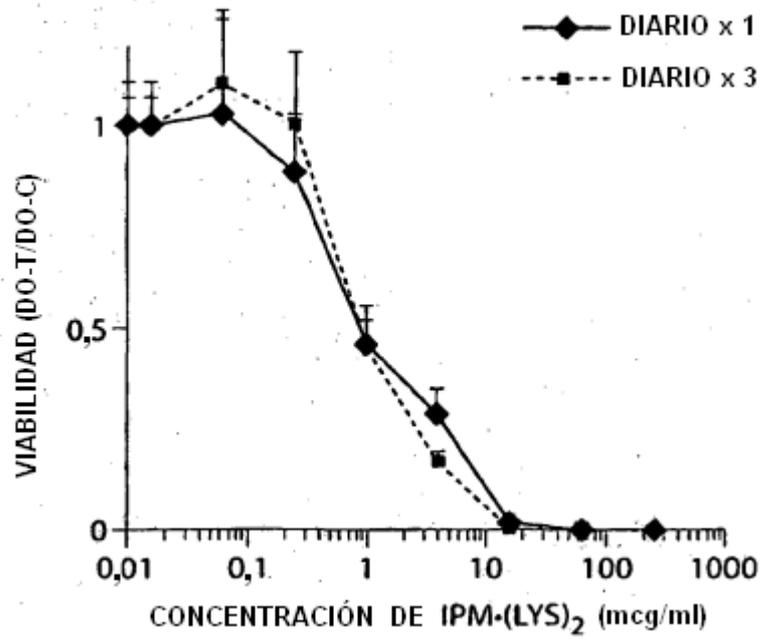


Fig. 9A

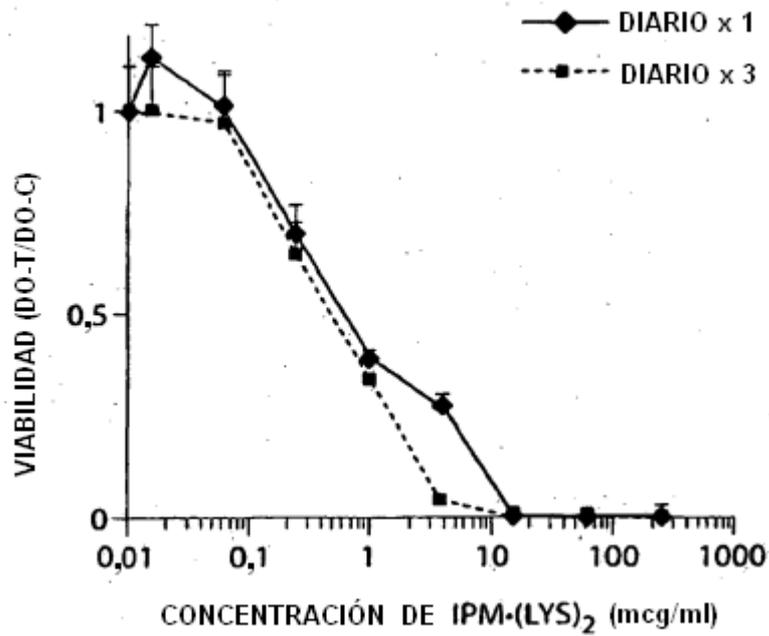


Fig. 9B

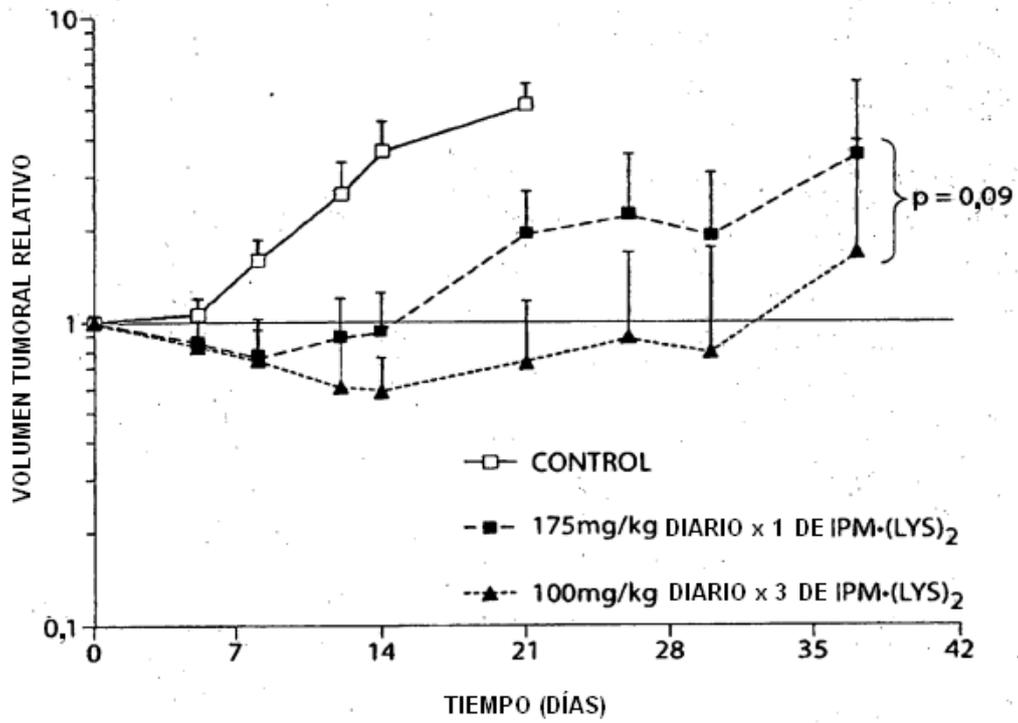


Fig. 10

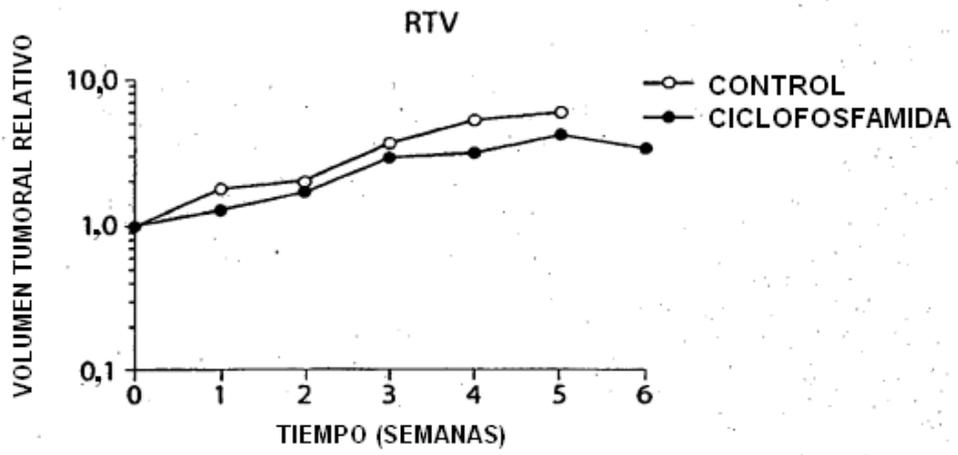


Fig. 11A

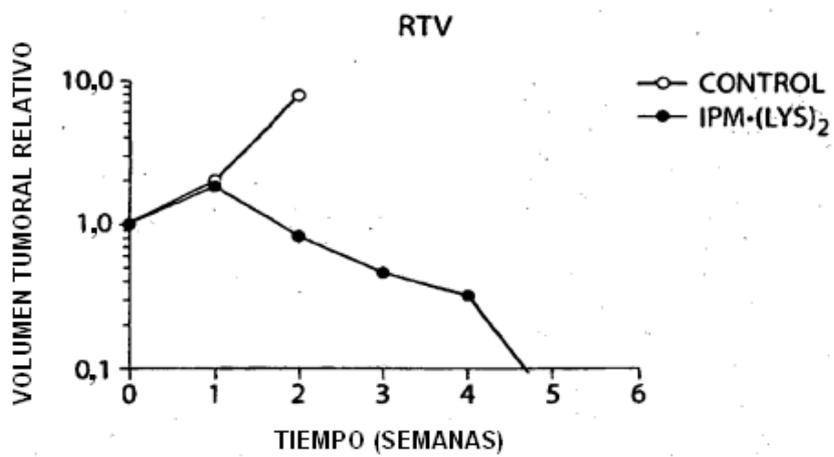


Fig. 11B

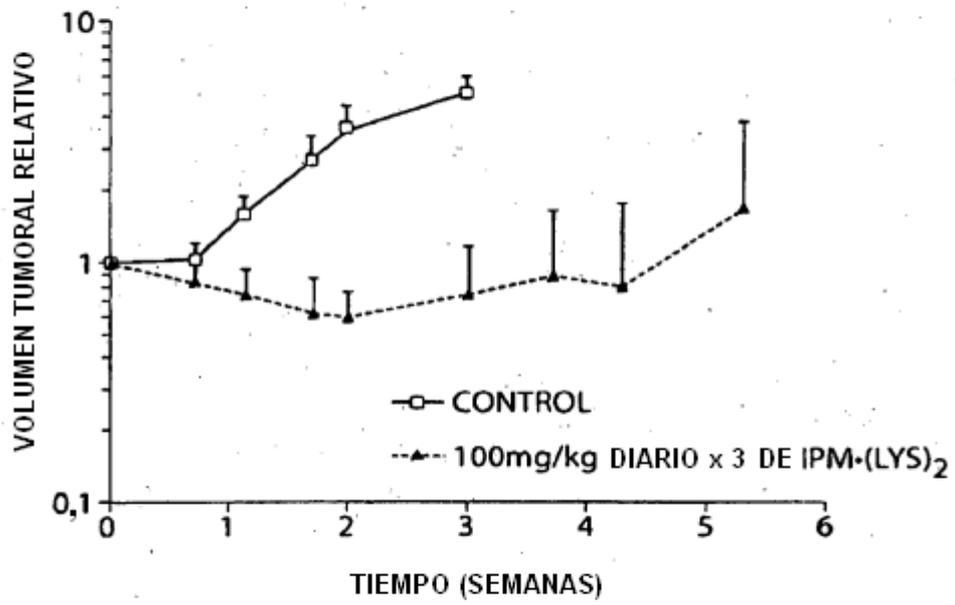


Fig. 12

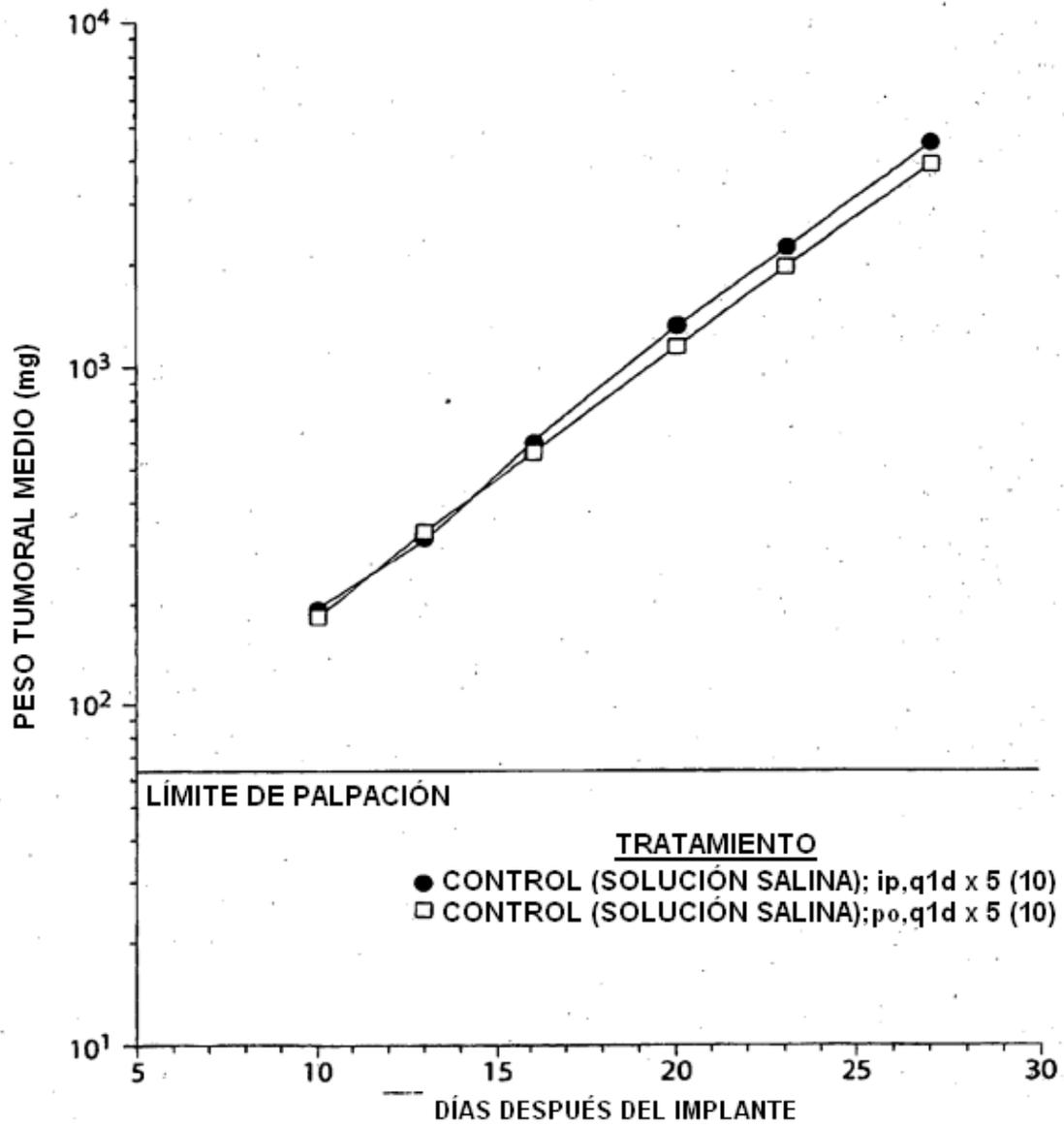


Fig. 13

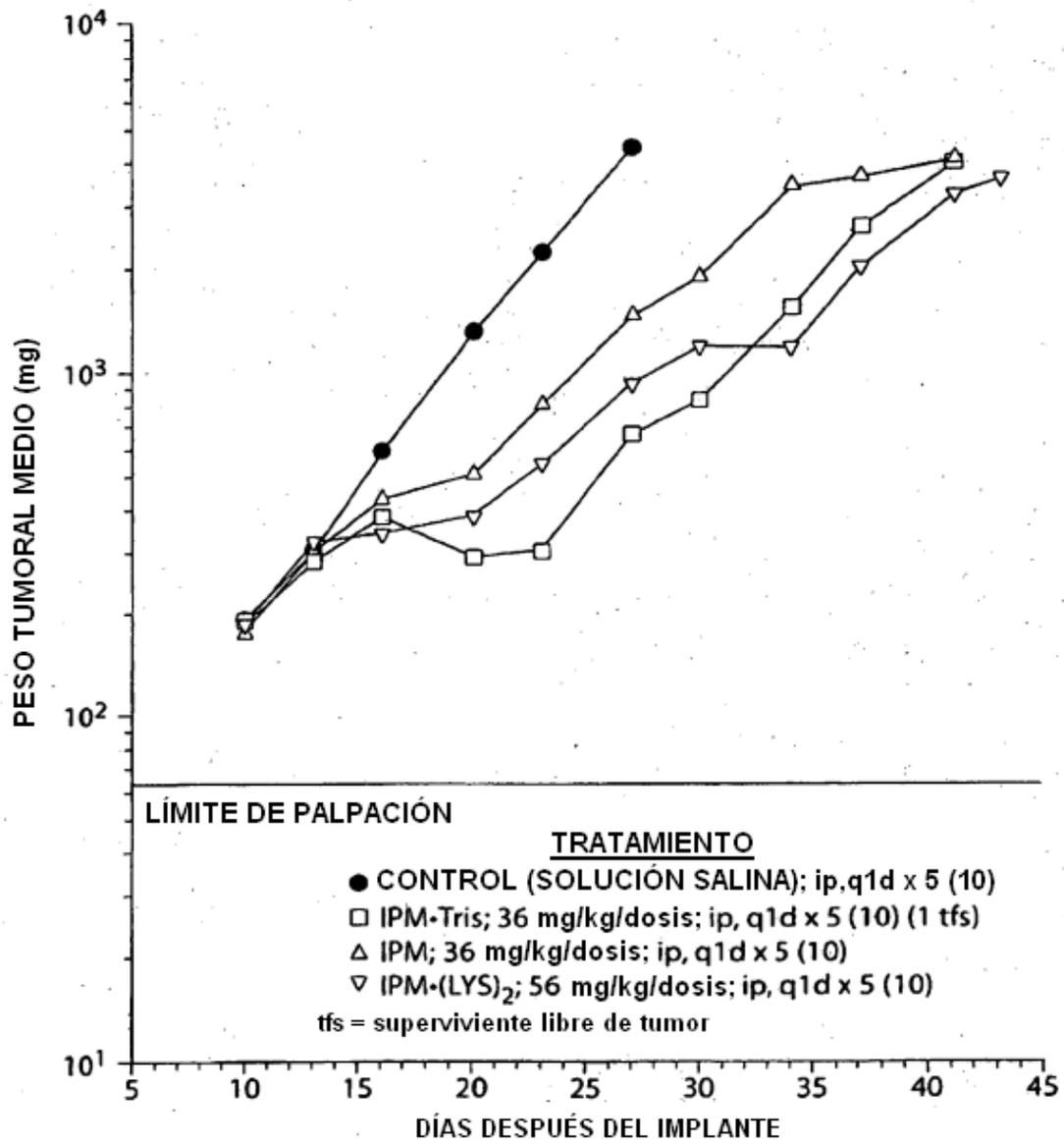


Fig. 14

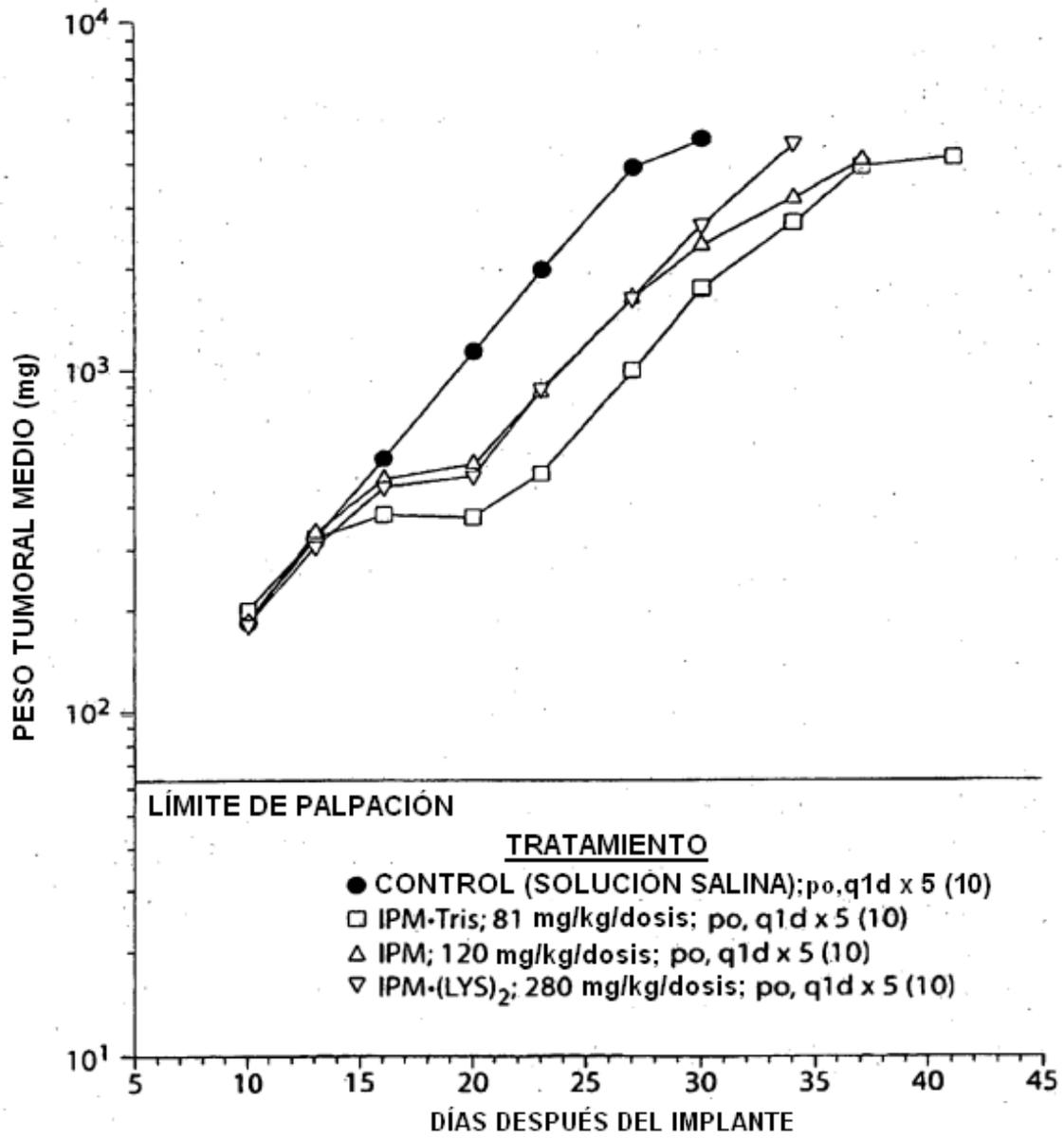


Fig. 15

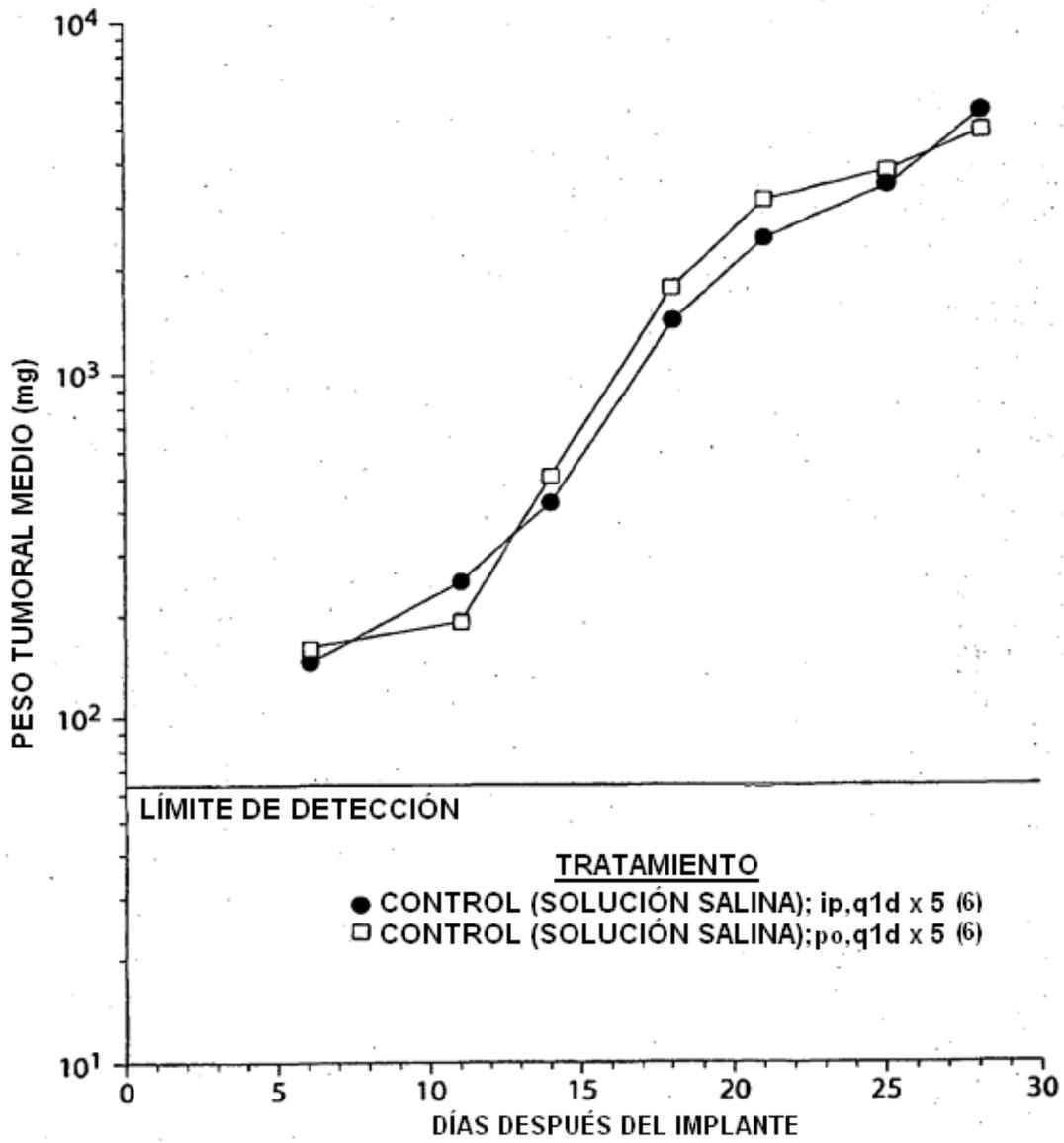


Fig. 16

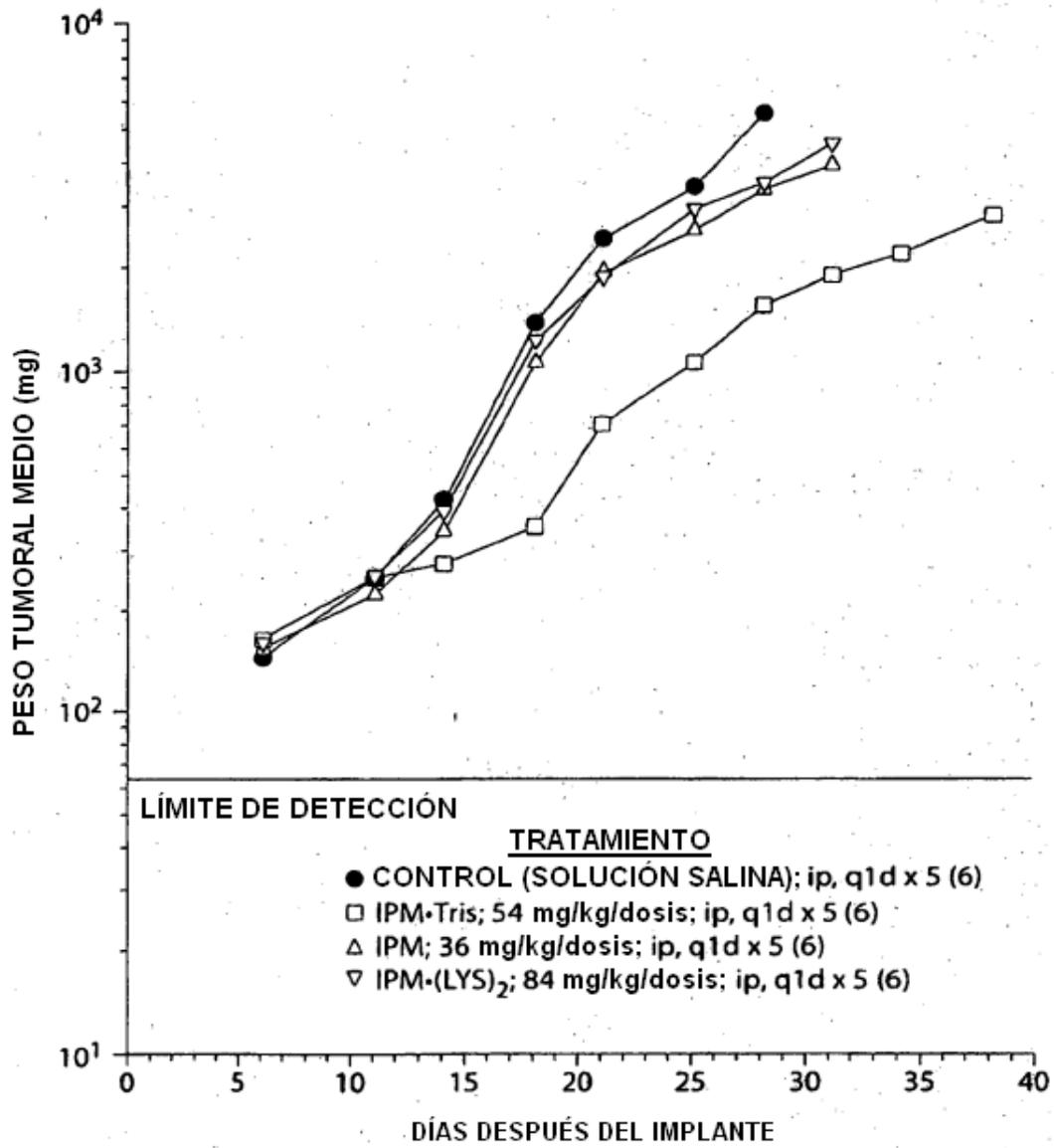


Fig. 17

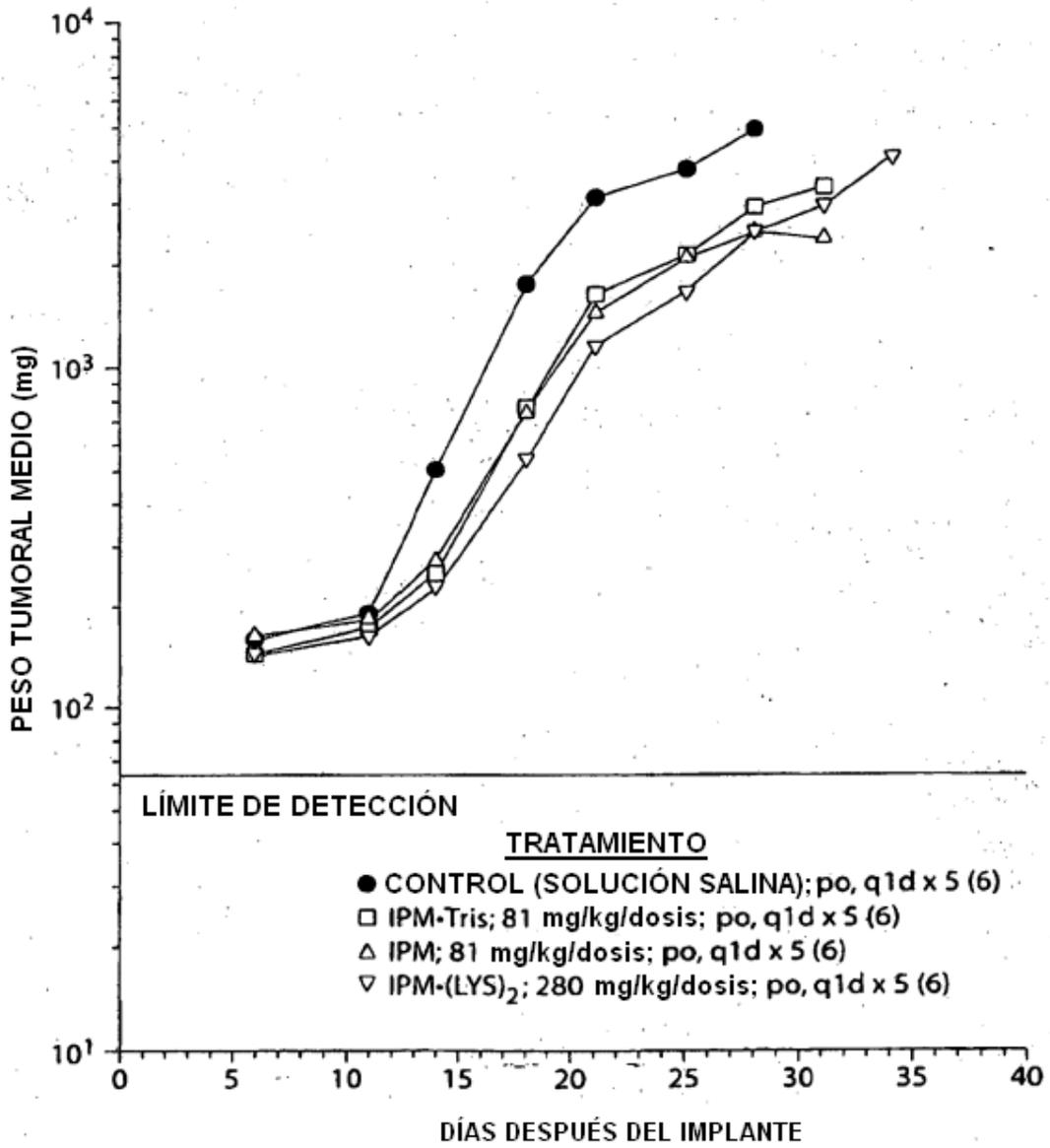


Fig. 18

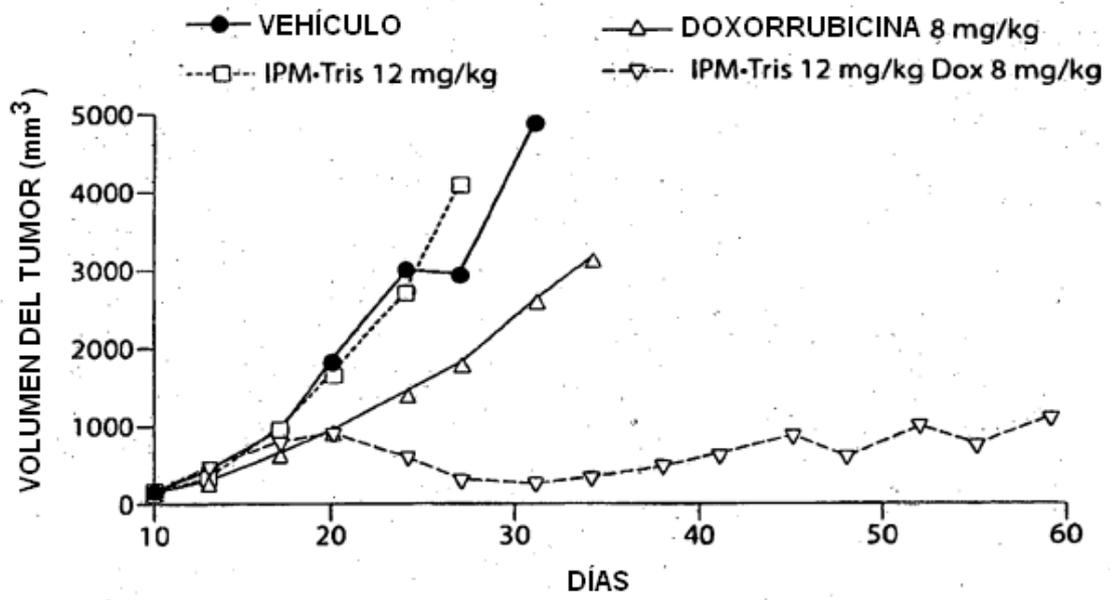


Fig. 19

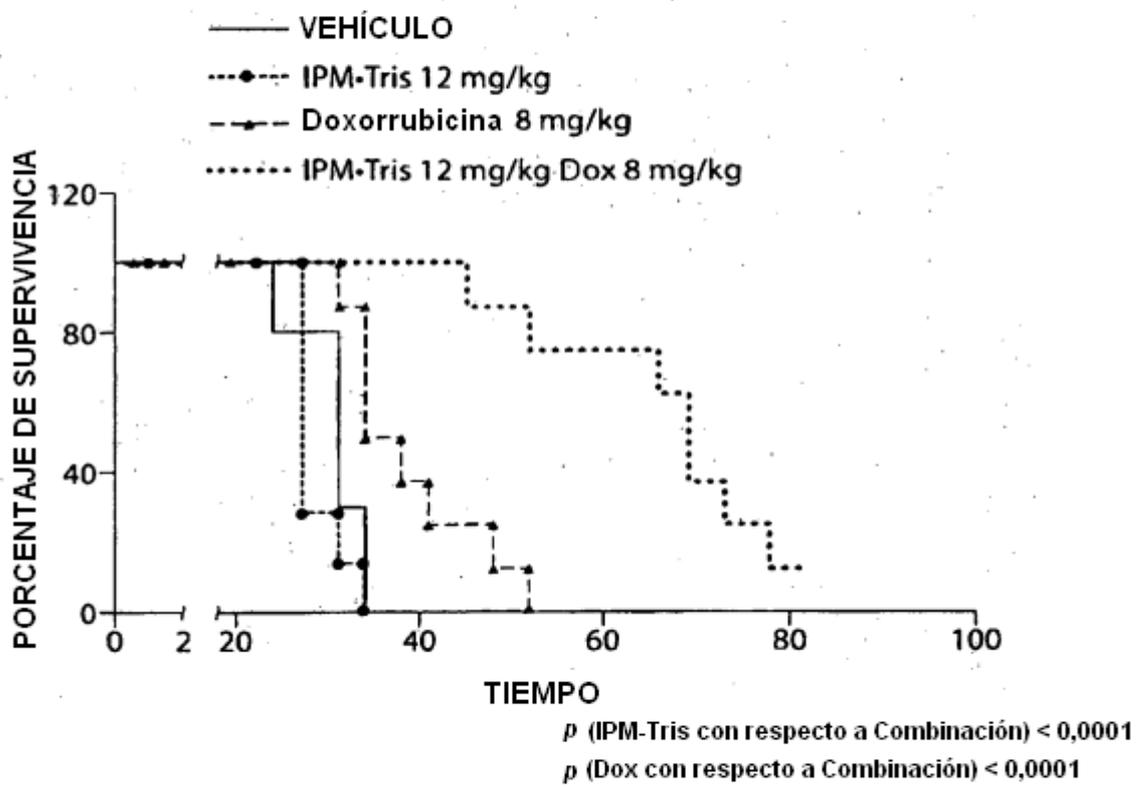


Fig. 20

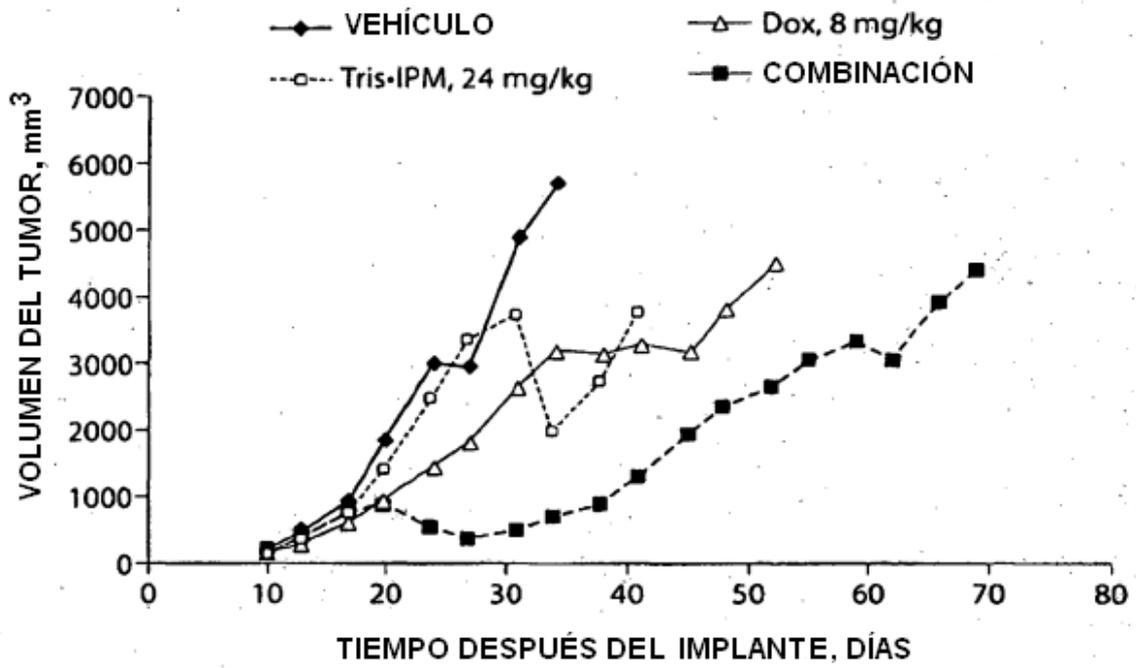


Fig. 21

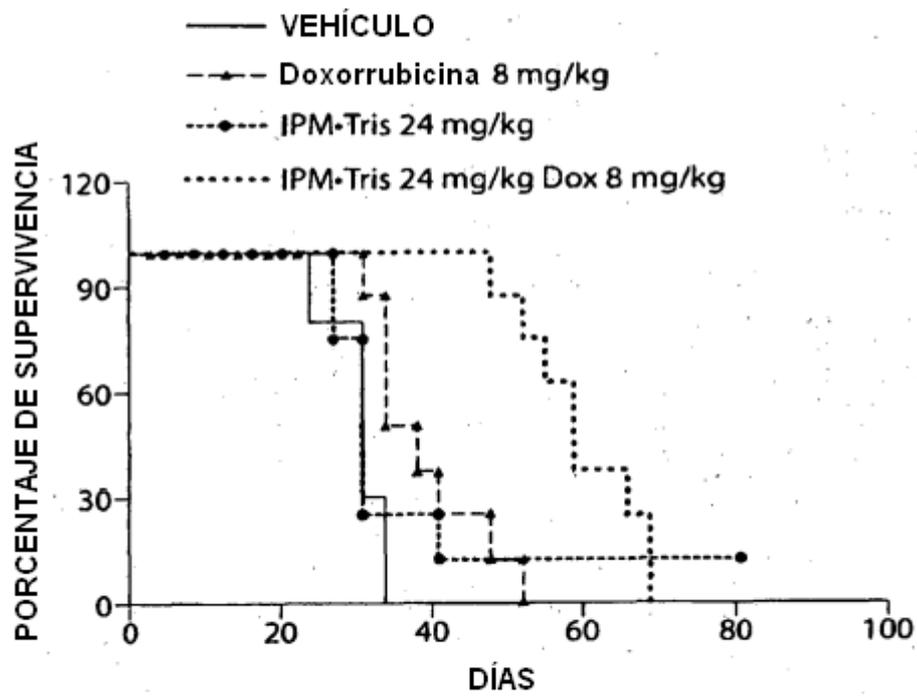


Fig. 22

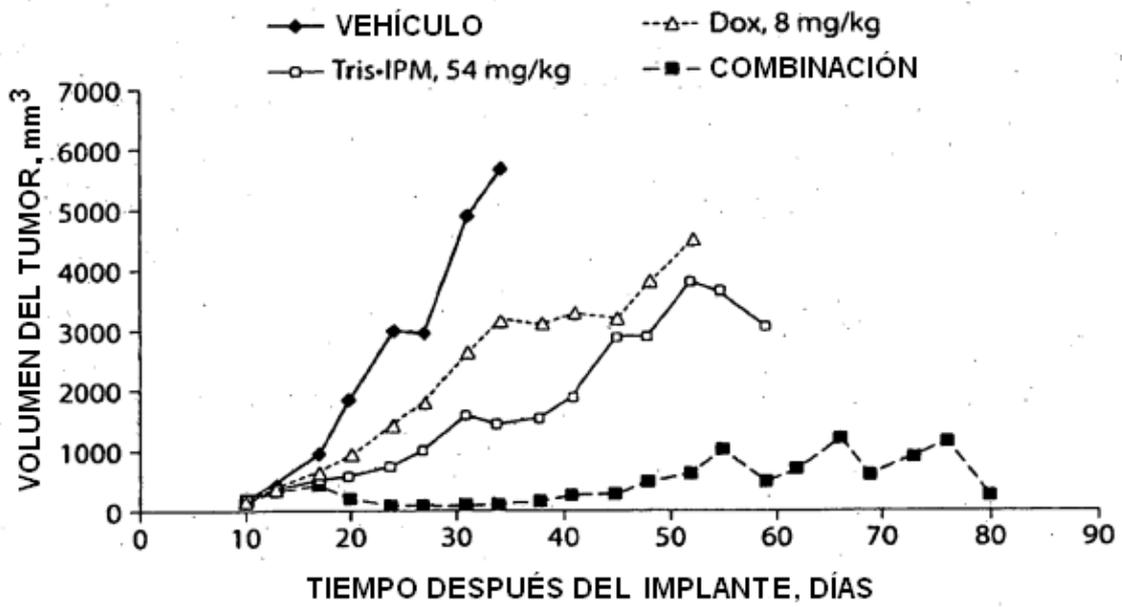


Fig. 23

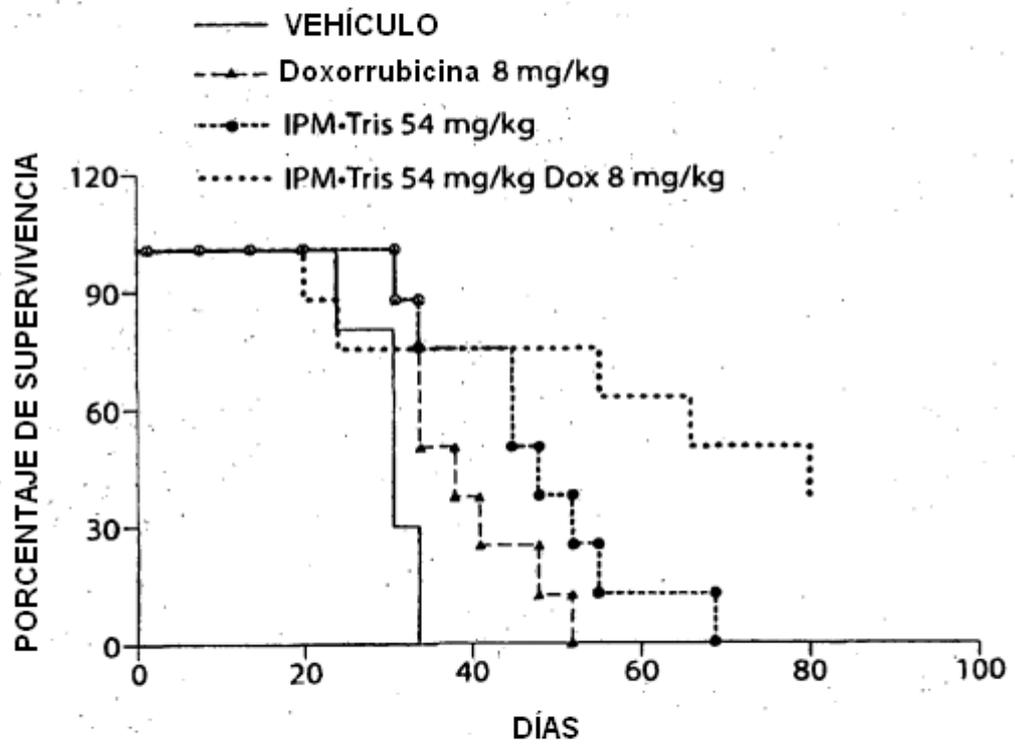


Fig. 24

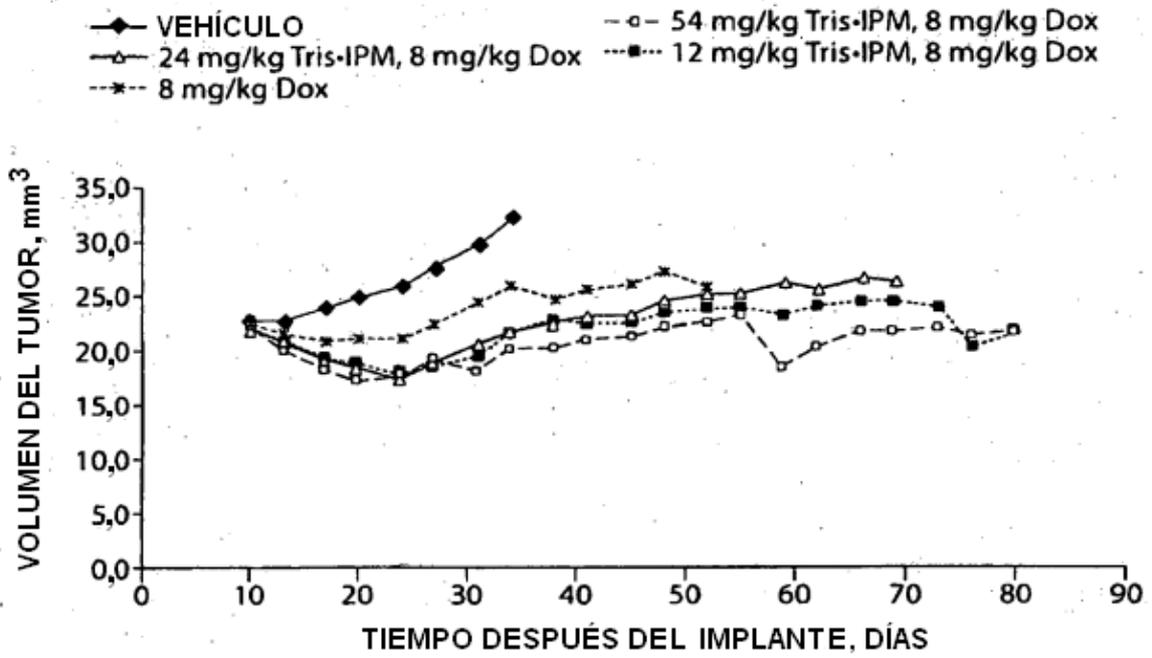


Fig. 25

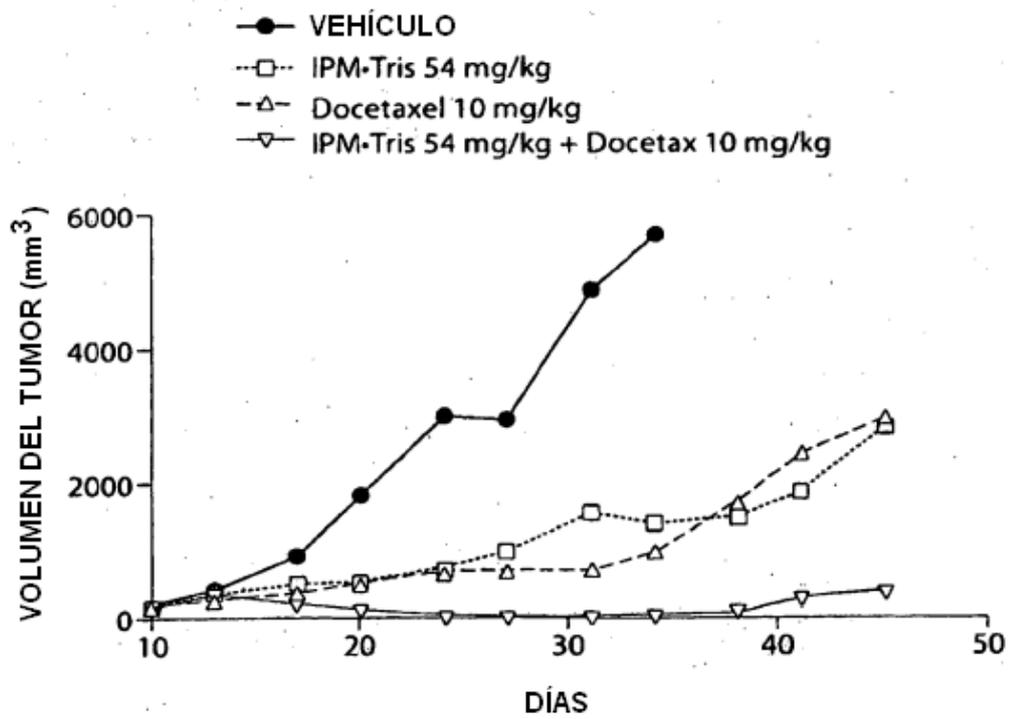


Fig. 26

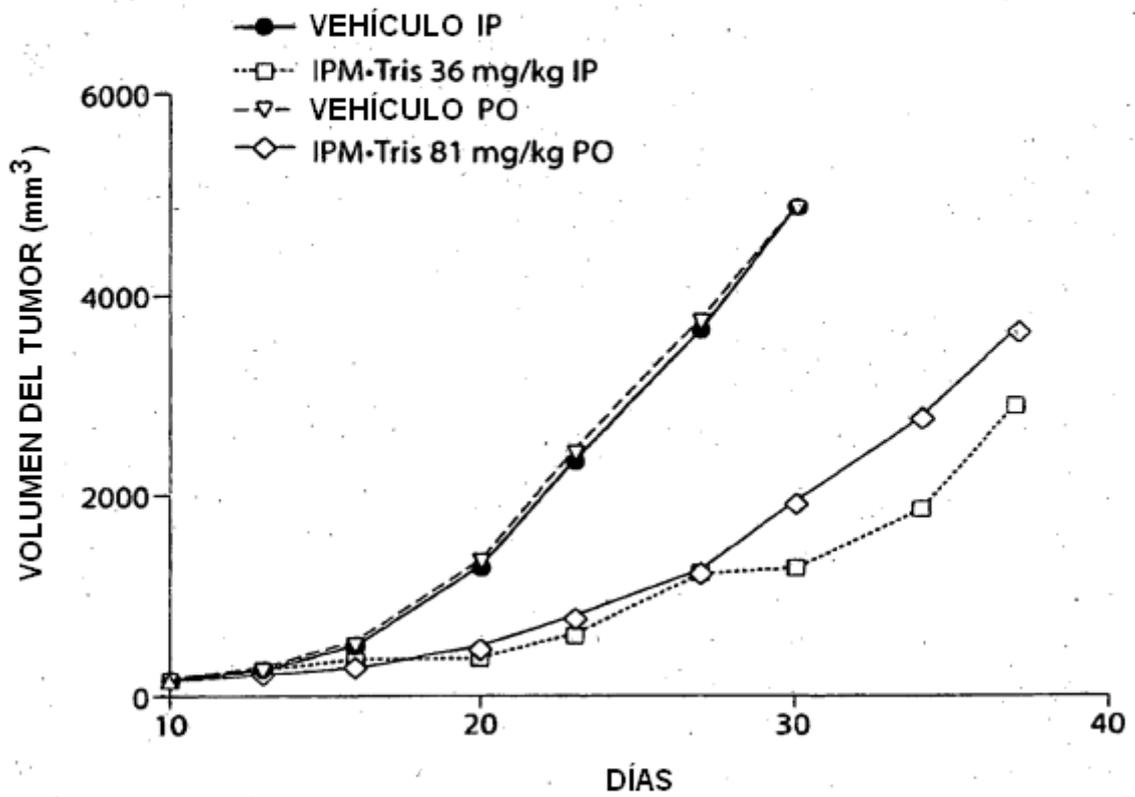


Fig. 27

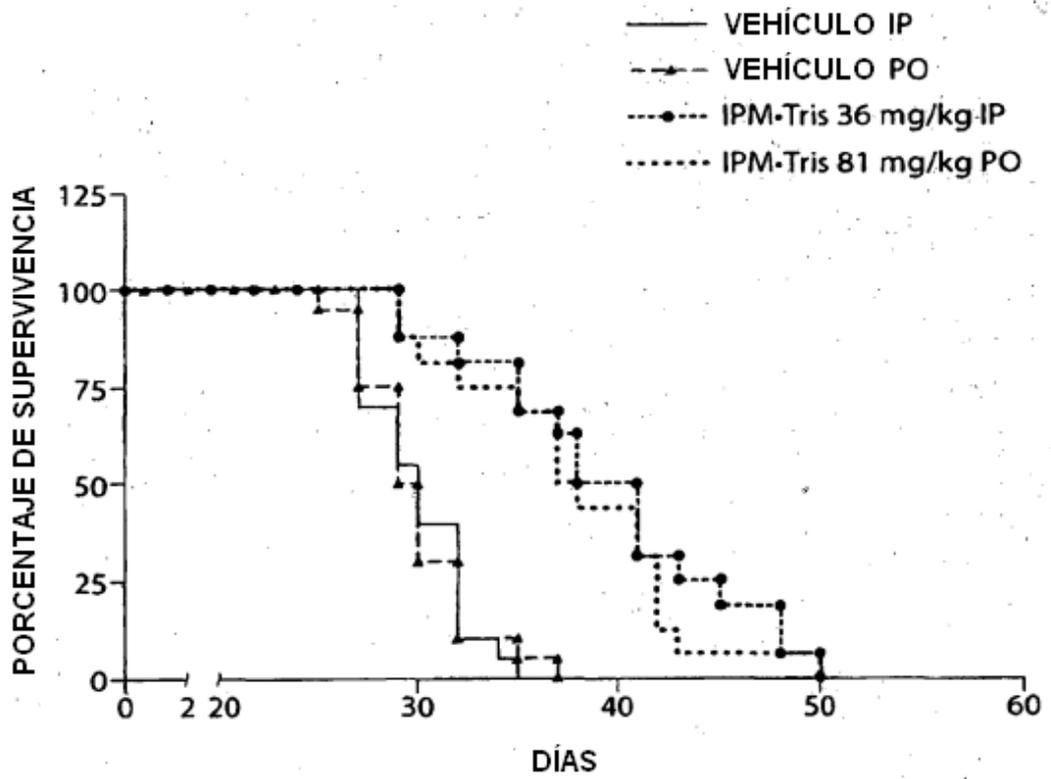


Fig. 28

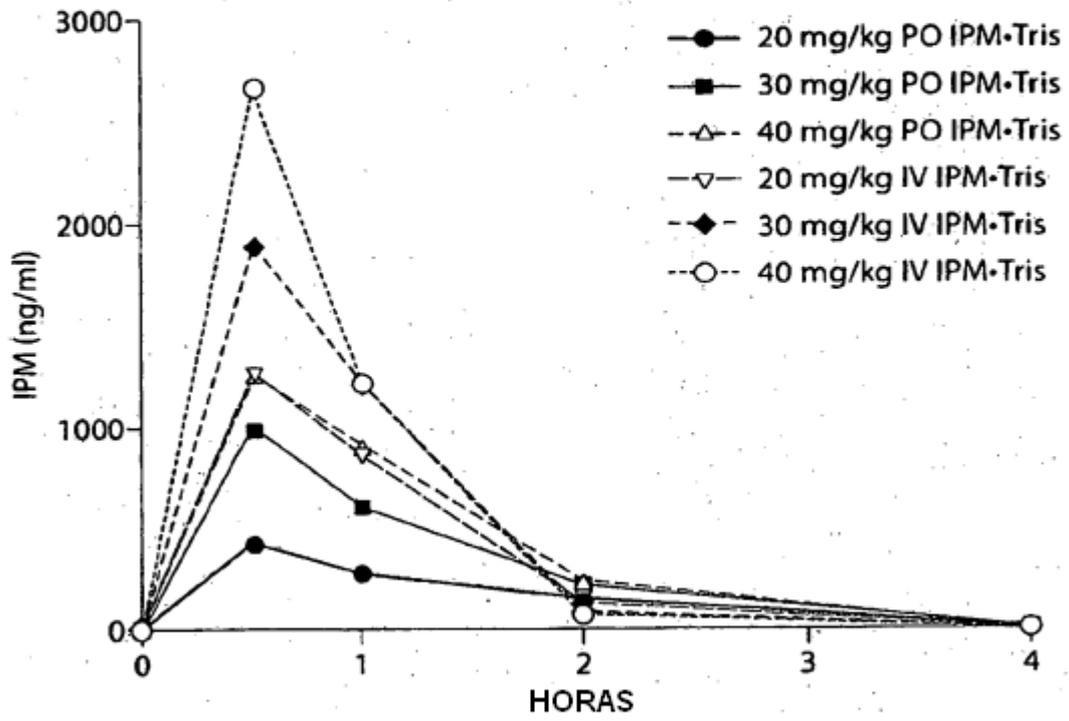


Fig. 29

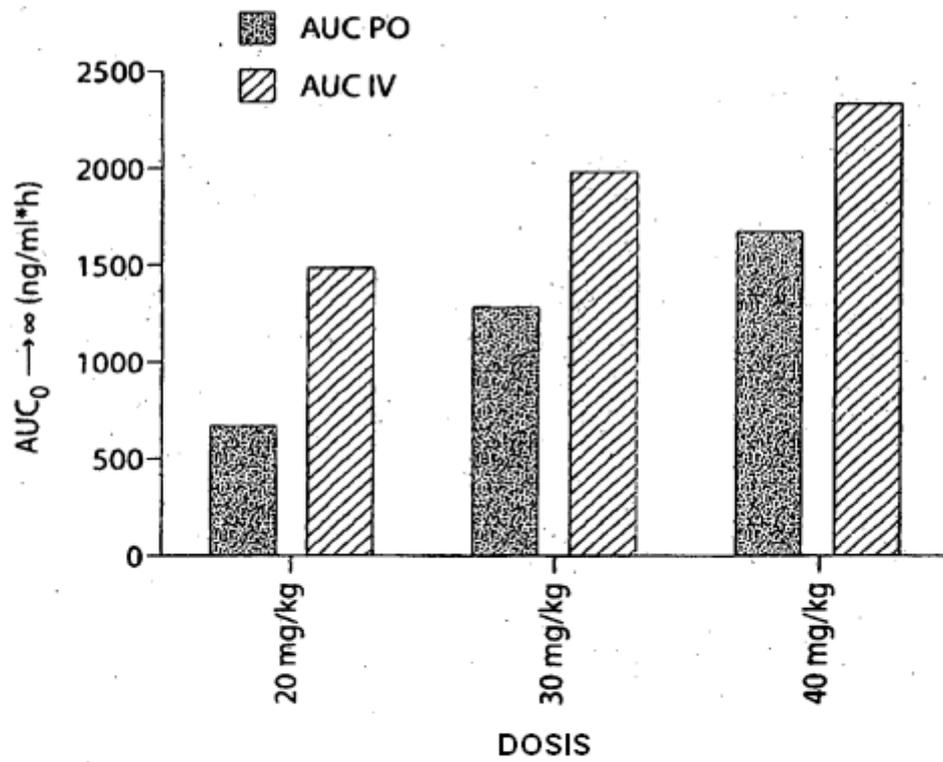


Fig. 30

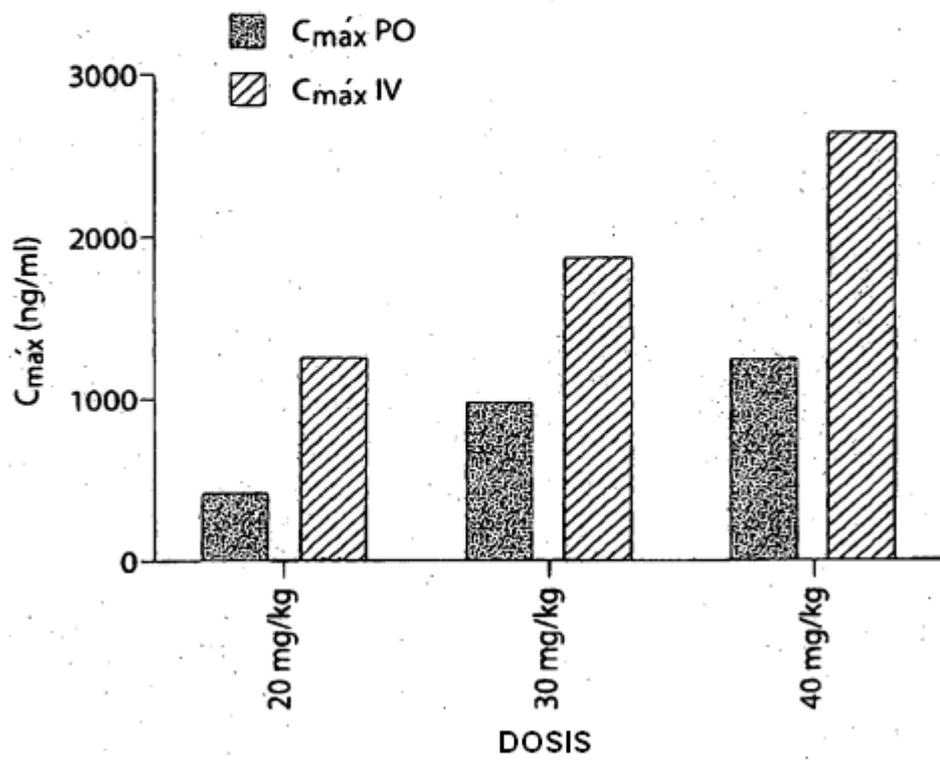


Fig. 31

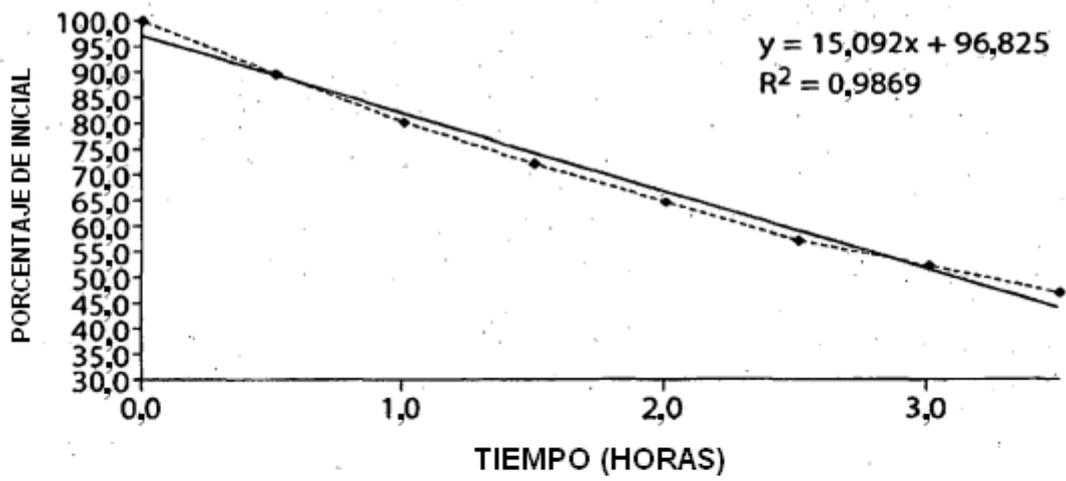


Fig. 32