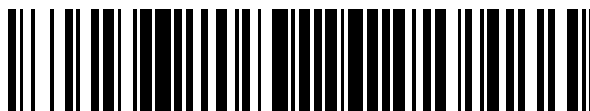


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 235**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6506 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07F 9/6539 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006 E 11157963 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2336141**

54 Título: **Profármacos Alquilantes de Fosforamidato**

30 Prioridad:

29.06.2005 US 695755 P

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

08.08.2016

73 Titular/es:

**THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
170 Harbor Way, Suite 300
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MATTEUCCI, MARK;
DUAN, JIAN-XIN;
JIAO, HAILONG y
KAIZERMAN, JACOB**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 235 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

Profármacos Alquilantes de Fosforamidato.

5 **Antecedentes de la Invención****Campo de la Invención**

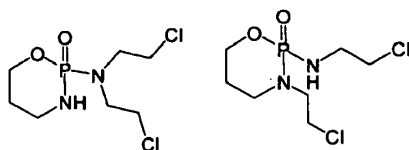
10 La presente invención proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato para su uso en métodos para el tratamiento del cáncer. La presente invención se refiere generalmente a los campos de la química, la biología, la biología molecular, la farmacología, y la medicina.

Descripción de la Técnica Relacionada

15 Los agentes alquilantes ("alquilantes" o "mostazas") utilizados en la quimioterapia contra el cáncer abarcan un grupo diverso de agentes químicos que tienen la capacidad de alquilar macromoléculas biológicamente vitales tales como ADN en condiciones fisiológicas (véase Hardman et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 2001, 1389-1399, McGraw-Hill, New York, USA). Se postula que la alquilación de ADN es un mecanismo importante en la actividad antitumoral de los alquilantes. Los alquilantes quimioterapéuticos actúan como electrófilos fuertes, por ejemplo, a través de la formación de intermedios de *onio* estabilizados por heteroátomos contiguos tales como una aziridina o un catión aziridinio.

25 Los alquilantes basados en fosforamidato utilizados en la terapia contra el cáncer, tales como la Ciclofosfamida y la Ifosfamida, son una subclase importante de alquilantes quimioterapéuticos. La Ciclofosfamida y la Ifosfamida son activados cada uno en el hígado y el alquilante activo liberado alquila radicales nucleofílicos tales como ADN en el interior de células tumorales para actuar como un agente quimioterapéutico. Si los alquilantes activos se liberan fuera del tumor, el ADN y otros radicales nucleofílicos tales como los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol de biomoléculas de células no cancerosas sanas, se pueden alquilar. Tal alquilación de células sanas puede dar como resultado eventos tóxicos no deseados en los pacientes (véase Hardman *et al.*, *supra*).

30

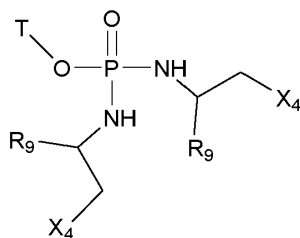


Ciclofosfamida e Ifosfamida

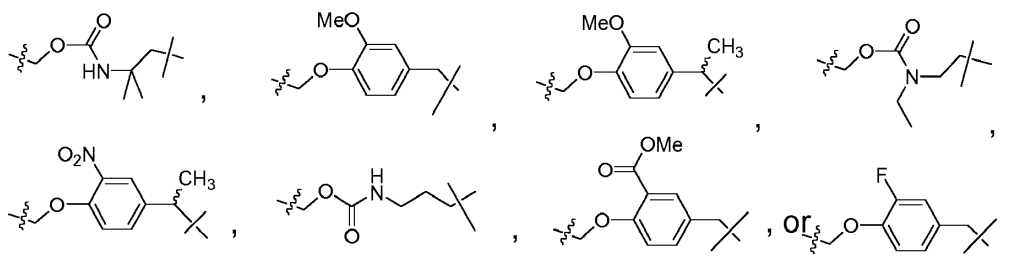
35 Persiste la necesidad de nuevos alquilantes basados en fosforamidato que se puedan utilizar para tratar el cáncer u otras condiciones de enfermedad hiperproliferativas, preferiblemente compuestos menos tóxicos para las células normales. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato novedosos útiles en terapia, como se resume en la siguiente sección.

40 **Breve Compendio de la Invención**

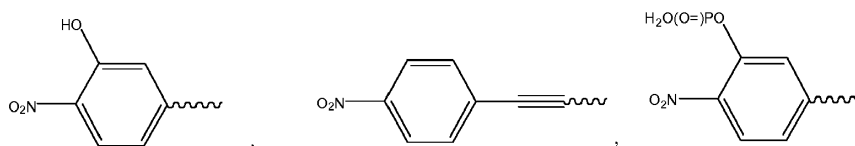
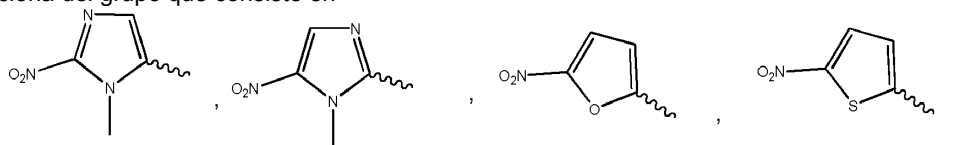
En un aspecto la presente invención proporciona un compuesto de fórmula:



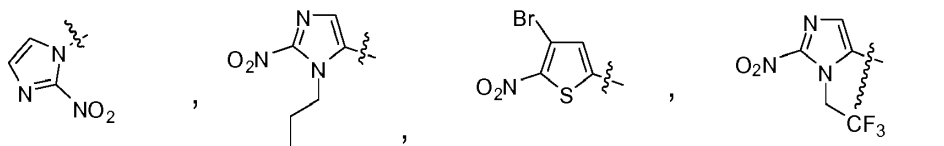
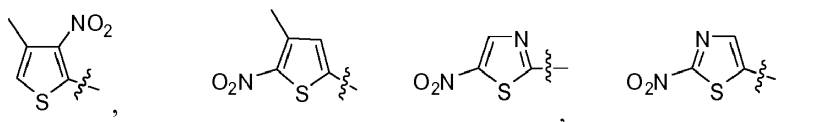
45 en donde
 cada R_9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo y ciclopropilo;
 cada X_4 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en bromo, cloro, alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi y heteroarilsulfoniloxi;
 T es $L-Z_3$;
 L es CH_2 , $CHMe$, CMe_2 ,
 50



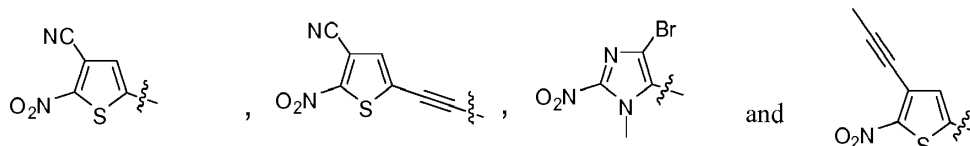
y Z₃ se selecciona del grupo que consiste en



5



10



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

En una descripción relacionada, se proporcionan profármacos alquilantes de fosforamidato que tienen CI₅₀ o GI₅₀, en las células en condiciones de hipoxia, de 50 μM a 0,01 nM. En una descripción relacionada, se proporcionan profármacos alquilantes de fosforamidato que tiene citotoxicidad hipóxica que son hasta un millón de veces, hasta 10.000 veces, y hasta 1000 veces menos tóxicos en células normóxicas correspondientes. En una descripción relacionada, la citotoxicidad celular se mide mediante análisis antiproliferación y utilizando el valor de CI₅₀ relativo de un compuesto en células hipóxicas y normóxicas. En una descripción relacionada, la citotoxicidad celular se mide mediante análisis clonogénicos y utilizando los valores de C₁₀, C₅₀ o C₉₀ relativos de los compuestos en células hipóxicas y normóxicas.

20

25

En otra descripción relacionada, se proporcionan profármacos alquilantes de fosforamidato que tienen valores de IC₅₀, en las células en condiciones de hipoxia, de 50 μM a 0,01 nM. En otra descripción relacionada, se proporcionan profármacos alquilantes de fosforamidato que son hasta 5000 veces menos tóxicos en las células normóxicas correspondiente según se mide mediante los valores de CI₅₀ relativos en células hipóxicas y normóxicas. En otra descripción relacionada, se proporcionan profármacos alquilantes de fosforamidato que tienen valores de CI₅₀ en células en condiciones de hipoxia de 50 μM a 0,01 nM y que son hasta 1000 veces menos tóxicos en las células normóxicas correspondientes según se mide mediante valores de CI₅₀ relativos en células hipóxicas y normóxicas.

30

35

En una descripción relacionada, un profármaco alquilante de fosforamidato tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 50 μM y una razón de citotoxicidad en condiciones de hipoxia, HCR, medida mediante la razón de citotoxicidades normóxicas e hipóxicas, y definida con mayor detalle más adelante en la descripción, de 10 a 100.000. En una descripción relacionada, el profármaco alquilante de fosforamidato de la presente invención tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 50 μM y una HCR de 25 a 100.000. En otra descripción relacionada, un

profármaco alquilante de fosforamidato tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 5 µM y una HCR de 50 a 10.000.

En un aspecto, la presente invención proporciona los alquilantes de fosforamidato novedosos anteriores para su uso en el para tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende los profármacos alquilantes de fosforamidato de la invención y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente descripción proporciona el profármaco alquilante de fosforamidato para su uso en un método de tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un paciente que necesite tal terapia. En un caso, el cáncer tratado es resistente a la terapia de primera línea, de segunda línea, o de tercera línea, o es un cáncer recidivante. En otro ejemplo, el cáncer tratado es un cáncer metastásico. En otra realización, el profármaco alquilante de fosforamidato de la invención, se administra combinado con al menos otro agente anti-canceroso.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 demuestra el efecto del Compuesto 25 (50 mg/kg) sobre el crecimiento tumoral en el modelo de ratón con xenoinjerto H460.

La Figura 2 demuestra el efecto del Compuesto 25 (100 mg/kg) sobre el crecimiento tumoral en el modelo de ratón con xenoinjerto H460.

La Figura 3 demuestra el efecto del Compuesto 25 (150 mg/kg) dosificado combinado con CDDP sobre el crecimiento tumoral en el modelo de ratón con xenoinjerto H460.

La Figura 4 demuestra el efecto del Compuesto 25 dosificado combinado con CDDP sobre el crecimiento tumoral en el modelo de ratón con xenoinjerto H460.

Las Figuras 5, 6 y 7 demuestran el efecto del Compuesto 25 combinado con Gemcitabina sobre el crecimiento tumoral en el modelo de ratón con xenoinjerto H460.

Descripción Detallada de la Invención

La descripción detallada de los diferentes aspectos y las realizaciones de la presente invención se organiza como sigue: la Sección I proporciona definiciones útiles; la Sección II describe los compuestos de la invención y los métodos para elaborarlos; la Sección III describe métodos de tratamiento, terapias, administraciones, y formulaciones, que emplean los compuestos de la invención solos o combinados; y la Sección IV proporciona ejemplos de métodos sintéticos y análisis biológicos para los compuestos de la invención. Esta descripción detallada se organiza en secciones solo para conveniencia del lector, y la descripción encontrada en cualquier sección es aplicable a cualquier aspecto de la invención.

I. Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar al lector. A no ser que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología científicos o médicos utilizados en la presente memoria tengan los significados interpretados habitualmente por los expertos en las técnicas químicas y médicas. En algunos casos, los términos con los significados interpretados habitualmente se definen en la presente memoria como aclaración y/o como referencia inmediata, y no se debe considerar necesariamente que la inclusión de tales definiciones en la presente memoria represente una diferencia sustancial con la definición del término interpretada generalmente en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, "un", "uno" o "una" significa "al menos uno o una" o "uno o una o más".

"Alquilo" significa un radical hidrocarbonado monovalente saturado lineal o un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Según se utilizan en esta descripción, los prefijos (C₁-C_{qq}), C_{1-qq} o C₁-C_{qq}, en donde q es un número entero de 2 a 20, tienen el mismo significado. Por ejemplo, alquilo (C₁-C₈), alquilo C₁₋₈, o alquilo C₁-C₈ incluyen metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, n-butilo, 2-butilo, terc-butilo, pentilo, y similares. Para cada una de las definiciones de la presente memoria (p. ej., alquilo, alqueno, alcoxi, araquilo), cuando no está incluido un prefijo para indicar el número de átomos de carbono de cadena en una porción alquílica, el radical o porción del mismo tendrán seis o menos átomos de carbono en la cadena principal. Alquilo (C₁-C₆) puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente con sustituyentes, incluyendo, por ejemplo, deuterio ("D"), hidroxilo, amino, mono- o di-alquil(C₁-C₆)amino, halo, alqueniléter C₂-C₆, ciano, nitro, etenilo, etinilo, alcoxi C₁-C₆, alquil(C₁-C₆)tio, -COOH, -CONH₂, mono- o di-alquil(C₁-C₆)carboxamido, -SO₂NH₂,

-OSO₂-alquilo C₁-C₆, mono- o di-alquil(C₁-C₆)sulfonamido, arilo, heteroarilo, alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi o heteroarilsulfoniloxi.

5 "Alquilante" significa un radical reactivo susceptible de formar un enlace alquílico covalente con macromoléculas a través de una reacción electrofílica con un nucleófilo en la macromolécula. "Alquilante de fosforamido" significa un alquilante para el que está presente un electrófilo de aziridina o aziridinio o generado mediante ciclación intramolecular.

10 "Arilo" se refiere a un radical hidrocarbonado aromático monocíclico o bicíclico monovalente de 6 a 10 átomos en el anillo que está sustituido independientemente con uno a ocho sustituyentes, preferiblemente uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados entre deuterio ("D"), alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, halo, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, acilamino, mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, heteroalquilo, COR (donde R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo), -(CR'R")_n-COOR (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R" son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo) o -(CR'R")_n-CONR^xR^y (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R" son independientemente hidrógeno o alquilo, y R^x y R^y se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo). En una realización, R^x y R^y juntos son cicloalquilo o heterociclilo. Más específicamente el término arilo incluye, pero no se limita a, fenilo, bifenilo, 1-naftilo y 2-naftilo, y las formas sustituidas de los mismos.

20 "Cicloalquilo" se refiere a un radical de hidrocarbonado cíclico monovalente de tres a siete carbonos en el anillo. El grupo cicloalquilo también puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno, dos, tres o cuatro sustituyentes seleccionados entre alquilo, fenilo opcionalmente sustituido, o -C(O)R^z (donde R^z es hidrógeno, alquilo, haloalquilo, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, hidroxilo, alcoxi, o fenilo opcionalmente sustituido). Más específicamente, el término cicloalquilo incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, fenilciclohexilo, 4-carboxiciclohexilo, 2-carboxamidociclohexenilo, 2-dimetilaminocarbonil-ciclohexilo, y similares.

25 "Heteroalquilo" significa un radical alquilo como se define en la presente memoria con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre ciano, -OR^w, -NR^xR^y, y -S(O)_pR^z (donde p es un número entero de 0 a 2), con la interpretación de que el punto de anclaje del radical heteroalquilo es a través de un átomo de carbono del radical heteroalquilo. R^w es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, aralquilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxamido, o mono- o di-alquilcarbamoilo. R^x es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo o aralquilo. R^y es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, aralquilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxamido, mono- o di-alquilcarbamoilo o alquilsulfonilo. R^z es hidrógeno (siempre que n sea 0), alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, arilo, aralquilo, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, o hidroxialquilo. Los ejemplos representativos incluyen, por ejemplo, 2-hidroxietilo, 2,3-dihidroxiopropilo, 2-metoxietilo, benciloximetilo, 2-cianoetilo, y 2-metilsulfonil-etilo. Para cada uno de los anteriores, R^w, R^x, R^y y R^z puede estar sustituido adicionalmente con amino, halo, fluoro, alquilamino, di-alquilamino, OH o alcoxi. Adicionalmente, el prefijo que indica el número de átomos de carbono (p. ej., C₁-C₁₀) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heteroalquilo excluyendo las porciones ciano, -OR^w, -NR^xR^y, -S(O)_pR^z.

En una realización, R^x y R^y juntos son cicloalquilo o heterociclilo.

45 "Heteroarilo" significa un radical monocíclico, bicíclico o tricíclico monovalente de 5 a 12 átomos de anillo, que tiene al menos un anillo aromático que contiene uno, dos, o tres heteroátomos en el anillo seleccionados entre N, O, o S, siendo los restantes átomos del anillo C, con la interpretación de que el punto de unión del radical heteroarilo estará en un anillo aromático. El anillo de heteroarilo está opcionalmente sustituido independientemente con uno a ocho sustituyentes, preferiblemente uno, dos, tres o cuatro sustituyentes, seleccionados entre alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, halo, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, acilamino, mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, heteroalquilo, -COR (donde R es hidrógeno, alquilo, fenilo o fenilalquilo, -(CR'R")_n-COOR (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R" son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo), o -(CR'R")_n-CONR^xR^y (Donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R" son independientemente hidrógeno o alquilo, y R^x y R^y son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo). En una realización, R^x y R^y juntos son cicloalquilo o heterociclilo. Más específicamente el término heteroarilo incluye, pero no se limita a, piridilo, furanilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, pirrolilo, pirazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, benzofuranilo, tetrahydrobenzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzotriazolilo, indolilo, isoindolilo, benzoxazolilo, quinolilo, tetrahydroquinolinilo, isoquinolilo, bencimidazolilo, benzisoxazolilo o benzotienilo, indazolilo, pirrolopirimidinilo, indolizínilo, pirazolopiridinilo, triazolopiridinilo, pirazolopirimidinilo, triazolopirimidinilo, pirrolotriazinilo, pirazolotriazinilo, triazolotriazinilo, pirazolotetrazinilo, hexaaza-indenilo, y heptaaza-indenilo y los derivados de los mismos. A menos que se indique lo contrario, la disposición de los heteroátomos dentro del anillo puede ser cualquier disposición permitida por las características de unión de los átomos del anillo constitutivo.

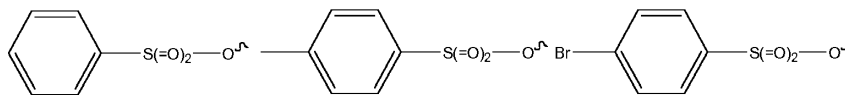
"Acilo C₁-C₆" significa -CO-(alquilo C₁-C₆), en donde el término alquilo se define como antes.

"Heteroacilo C₁-C₆" significa -CO-(heteroalquilo C₁-C₆), en donde el término heteroalquilo se define como antes.

"Aroilo" significa -CO-arilo, en donde el término arilo se define como antes.

5 "Heteroarilo" significa -CO-heteroarilo, en donde el término heteroarilo se define como antes.

"R_{Sul}sulfoniloxi" significa R_{Sul}-S(=O)₂-Oⁿ. Incluyendo alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, cicloalquilsulfoniloxi, heterocicilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi y heteroarilsulfoniloxi en donde R_{Sul} es alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, respectivamente, y en donde alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se han definido anteriormente. Los ejemplos de alquilsulfoniloxi incluyen Me-S(=O)₂-Oⁿ, Et-S(=O)₂-Oⁿ, CF₃-S(=O)₂-Oⁿ y similares, y los ejemplos de arilsulfoniloxi incluyen



15 y similares. Los grupos alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, cicloalquilsulfoniloxi, heterocicilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi, y heteroarilsulfoniloxi pueden ser grupos eliminables en los alquilantes de fosforamido y pueden ser reemplazados en una célula por ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, e imidazoles, carboxilatos, o tioles de proteínas, causando alquilación y muerte celular. La velocidad de reacción de los diversos grupos R_{Sul}sulfoniloxi con ácidos nucleicos, proteínas o agua puede ser modulada dependiendo por ejemplo de la naturaleza aceptora de electrones y el volumen estérico del radical R_{Sul} y puede proporcionar alquilantes de fosforamido y profármacos de
20 los mismos que son más tóxicos para los tumores en las zonas generales e hipóxicas del tumor en particular que para las células sanas.

"Sustituyentes" significa, junto con los sustituyentes descritos concretamente en la definición de cada uno de los grupos anteriores, los seleccionados entre: deuterio, -halógeno, -OR', -NR'R'', -SR', -SiR'R''R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)NR'R''', -NR'C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NR'S(O)₂R'', -CN y -NO₂, -R', -N₃, perfluoroalcoxi C₁-C₄ y perfluoroalquilo C₁-C₄, en un número que oscila de cero al número total de valencias abiertas en el radical; y donde R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₆, alqueno C₂₋₈, alquino C₂₋₈, arilo no sustituido y heteroarilo, (aril no sustituido)alquilo C₁₋₄, y ariloxialquilo C₁₋₄ no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo C₁₋₈ no sustituido, alcoxi C₁₋₈ o tioalcoxi C₁₋₈, o grupos arilalquilo C₁₋₄ no sustituidos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3, 4, 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, se entiende que -NR'R'' incluye 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Otros sustituyentes adecuados incluyen cada uno de los sustituyentes arilo anteriores unidos a un átomo del anillo por una conexión alqueno de 1 a 4 átomos de carbono. Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de fórmula -T²-C(O)-(CH₂)_q-U³-, en donde T² y T³ son independientemente -NH-, -O-, -CH₂- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en donde A y B son independientemente -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado se puede reemplazar opcionalmente por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente de fórmula -(CH₂)_s-X⁵-(CH₂)_t-, donde s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X⁵ es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)₂NR'- se selecciona entre hidrógeno o C₁₋₆ alquilo no sustituido.
45


Se pretende que ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos, regioisómeros e isómeros individuales (p. ej., enantiómeros separados) estén incluidos dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos de la presente invención pueden contener también proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos se pueden radiomarcarse con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (H³) o carbono 14 (C¹⁴). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, sean radioactivas o no, estén incluidas dentro del alcance de la presente invención.
50

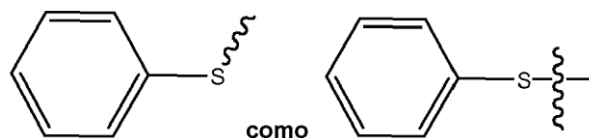
Se pretende que el término "sales farmacéuticamente aceptables" incluya sales de compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes concretos encontrados en los compuestos descritos en la presente memoria. Cuando los compuestos contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de bases poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de las sales derivadas de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas,
60

ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, sodio, cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, incluyendo aminas sustituidas, aminas cíclicas, aminas de origen natural y similares, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperadina, resinas poliamínicas, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Cuando los compuestos contienen funcionalidades relativamente alcalinas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, en forma pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y similares, así como las sales derivadas ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, p. ej., Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Algunos compuestos contienen funcionalidades tanto alcalinas como ácidas que permiten que los compuestos sean convertidos en sus sales de adición de ácido o de base.

Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto parental de la manera convencional. La forma parental del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por otra parte las sales son equivalentes a la forma parental del compuesto para los fines de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que estén incluidas dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

Una línea ondulada "  " Significa el punto de unión de un grupo o resto a otro. Por ejemplo, tanto



indican que el grupo tio es el punto de unión a otro grupo o radical.

Los términos CO, C(O), C(=O), -CO- se usan indistintamente en la presente memoria. Los términos CO₂ y COO se usan indistintamente en la presente memoria. Los términos; SO₂, S(O)₂ se usan indistintamente en la presente memoria. Los términos SO y S (= O) se usan indistintamente en la presente memoria. Los términos PO y P(=O) se usan indistintamente en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, un "bioisómero" de un radical químico tal como una molécula, un grupo o un átomo significa otro radical químico que tiene un tamaño y una disposición espacial del par o pares de electrones similares. Los bioisómeros y el bioisomerismo son herramientas bien conocidas para predecir la actividad biológica de compuestos, basándose en la premisa de que los compuestos con un tamaño, forma y densidad de electrones similares pueden tener una actividad biológica similar. Los reemplazos bioisostéricos conocidos incluyen, por ejemplo, la intercambiabilidad de -F, -OH, -NH₂, -Cl, y -CH₃; la intercambiabilidad de -Br e -*i*-C₃H₇; la intercambiabilidad de -I y -*t*-C₄H₉; la intercambiabilidad de -O-, -S-, -NH-, -CH₂, y -Se-; la intercambiabilidad de -N=, -CH=, y -P= (en radicales cíclicos o no cíclicos); la intercambiabilidad de los grupos fenilo y piridilo; la intercambiabilidad de -C=C- y -S- (por ejemplo, benceno y tiofeno); la intercambiabilidad de un nitrógeno aromático (R_{Ar}-N(R_{Ar})-R_{Ar}) para un carbono insaturado (R_{Ar}-C(=R_{Ar})-R_{Ar}); y la intercambiabilidad de -CO-, -SO- y -SO₂-. Estos ejemplos no son limitantes en la gama de equivalentes bioisostéricos y un experto en la técnica será capaz de identificar otros reemplazos bioisostéricos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patani et al., 1996, Chem. Rev. 96:3147-76; y Burger, 1991, A. Prog. Drug Res. 37:287-371.

Se puede realizar una predicción cuantitativa razonable de la capacidad de unión o la función de una molécula conocida sobre la base de la disposición espacial de un pequeño número de átomos o grupos funcionales en la molécula. Según se utiliza en la presente memoria, una disposición de este tipo se llama un "farmacóforo", y una vez

que se han identificado el farmacóforo o farmacóforos en una molécula, esta información se puede utilizar para identificar otras moléculas que contienen los mismos o similares farmacóforos. Tales métodos son bien conocidos por los expertos normales en la técnica de la química medicinal, y puesto que la información estructural descrita en esta solicitud identifica el farmacóforo de profármacos alquilantes de fosforamido y alquilantes de fosforamido.

5 Un ejemplo de los programas disponibles para realizar búsquedas relacionadas con farmacóforos es el programa de búsqueda 3D Pharmacophore del Chemical Computing Group (véase <http://www.chemcomp.com/fdept/prodinfo.htm>).

10 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descritos a continuación pueden ocurrir, pero no es necesario que ocurran, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia ocurren y casos en los que no. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente mono- o di- sustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede estar, pero no necesita que esté, presente y la descripción incluye situaciones en las que el grupo heterociclo está mono- o disustituido con un grupo alquilo y situaciones en las que el grupo heterociclo no está sustituido con un grupo alquilo.

15 Una combinación de sustituyentes o variables es permisible únicamente si tal combinación da como resultado un compuesto estable o químicamente factible. Un compuesto estable o compuesto químicamente factible es aquel en el que la estructura química no se altera sustancialmente cuando se mantiene a una temperatura de 4°C o menos, en ausencia de humedad u otras condiciones químicamente reactivas, durante al menos una semana.

20 Según se utiliza en la presente memoria, un "profármaco" significa un compuesto que, después de su administración, es metabolizado o convertido de otro modo en una forma activa o más activa con respecto a al menos una propiedad biológica, con respecto a sí mismo. Para producir un profármaco, un compuesto farmacéuticamente activo (o un precursor adecuado del mismo) se modifica químicamente de manera que la forma modificada sea menos activa o inactiva, pero la modificación química es eficazmente reversible en ciertas condiciones biológicas de manera que la forma farmacéuticamente activa del compuesto sea generada mediante procedimientos metabólicos u otros procedimientos biológicos. Un profármaco puede tener, con respecto al fármaco, características alteradas de estabilidad metabólica o transporte, menos efectos secundarios o inferior toxicidad, o sabor mejorado, por ejemplo (véase la referencia Nogrady, 1985, Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, páginas 388-392). Los profármacos se pueden preparar también utilizando compuestos que no son fármacos pero que después de la activación en ciertas condiciones biológicas generan un compuesto farmacéuticamente activo. Según se utiliza en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamido es un profármaco que después de su activación libera el alquilante de fosforamido activo.

35 Según se utiliza en la presente memoria, un "agente citotóxico" es un agente o compuesto que produce un efecto tóxico sobre las células. Según se utiliza en la presente memoria, un "agente citostático" es un agente que inhibe o suprime el crecimiento y la multiplicación celulares.

40 Según se utiliza en la presente memoria "células hipóxicas" son células que residen en un entorno hipóxico *in vivo* tal como, por ejemplo, en una zona tumoral hipóxica, o *in vitro*. Según se utiliza en la presente memoria "células normóxicas" son células que residen en un entorno normóxico *in vivo* o *in vitro*. Según se utiliza en la presente memoria "citotoxicidad hipóxica" de un compuesto o agente es su citotoxicidad sobre células hipóxicas. Según se utiliza en la presente memoria "citotoxicidad normóxica" de un compuesto o agente es su citotoxicidad sobre células normóxicas.

45 Según se utiliza en la presente memoria, un "grupo biorreductor" hace referencia a un grupo que acepta electrones en una reacción de oxidación-reducción. El grupo biorreductor es un grupo (1) que puede ser reducido, es decir, un grupo que puede aceptar electrones, hidrógeno, y/o un ión hidruro; (2) que puede ser reducido *in vivo* y/o *in vitro*; (3) que puede ser reducido *in vivo* y/o *in vitro* bajo hipoxia; (4) que puede ser reducido *in vivo* y/o *in vitro* mediante DT-diaforasa, tioles, o por medios fotoquímicos o electroquímicos; o (5) que puede ser eliminado y/o escindido mediante un procedimiento biológico, tal como mediante hidrólisis enzimática, metabolismo etc.

50 Por ejemplo, y como se describe con más detalle más adelante, un grupo biorreductor es un nitroimidazol que puede estar sustituido con una variedad de grupos. Otros ejemplos de grupos biorreductores incluyen, pero no están limitados a, grupos basados en nitrobenenos con deficiencia de electrones, amiduros de ácido nitrobenzoico deficientes en electrones, nitroazoles, nitroimidazoles, nitrotiofenos, nitrotiazoles, nitrooxazoles, nitrofuranos, y nitropirroles, donde cada una de estas clases de radicales puede estar sustituida opcionalmente, de manera que el potencial rédox del grupo biorreductor reside en el intervalo en el que el grupo puede experimentar reducción en las condiciones hipóxicas de un tumor, mediante DT-diaforasa, y/o mediante un tiol. Un experto en la técnica entenderá, en vista de la descripción de la presente memoria, cómo sustituir estos y otros grupos biorreductores para proporcionar un grupo biorreductor que tenga un potencial rédox que se encuentre dentro de dicho intervalo.

60 Generalmente, un experto en la técnica puede "ajustar" el potencial rédox de un grupo biorreductor modificando el grupo que contiene los grupos captadores de electrones, los grupos donadores de electrones, o alguna combinación

- de tales grupos. Por ejemplo, los grupos nitrotiofeno, nitrofurano, y nitrotiazol pueden estar sustituidos con uno o más grupos donadores de electrones, incluyendo pero no limitados a grupos metilo, metoxi, o amina, para lograr el potencial rédox deseado. En otro ejemplo, el radical nitropirrol puede estar sustituido con un grupo captador de electrones, incluyendo pero no limitado a grupos ciano, carboxamida, $-\text{CF}_3$, y sulfonamida, para lograr el potencial rédox deseado. Para este fin, se pueden utilizar grupos captadores de electrones fuertes tales como ciano, sulfona, sulfonamida, carboxamida, o $-\text{CF}_3$, y grupos captadores de electrones más suaves tales como $-\text{CH}_2$ -halógeno en los que el halógeno es -F, -Cl, o -Br.
- Según se utiliza en la presente memoria, un "agente antineoplásico", "agente antitumoral", o "agente anticanceroso", hace referencia a cualquier agente utilizado en el tratamiento del cáncer. Tales agentes se pueden utilizar solos o combinados con otros compuestos y pueden aliviar, reducir, mejorar, prevenir, o situar o mantener en un estado de remisión de los síntomas clínicos o marcadores diagnósticos asociados con neoplasmas, tumores o cánceres. Los agentes antineoplásicos incluyen, pero no están limitados a, agentes anti-angiogénicos, agentes alquilantes o alquilantes, antimetabolitos, ciertos productos naturales, complejos de coordinación de platino, antracendionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, ciertas hormonas y antagonistas, polisacáridos anti-cancerosos, quimioprotectores, y ciertas hierbas u otros extractos vegetales.
- Según se utiliza en la presente memoria, "cáncer" hace referencia a una de un grupo de más de 100 enfermedades causadas por el crecimiento incontrolado y diseminado de células anormales que pueden adoptar la forma de tumores sólidos, linfomas, y cánceres no sólidos tales como la leucemia.
- Según se utiliza en la presente memoria, "cáncer maligno" hace referencia a células cancerosas o cánceres que tienen la capacidad de metástasis, con pérdida tanto de crecimiento como de control posicional.
- Según se utiliza en la presente memoria, "neoplasma" (neoplasia) o "tumor" hace referencia a un nuevo crecimiento celular o tisular anormal, que puede ser benigno o maligno.
- Según se utiliza en la presente memoria, "tratar" una afección o a un paciente hace referencia a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio o mejora de uno o más síntomas del cáncer u otras condiciones de enfermedad hiperproliferativas, disminución del grado de enfermedad, retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora, paliación o estabilización del estado de enfermedad, y otros resultados beneficiosos descritos más abajo.
- Según se utiliza en la presente memoria, "reducción" de un síntoma o síntomas (y equivalentes gramaticales de esta frase) significa disminución de la gravedad o frecuencia del síntoma o los síntomas, o eliminación del síntoma o los síntomas.
- Según se utiliza en la presente memoria, "administrar" o "administración de" un fármaco a un sujeto (y equivalentes gramaticales de esta frase) incluye tanto la administración directa, incluyendo auto-administración, como la administración indirecta, incluyendo el hecho de prescribir un fármaco. Por ejemplo, según se utiliza en la presente memoria, un médico que instruye a un paciente para auto-administrarse un fármaco y/o proporciona a un paciente una prescripción para que se administre el fármaco al paciente.
- Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que, cuando se administra a un sujeto con cáncer, tendrá el efecto terapéutico deseado, p. ej., alivio, mejora, paliación o eliminación de una o más manifestaciones de cáncer en el sujeto. El efecto terapéutico completo no se produce necesariamente mediante la administración de una dosis, y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. De este modo, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones.
- Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto profiláctico deseado, p. ej., prevenir o retrasar el comienzo (o recurrencia) de la enfermedad o los síntomas, o reducir la probabilidad del comienzo (o recurrencia) de la enfermedad o los síntomas. El efecto profiláctico completo no se produce necesariamente mediante la administración de una dosis, y se puede producir solo después de la administración de una serie de dosis. De este modo, una cantidad profilácticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones.
- Según se utiliza en la presente memoria, una terapia de "segunda línea" hace referencia a una terapia que se proporciona para el tratamiento de un cáncer que ha fracasado en la respuesta a un primer régimen de quimioterapia o quimioterapia de "primera línea". Terapia de "tercera línea" hace referencia a la terapia que se proporciona para el tratamiento de un cáncer cuando tanto el tratamiento inicial, la terapia de primera línea, como el tratamiento subsiguiente, la terapia de segunda línea, no funciona, o deja de funcionar.

Según se utiliza en la presente memoria "LogP" significa una medida del carácter lipófilo de una sustancia determinada basándose en el reparto de la sustancia entre octanol y agua.

II. Compuestos

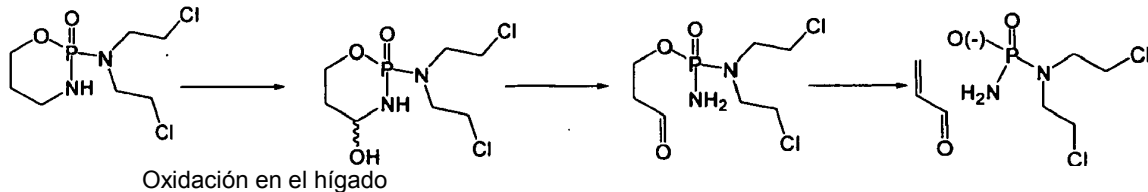
La mayoría de las terapias contra el cáncer mediadas por fármacos, incluyendo las terapias alquilantes basadas en fosforamidato, están basadas en venenos, denominados agentes citotóxicos, selectivos para elegir como diana células en división, por ejemplo, su ADN replicante, microtúbulos, y diversos factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. Estos fármacos son eficaces, debido a que las células cancerosas generalmente se dividen más frecuentemente que las células normales. Sin embargo, tales fármacos casi inevitablemente no destruyen todas las células cancerosas en el paciente. Una razón es que las células cancerosas pueden mutar y desarrollar resistencia a fármacos. Otra es que no todas las células cancerosas se dividen más frecuentemente que las células normales y las células cancerosas que se dividen lentamente pueden ser tan insensibles a tales agentes citotóxicos, o incluso más, que las células normales.

Algunas células cancerosas residen en un tumor sólido escasamente vascularizado, son incapaces de generar la energía requerida para la división celular y se dividen lentamente. A medida que el tumor crece, éste requiere un suministro de sangre y, por consiguiente, crecimiento de nueva vasculatura. La nueva vasculatura que soporta el crecimiento tumoral a menudo es desordenada; dejando regiones significativas del tumor infra-vascularizadas e incluso las regiones vascularizadas sujetas a bloqueo intermitente. Estas regiones infra-vascularizadas y bloqueadas del tumor se vuelven hipóxicas – tienen una concentración de oxígeno inferior o una presión parcial de oxígeno inferior que la correspondiente al tejido normal, y las células en las mismas exhiben velocidades de división más lentas. De este modo, la concentración media de oxígeno de sólo el diez por ciento de los tumores sólidos se encuentra en el intervalo normal de 5333 a 8000 Pa (40 a 60 mmHg), y el cincuenta por ciento de los tumores sólidos exhiben concentraciones medias de oxígeno de menos de 1333 Pa (10 mm Hg).

Las zonas hipóxicas del tumor representan una fuente significativa de metástasis y células cancerosas resistentes a terapia (véanse por ejemplo, De Jaeger et al., Br J Cancer. 2001, 84(9):1280-5 y Rofstad et al., Br J Cancer. 1999, 80(11):1697-707). Como es lógico, además, los bajos niveles de oxígeno en los tumores están asociados con una escasa respuesta a la terapia, aumento de metástasis, y escasa supervivencia. Los mecanismos de activación y acción de la Ciclofosfamida y la Ifosfamida ilustran agentes que no pueden elegir como diana la zona hipóxica difícil de destruir de un tumor.

Tanto la Ciclofosfamida como la Ifosfamida son profármacos y se pueden activar oxidativamente en el hígado a través de intermediarios para producir alquilantes de fosforamidato activos, los Alquilantes 1 (mostaza de ciclofosfamida) y 2 (mostaza de ifosfamida), respectivamente (véase más abajo). Los Hemiacetales de carga neutra 1 y 2 pueden tener una vida media de muchos minutos y pueden penetrar hacia el interior y el exterior de la célula. En contraste, los Alquilantes aniónicos 1 y 2 son mucho menos permeables a través de la membrana celular y una vez formados extracelularmente destruyen ineficazmente la célula por medio de la alquilación del ADN celular.

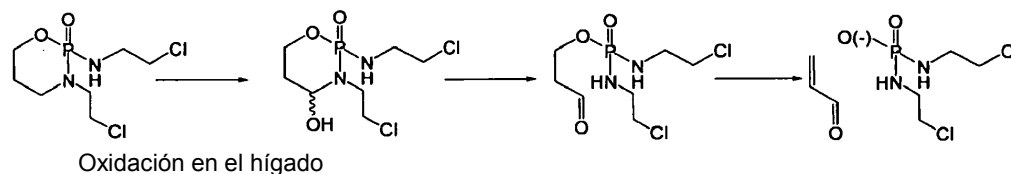
Cuando los alquilantes de fosforamidato alcanzan el tumor, éstos destruyen generalmente células en la zona externa, normóxica, bien vascularizada, de crecimiento rápido del tumor. Sin embargo, estos alquilantes de fosforamidato no son tan eficaces para penetrar en las zonas internas progresivamente hipóxicas, de crecimiento lento, menos vascularizadas del tumor y para destruir allí las células tumorales. Antes de que cualquiera de estos alquilantes activos alcancen el tumor, éstos puede reaccionar con células sanas y dar como resultado toxicidad y/o muerte celular.



Ciclofosfamida

Hemiacetal 1

Alquilante 1



Ifosfamida

Hemiacetal 2

Alquilante 2

Si bien el tumor hipóxico es difícil de tratar, la zona hipóxica del tumor puede generar derivados reducidos de una variedad de grupos químicos (véase la referencia Workman et al., 1993, Cancer y Metast. Rev. 12: 73-82), y se pueden desarrollar profármacos de citotoxinas para explotar tales entornos biorreductores (documento WO 2006/065448 y documento WO 2006/057946, ambos de Matteucci et al.). Tal fármaco reducible por hipoxia (o activado por hipoxia) se puede construir empleando un grupo biorreductor (Z_3) junto con un alquilante. El grupo biorreductor se emplea como parte de un radical Disparador unido covalentemente o anclado al alquilante de fosforamidato.

Los compuestos de la invención se pueden describir generalmente como profármacos alquilantes de fosforamidato. En general, los profármacos alquilantes de fosforamidato de la invención tienen la siguiente estructura



donde Alq es un alquilante de fosforamidato y el Disparador T tiene una estructura L- Z_3 , donde el conector L está unido a un grupo biorreductor Z_3 . En los compuestos de la invención, el Disparador T es un disparador activado por hipoxia.

Los alquilantes de fosforamidato son referidos en las referencias, Borch et al., J. Med. Chem. 2000, 43: 2258-65; 2001, 44: 69-73; 2001, 44: 74-7; Hernick et al. J. Med. Chem. 2002, 45: 3540-8; Hernick et al., J. Med. Chem. 2003, 46: 148-54; Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.908.356; 5.306.727; 5.403.932; 5.190.929; 5.472.956; y 6.656.926; Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0008850; y Papot et al., Curr. Med. Chem., 2002, 2, 155-85. En algunos casos, los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención tienen una o más de las siguientes características: (i) una toxicidad hipóxica superior o valor de CI_{50} o CI_{90} inferior, en tejido hipóxico, (ii) citotoxicidad normóxica inferior, y (iii) un perfil de efectos secundarios menos tóxicos o alguna combinación de estos atributos. En algunos casos, los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención difieren de los derivados alquilantes de fosforamidato conocidos en: (i) la naturaleza del alquilante de fosforamidato liberado, (ii) la naturaleza del conector (L) y/o el grupo biorreductor Z_3 , (iii) la presencia de más de un grupo radical biorreductor, o alguna combinación de estos atributos, (iv) el aumento de la citotoxicidad selectiva por hipoxia medida por valores de HCR más altos, (v) aumento de la solubilidad en agua, (vi) aumento de la estabilidad a la degradación microsomal en el hígado, y/o (vii) el suministro de profármacos alquilantes de fosforamida eficaces que son aquirales y evitan la especificidad enantiomérica en el metabolismo in vivo.

Para entender por qué los compuestos profármaco de la presente invención representan un avance significativo sobre los derivados alquilantes de fosforamidato anticancerosos conocidos, es útil una comprensión de la biología del tumor particularmente bajo hipoxia y farmacocinética, y farmacodinámica de los profármacos propocionados en la presente memoria en particular.

Para la terapia contra tumores eficaz, un profármaco activado por hipoxia debe ser mucho menos tóxico para células normóxicas sanas en comparación con las células tumorales hipóxicas. En algunas realizaciones, los profármacos activados por hipoxia de la invención son menos activos y menos tóxicos para las células normóxicas que para las células hipóxicas. Cuando tal profármaco de la invención encuentra el entorno reductor hipóxico, en el interior de un tejido tumoral sólido, la reducción del grupo biorreductor ocasiona la disociación del alquilante de fosforamidato o de la citotoxina activa. El alquilante de fosforamidato es liberado en la zona interna del tumor y puede penetrar más fácilmente en la región hipóxica del tumor sólido. Estos alquilantes de fosforamidato pueden destruir células en la región hipóxica del tumor sólido difícil de alcanzar a la vez que se minimizan la muerte de las células sanas no cancerosas y los efectos secundarios tóxicos para el paciente. De este modo la presente invención proporciona profármacos activados por hipoxia que son mucho menos tóxicos para las células normóxicas, sanas en comparación con las células tumorales, hipóxicas.

Los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención emplean radicales aromáticos que contienen nitro como grupos biorreductores en el Disparador T. En el tumor hipóxico, el grupo nitro se reduce a un grupo hidroxilamino o un grupo amino y el flujo de un par de electrones del grupo amino o hidroxilamino a través del sistema de electrones π conjugados del Disparador T libera el alquilante de fosforamidato. El alquilante de fosforamidato liberado destruye células en y/o cerca del tumor hipóxico.

Varias enzimas pueden ser responsables de la reducción del grupo biorreductor Z_3 en el Disparador. Por ejemplo, las enzimas citocromo P450 reductasa pueden reducir el radical nitro en un grupo biorreductor en una primera etapa respectivamente a un anión radical $NO_2(-)$. La zona del tumor hipóxico puede tener una concentración más alta de la enzima reductasa en comparación con el tejido normóxico. Bajo normoxia, como en tejido sano bien vascularizado, en presencia de oxígeno, el anión radical $NO_2(-)$ formado puede reaccionar con oxígeno para devolverlo al grupo biorreductor y no generar o liberar finalmente el alquilante de fosforamidato. El radical heteroarilo unido covalentemente al anión radical $NO_2(-)$ modula la sensibilidad al oxígeno del anión radical.

La sensibilidad al oxígeno del grupo biorreductor varía dependiendo parcialmente del potencial de reducción del grupo biorreductor. De este modo, por ejemplo, un grupo biorreductor se puede reducir en una zona hipóxica del tumor que tenga 1% de oxígeno, otro en una zona que tenga 0,1% de oxígeno, y otro más en una zona que tenga 0,01% de oxígeno.

5 Un grupo biorreductor pierde algo o toda la especificidad hipóxica cuando es tan fácil de reducir que la enzima citocromo P450 reductasa u otros agentes reductores ("agentes reductores") en tejido normóxico sano pueden reducirlo en presencia de oxígeno. Si un anión radical $\text{NO}_2(\cdot^-)$ en un grupo biorreductor no reacciona o reacciona lentamente con oxígeno, el propio anión radical puede liberar el alquilante de fosforamidato, o puede reducir y liberar
10 adicionalmente el alquilante de fosforamidato, causando toxicidad para las células y tejidos normóxicos sanos. Los profármacos alquilantes de fosforamidato novedosos de la presente invención son más tóxicos para las células y tejidos cancerosos hipóxicos en comparación con las células y tejidos normóxicos sanos.

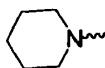
15 La facilidad o dificultad para reducir el grupo biorreductor Z_3 se puede medir por medio del potencial de reducción del grupo biorreductor y está influida por el conector (L), y el alquilante de fosforamidato (Alq-H). Por ejemplo, el anclaje del grupo biorreductor a un conector captador de electrones o un alquilante de fosforamidato captador de electrones puede hacer más fácil de reducir el grupo biorreductor en comparación con cuando está unido covalentemente a un conector rico en electrones o a un alquilante de fosforamidato rico en electrones.

20 El Disparador T se puede oxidar, hidrolizar, o tiolizar y puede liberar el alquilante de fosforamidato de una manera no selectiva de hipoxia. La Telcita[™], un profármaco alquilante de fosforamidato que está en uso clínico, puede liberar una toxina activa en ausencia de hipoxia por medio de la acción de la glutatión transferasa (véase, *p. ej.*, el alquilante de fosforamidato If en la sección "Métodos de Tratamiento"). La naturaleza química del conector y/o el alquilante de fosforamidato pueden influir en la estabilidad oxidativa, hidrolítica, o tiolítica del profármaco con
25 respecto a la liberación del alquilante de fosforamidato. En una realización de la presente invención un profármaco alquilante de fosforamidato activado por hipoxia no libera el alquilante de fosforamidato en, una oxidación, hidrólisis, o tiolisis no específica de hipoxia.

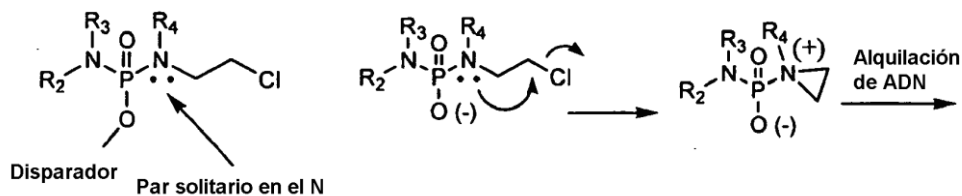
De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar un Disparador empleado apropiadamente en un profármaco alquilante de fosforamidato para "ajustar" la propiedad farmacocinética del profármaco sin alterar sus propiedades
30 citotóxicas. Por ejemplo, un alto volumen de distribución de un agente anticanceroso asegura que el profármaco sea absorbido en el tejido rápidamente. De acuerdo con la presente invención, en una realización, el volumen de distribución de un profármaco alquilante de fosforamidato se puede modular empleando un Disparador T que contenga un grupo amino capaz de formar un catión amonio en condiciones fisiológicas. En una realización, un
35 Disparador T que contiene un grupo amonio cuaternario puede producir un compuesto profármaco de la invención que tiene un alto volumen de distribución a la vez que se evitan posibles capturas endosómicas. En otra descripción, un Disparador T que comprende una funcionalidad carboxilo existirá como la forma de anión carboxilato aniónica. $\text{CO}_2(\cdot^-)$ en el espacio extracelular fuera de tejido sano normal y no pasará fácilmente a través de la membrana celular normal. El pH más bajo en el espacio extracelular del tumor puede convertir el $\text{CO}_2(\cdot^-)$ en la forma " CO_2H " no cargada
40 permitiendo que el profármaco pase a través de la membrana de células tumorales.

Un alquilante de fosforamidato que contiene un grupo hidroxilo, amino, mercapto, y/o carboxilo se puede transformar en un profármaco anclando covalentemente un Disparador T a uno o más de estos grupos funcionales. Durante la
45 transformación de un alquilante de fosforamidato en un profármaco, un grupo hidroxilo en el alquilante de fosforamidato se puede transformar, por ejemplo, en un éter o un acetal, un amino en un alquilamino, un carbamato, o una amida; un grupo carboxilo en un éster; y un grupo mercapto en un tioéter o tioacilo, como se describe con más detalle en las secciones del Método de Síntesis y Experimental de más abajo. Esta transformación puede producir un profármaco que es menos polar o más lipófilo que el alquilante de fosforamidato correspondiente. Los
50 profármacos alquilantes de fosforamidato no polares pueden no ser fácilmente solubles en portadores o diluyentes farmacéuticos acuosos. Los grupos potenciadores de la solubilidad como CO_2H , amino, alquilamino, dialquilamino, e hidroxilo se pueden emplear en el Disparador T para modular la solubilidad del profármaco y superar cualquiera de los problemas encontrados en la preparación de formulaciones acuosas de los profármacos alquilantes de fosforamidato.

55 Los alquilantes de fosforamidato pueden tener radicales N-(2-haloetilo) unidos covalentemente a un radical $\text{P}=\text{O}$ como se muestra más abajo. Después de la liberación del radical alquilante de fosforamidato aniónico se forma una especie de aziridina o aziridinio que puede alquilar ADN (Véase la sección de EJEMPLOS, Ejemplo 32). Dependiendo de la naturaleza captadora de electrones de los sustituyentes R_2 y R_3 , la cinética de formación de aziridinio puede variar. Por ejemplo, como se muestra en la secuencia de reacción de más abajo, la velocidad de alquilación puede aumentar cuando el radical NR_2R_3 se cambia de NH_2 a
60



(véase Engle et al., J. Med. Chem., 1987, 25:1347-57). Los sustituyentes en los átomos de nitrógeno pueden alterar la geometría del alquilante de fosoramidato, la deslocalización del par de electrones solitario en este átomo de nitrógeno en el radical P=O, la disponibilidad de los pares de electrones solitarios en el nitrógeno para el aziridinio o la posterior formación de aziridina, y la solubilidad en agua del profármaco alquilante de fosoramidato y el alquilante de fosoramidato.

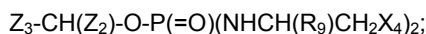
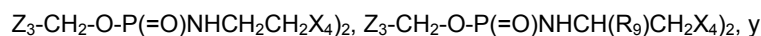


Profármaco alquilante de fosoramidato de la presente invención

Alquilante de fosoramidato

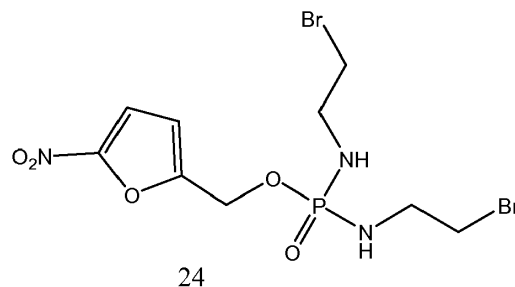
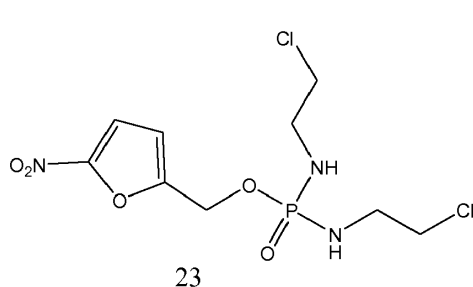
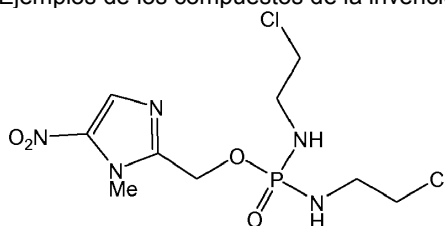
Aziridinio

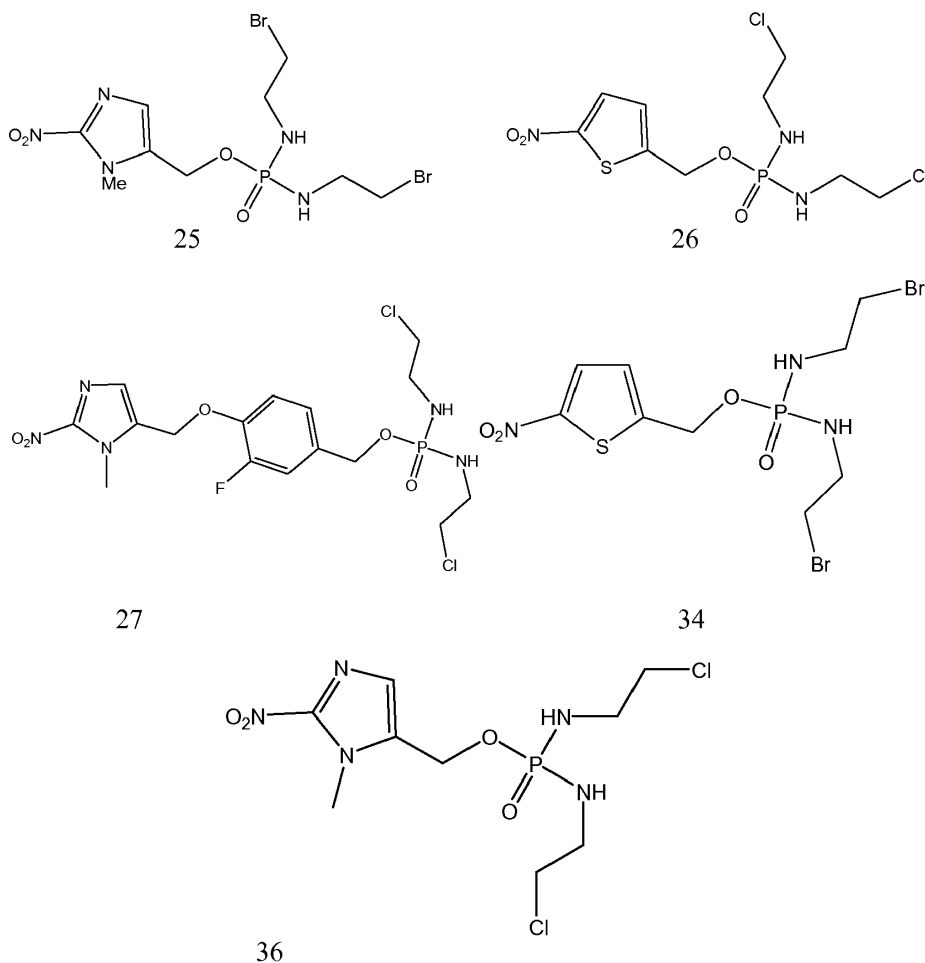
La presente invención surge en parte del descubrimiento de que profármacos alquilantes de fosoramidato que emplean un grupo biorreductor 2-nitroimidazol muestran una citotoxicidad hipóxica inesperadamente alta, baja toxicidad normóxica y alta HCR y solubilidad mejorada. Por ejemplo, los Compuestos 24 (véase el Ejemplo 34) y 25 fueron respectivamente, de 400 a 1000 veces más tóxicos en células hipóxicas que en células normóxicas en un análisis de citotoxicidad anti-proliferación con una Cl_{50} 0,05 μ M en células bajo hipoxia (véase la sección de EJEMPLOS). Los profármacos alquilantes de fosoramidato que contienen mostaza de ifosfamida o análogos de mostaza de ifosfamida y que tienen las fórmulas:



donde Z_2 es metilo; R_9 es hidrógeno, metilo, o isopropilo; Z_3 es 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-ilo, 2-nitrotiofen-5-ilo, o 2-nitrofurano-5-ilo; y cada X_4 es Cl o Br fueron inesperadamente más tóxicos en células hipóxicas en comparación con células normóxicas, y/o poseían valores de HCR inesperadamente altos, en análisis de citotoxicidad anti-proliferación celular, en contraste con los valores de HCR de derivados alquilantes de fosoramidato conocidos que tienen grupos biorreductores (Z_3) de 2-nitrotiofen-5-ilo, 2-nitrofuran-5-ilo, o 5-nitroimidazolilo, y mostaza de N,N'(tetrakis-2-cloroetil)fosoramidato o mostaza de ciclofosfamida; o un grupo indoloquinonilo como Z_3 y mostaza de ifosfamida (véanse *p. ej.*, los compuestos P4, P14-17, P19, y P21-22, en Borch et al., J. Med. Chem., y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.656.926 ambas más arriba).

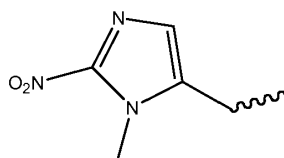
En otro grupo de realizaciones, la presente invención proporciona los agrupamientos individuales y selectivos de los compuestos de los EJEMPLOS. Los Ejemplos de los compuestos de la invención incluyen:





5

En una realización, el profármaco de fosforamidato alquilante contiene



10

como Z_3 y muestra una toxicidad específica para el tumor hipóxico mientras que es mucho menos tóxico para los tejidos normóxicos sanos.

15

Conocidos profármacos alquilantes de fosforamidato tales como la ifosfamida y la ciclofosfamida se metabolizan para producir subproductos citotóxicos tales como la acroleína y el cloroacetaldehído que causan efectos secundarios indeseables para el paciente, tales como cistitis hemorrágica, coma o muerte. En un caso, la presente descripción proporciona un profármaco alquilante de fosforamidato que después del metabolismo produce subproductos menos tóxicos por tratamiento en comparación con los producidos por el metabolismo de la ifosfamida y/o la ciclofosfamida. En un caso, los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención no producen acroleína mediante el metabolismo *in vivo*. Los ejemplos de subproductos tóxicos resultantes del metabolismo de los profármacos alquilantes de fosforamidato incluyen cloro, bromo, alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi, o heteroarilsulfoniloxi-acetaldehído (para la producción metabólica de cloroacetaldehído a partir de ifosfamida véase la referencia Hardman *et al.*, más arriba, página 1396). En otro caso, la presente descripción proporciona un profármaco alquilante de fosforamidato que después del metabolismo oxidativo produce como mucho 5-95% de cloroacetaldehído o un equivalente como se ha definido anteriormente, por tratamiento, del producido mediante el metabolismo con ifosfamida.

25

30

El derivado alquilante fosforamidato formado tras la reducción de Z_3 puede ser diferente del alquilante de fosforamidato protegido y el profármaco alquilante de fosforamidato y que se denomina profármaco alquilante de fosforamidato modificado. Por ejemplo, un profármaco alquilante de fosforamidato puede producir un profármaco

alquilante de fosforamidato modificado Alk-Disparador_{mod} tras la reducción del grupo biorreductor (Z_3). Cuando la reducción del grupo biorreductor forma un profármaco alquilante de fosforamidato modificado, el conector (L) unido al alquilante de fosforamidato puede sufrir degradación para producir o bien el alquilante de fosforamidato o bien algún otro profármaco alquilante de fosforamidato modificado.

En un caso, la presente descripción proporciona un compuesto que demuestra un efecto adyacente "bystander" tras la activación en el tejido hipóxico mediante la incorporación de un conector (L) como se ha descrito anteriormente. El efecto adyacente permite que un alquilante de fosforamidato modificado se difunda o penetre en zonas tumorales que no son hipóxicas lo suficiente para activar los compuestos profármaco de la invención pero resida cerca de la zona hipóxica del tumor que puede activar estos profármacos.

Tras la reducción el grupo biorreductor (Z_3) dentro del Disparador T se modifica a Z_{3-mod} , para producir un profármaco alquilante de fosforamidato modificados tal como alquilante de fosforamidato- T_M o producto conjugado de Alq- T_M .

En una descripción, un Disparador T, tras la biorreducción, se modifica a Disparador_{mod} o T_M y el alquilante de fosforamidato se separa de T_M en menos de 0,1 segundos. En otro caso, el alquilante de fosforamidato se separa de T_M entre 0,01 y 0,10 segundos. En otro caso, el alquilante de fosforamidato se separa de T_M entre 0,1 y 1,0 segundos. En otro caso, el fosforamidato activo se separa de T_M entre 1,0 y 10,0 segundos. En otro caso, el alquilante de fosforamidato se separa de T_M entre 10,0 y 100,0 segundos.

En una descripción relacionada, tras la activación o la reducción, un profármaco alquilantes fosforamidato produce un profármaco con un Disparador T modificado (T_M) que posteriormente libera el alquilante de fosforamidato de 20 a 500 μm desde el sitio de activación o reducción; o de 20 a 100 μm desde el sitio de la activación o reducción. El efecto adyacente de un profármaco alquilante de fosforamidato se puede medir utilizando esferoides celulares y análisis celular de múltiples capas (para los ejemplos de tales ensayos véanse Kyle et al., Cancer Res. 2004, 64(17):6304-9 y West et al., Cancer Chemother. Pharmacol, 1987, 20(2):109-14); y se describe con mayor detalle en los Ejemplos 35 y 37. Las células tumorales se pueden crecer en cultivo en forma de esferoides multicelulares para crear un modelo *in vitro* del microentorno del tumor en los tumores sólidos que contienen una región hipóxica y una población de células en reposo en respuesta a las tensiones ambientales de nutrientes limitados y aumento de la producción de residuos. Estos esferoides tienen la propiedad única de desarrollar gradientes de oxígeno y nutrientes a medida que los agregados de células continúan dividiéndose y creciendo hacia el exterior. Después de que el anillo viable alcanza aproximadamente 150 micras de tamaño, se desarrolla una región hipóxica, que impulsa las células en esta región a un estado de reposo y, finalmente, a la muerte celular. Se desarrolla un núcleo necrótico como resultado de las células que mueren. El esferoide se puede dividir en 4 compartimentos distintos para el modelado de la eficacia de un profármaco activado hipóxico: 1) la región exterior aeróbica y que se divide activamente; 2) una región de hipoxia intermedia; 3) una región de hipoxia donde las células no están en ciclo; 4) y un núcleo necrótico que contiene las células muertas y los desechos celulares. La respuesta de un fármaco dependerá de diversos factores; la capacidad del compuesto para penetrar en las regiones más profundas del esferoide. La activación del profármaco activado por hipoxia (HAP) por nitrorreductasas; la reactividad del fármaco activado en la célula en la que se activó; y la capacidad del fármaco activado para dejar el sitio desde donde se activó y destruyó las células cercanas (efecto adyacente). Por consiguiente, la estimación de la eficacia de un compuesto puede ser evaluada en varios niveles diferentes. El efecto del compuesto por sí solo puede ser comparado con células en cultivo monocapa frente esferoides intactas. El HAP se puede utilizar como monoterapia. La fracción hipóxica del esferoide se puede modular mediante la variación de la concentración de O_2 del gas de equilibrio y, por tanto, cambiar la razón de los compartimentos aeróbicos e hipóxicos. Los HAP se pueden combinar con otros agentes quimioterapéuticos que eligen como diana solo las células aeróbicas exteriores o son capaces de elegir como diana todo el esferoide. La muerte celular esperada puede ser pronosticada conociendo la fracción hipóxica y la muerte celular esperado de cada una de las monoterapias.

En una descripción, el profármaco alquilante de fosforamidato, tras la activación tal como biorreducción, libera el alquilante de fosforamidato con una vida media de menos de 0,1 segundos; entre 0,01 y 0,10 segundos, entre 0,1 y 1,0 segundos, entre 1,0 y 10,0 segundos, y entre 10,0 y 100,0 segundos.

Los fármacos anti-cancerosos se pueden unir al tejido que rodea a la vasculatura y/o tener altos pesos moleculares que impiden su difusión y no llegan a concentraciones terapéuticamente eficaces a las zonas tumorales hipóxicas que pueden estar hasta a 150 - 200 μM de la vasculatura. Los profármacos alquilantes de fosforamidato, pueden llegar a las células cancerosas hipóxicas lejos de la vasculatura. Algunos métodos para determinar el efecto adyacente se describen con mayor detalle en los Ejemplos 35 y 37. El alquilante de fosforamidato utilizado en un profármaco activado por hipoxia juega un papel importante para destruir eficazmente células tumorales. Por ejemplo, para un profármaco alquilante de fosforamidato activado por hipoxia, la citotoxicidad del alquilante de fosforamidato y su tasa de alquilación celular, y la permeabilidad de la membrana celular del profármaco y el alquilante fosforamidato tiene consecuencias sobre la selectividad hipóxica y la citotoxicidad hipóxica del profármaco alquilante de fosforamidato.

Los profármacos alquilantes de fosforamidato, que son más seguros que los alquilantes de fosforamidato correspondientes formados *in vivo* (al menos diez y hasta un millón de veces más seguros. En un caso, el aumento de seguridad resulta de una modificación en el sitio de anclaje al Disparador T (la activación del profármaco alquilante de fosforamidato libera el alquilante/agente citotóxico). En cualquier caso, los profármacos alquilantes de fosforamidato se convierten en el alquilante correspondiente en tejidos hipóxicos en virtud de la activación o la reducción del grupo biorreductor (Z_3), dando como resultando su eliminación y la liberación o generación concomitante o subsiguiente del alquilante de fosforamidato.

En una descripción, el Disparador T está unido covalentemente al alquilante de fosforamidato, de manera que enmascara o reduce la actividad citotóxica del alquilante de fosforamidato. Este efecto de enmascaramiento puede variar y puede depender de la actividad citotóxica del alquilante de fosforamidato. Típicamente, el profármaco alquilante de fosforamidato mostrará una actividad citotóxica al menos aproximadamente 10 veces menor que la correspondiente al alquilante de fosforamidato, y puede mostrar una actividad citotóxica de hasta aproximadamente un millón de veces o menor. En una versión, la actividad citotóxica del profármaco alquilante de fosforamidato es de aproximadamente 100 veces a aproximadamente 10.000 veces menor que la actividad citotóxica del alquilante de fosforamidato correspondiente. Como un ejemplo, para un alquilante de fosforamidato con una CI_{50} , CI_{90} o CL_{50} de 1 nM, la IC_{50} , CI_{90} o CL_{50} del correspondiente profármaco alquilante de fosforamidato puede ser 1 μ M o mayor.

En una descripción, los compuestos pueden incluir como profármaco alquilante de fosforamidato, cualquier alquilante de fosforamidato que se pueda conectar a un Disparador T de una manera que produzca un profármaco alquilante de fosforamidato que es al menos aproximadamente 10 veces hasta aproximadamente 1.000.000 veces, y típicamente de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 veces, menos activo como un agente citotóxico que el alquilante de fosforamidato o alquilante de fosforamidato modificado correspondiente que se libera de los compuestos bajo condiciones hipóxicas.

Para determinar si un profármaco alquilante de fosforamidato es selectivamente activo en condiciones anóxicas o hipóxicas, las células se exponen al fármaco o bien con aire (normoxia) o sin oxígeno (anoxia) o con muy poco oxígeno (hipoxia). Un experto en la técnica reconocerá que la citotoxicidad de un profármaco alquilante de fosforamidato tal como se mide en un ensayo anti-proliferación se expresa mediante la CI_{50} ; y la citotoxicidad de un profármaco alquilante de fosforamidato tal como se mide en un experimento de supervivencia clonogénico se expresa como CI_{10} o CL_{10} , CI_{90} o CL_{90} o CI_{99} o CL_{99} . La razón de citotoxicidad tal como se mide por ejemplo mediante CI_{50} , CI_{90} , CL_{50} , CL_{90} o CL_{99} determinadas en normoxia e hipoxia se denomina razón de citotoxicidad en hipoxia (HCR) y puede ser una medida de la citotoxicidad selectiva en hipoxia de los profármacos. Cuanto mayor sea la HCR del profármaco alquilante de fosforamidato mayor es su toxicidad selectiva celular hipóxica y mayor será la capacidad de destruir tumores en hipoxia del profármaco con respecto a las células normóxicas sanas. La HCR determinada en función de CI_{99} o CL_{99} es mayor que; la determinada basándose en CI_{90} o CL_{90} .

En una descripción relacionada, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 50 μ M y una HCR de 10 a 100.000. En una descripción relacionada, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 50 μ M y una HCR de 25 a 100.000 (véase la sección de EJEMPLOS). En otra descripción relacionada, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene una citotoxicidad hipóxica de 0,1 nM a 5 μ M y una HCR de 50 a 10.000 tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en los Ejemplos 24-27.

En una descripción, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene una toxicidad hipóxica que es de 5 a 1.000.000 veces mayor que la toxicidad normóxica correspondiente. En otra descripción del profármaco alquilante de fosforamidato tiene una toxicidad hipóxica que es de 10 a 10.000 veces mayor que la toxicidad normóxica correspondiente. En otra descripción, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene una toxicidad hipóxica, que es de 25 a 5.000 veces mayor que la toxicidad normóxica correspondiente.

Los tumores tienen un gradiente de concentración de oxígeno que puede variar de 10%, en los tejidos adyacentes a la vasculatura, a 0,5% en tejidos a aproximadamente 150 μ M de distancia, y más baja en los tejidos más lejos de la vasculatura y cerca del núcleo necrótico. En una descripción, los profármacos alquilantes de fosforamidato pueden generar alquilantes de fosforamidato, 5-1.000.00; 10-10.00; y 25-5.000 veces más tóxicos que el profármaco correspondiente, bajo una variedad de concentraciones de oxígeno. En un caso, los profármacos alquilantes de fosforamidato generan alquilantes de fosforamidato, 5-1.000.00; 10-10.00; y 25-5.000 veces más tóxicos que el profármaco correspondiente, bajo concentraciones de oxígeno de aproximadamente 0,5 a 0,6%.

El logP de un profármaco alquilante de fosforamidato de la presente invención puede medir el carácter lipófilo o el carácter hidrófilo del profármaco. En una descripción, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene un logP de menos de 0. Tales profármacos alquilantes fosforamidato pueden ser hidrófilos, y se pueden formular fácilmente como una formulación acuosa para la inyección i.v. o i.p.. Otro ejemplo de tales profármacos son los compuestos 24, 25 y 36.

En una descripción, el profármaco alquilante de fosforamidato tiene un logP superior a 0. En un caso, el profármaco

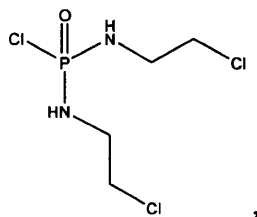
alquilante de fosforamidato tiene un logP entre 0 y 4, y administrado a un paciente puede pasar la membrana de la célula para penetrar dentro de las células cancerosas. En otro ejemplo un profármaco tiene un logP entre 0 y 5, 6, 7, o 16 (para el logP medido de los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención véase la sección de EJEMPLOS).

5

Método de síntesis

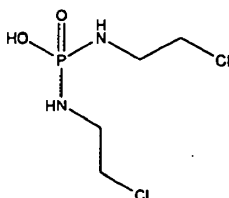
La presente invención surge en parte del descubrimiento de que el compuesto 36, que podría no ser aislado haciendo reaccionar

10



1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol, y n-butil litio en un disolvente adecuado, se sintetizó fácilmente empleando una reacción de tipo Mitsunobu donde el 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol era activado mediante la adición de

15



para producir el compuesto 36.

20

De este modo, en un aspecto la presente descripción proporciona un método para sintetizar un compuesto de fosforamidato que comprende hacer reaccionar un ácido fosforamídico o fosfordiamídico y un alcohol para producir un fosforamidato. En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para sintetizar los compuestos profármaco alquilantes de fosforamidato novedosos de la invención. En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un profármaco alquilante de fosforamidato que comprende hacer reaccionar, un alquilante de fosforamidato novedoso o conocido, un Disparador-OH, una fosfina trisustituída, y un azodicarboxilato de dialquilo para producir un profármaco alquilante de fosforamidato. En un aspecto del método, en una primera etapa el Disparador-OH se hace reaccionar con la fosfina trisustituída y el azodicarboxilato de dialquilo para producir un intermedio, y en una segunda etapa, el alquilante de fosforamidato se añade al intermedio obtenido a partir de la primera etapa para formar el producto.

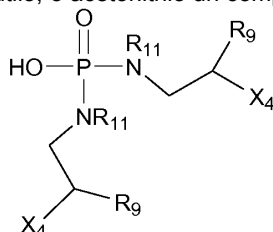
25

30

En otro caso, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un profármaco alquilante de fosforamidato que comprende

35

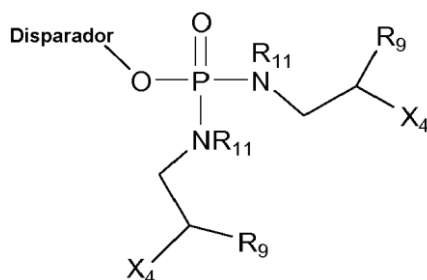
(i) hacer reaccionar en un disolvente seleccionado entre THF, dioxano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, o acetonitrilo un compuesto de fórmula:



en donde cada R₁₁ es independientemente hidrógeno, ciclopropilo, metilo, etilo, bencilo, o metoxi; cada R₉ es independientemente hidrógeno, metilo, etilo, propilo o ciclopropilo; y X₄ es halo, metilsulfoniloxi, fenilsulfoniloxi, 4-metilfenilsulfoniloxi, y 4-halofenilsulfoniloxi;

40

(ii) una fosfina trisustituída seleccionada entre trifenilfosfina, tributilfosfina, tributilfosfito; y
(iii) azodicarboxilato de dietilo o de diisopropilo;
para proporcionar un producto de fórmula:



5 En un caso, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un profármaco alquilante de fosforamidato que comprende las etapas de:

- 10 (a) someter a reflujo POCl_3 con una sal de N-2-haloetil-N-(R_{13})amonio, en donde R_{13} es hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, heterociclilo, arilo, heteroarilo, para proporcionar un intermedio diclorofosforamidato;
- 15 (b) hacer reaccionar el intermedio diclorofosforamidato en la etapa (a) con una sal de N-2-haloetil-N-(R_{13})amonio, en donde R_{13} es hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, heterociclilo, arilo, heteroarilo, y una base en un disolvente para producir un intermedio monoclorofosforamidato; y
- (c) hacer reaccionar el intermedio monoclorofosforamidato obtenido en la etapa (b) con el Disparador-OH y una base en un disolvente para producir el profármaco alquilante de fosforamidato.

20 En un caso, el intermedio diclorofosforamidato de la etapa (a) se separa del resto de la mezcla de reacción antes de someterlo a la reacción de la etapa (b). En otro caso, la separación se lleva a cabo eliminando en primer lugar el exceso de POCl_3 a vacío y destilando a continuación el diclorofosforamidato a presión reducida.

25 En un caso, el profármaco alquilante de fosforamidato de la etapa (c) se separa del resto de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice. En un caso, la base empleada en la etapa (b) es una amina terciaria. Las aminas terciarias adecuadas empleadas en la etapa (b) incluyen trialquilaminas, tales como, trietilamina o diisopropiletilamina. En un caso, el disolvente empleado en la etapa (b) es tetrahidrofurano (THF) o dioxano.

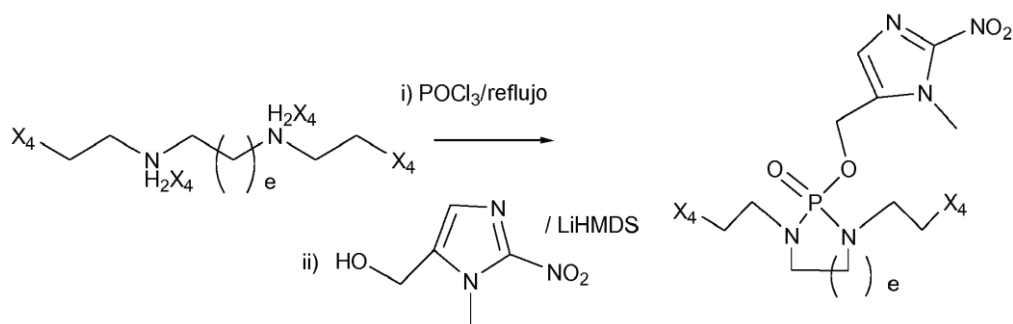
30 En un caso, el monoclorofosforamidato intermedio de la etapa (b) se separa del resto de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice antes de someterlo a la reacción de la etapa (c). En un caso, la base útil en la etapa (c) es hexaalquildisilazida de litio, sodio, o potasio; hidruro de sodio o potasio; o diisopropilamido de litio. En un caso, el disolvente empleado en la etapa (c) es dimetoxietano, diglima, éter dietílico, o THF.

35 En un caso, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un profármaco alquilante de fosforamidato que comprende las etapas de:

- 40 (a) hacer reaccionar en un disolvente aproximadamente 1 equivalente de cada uno de POCl_3 , un Disparador-OH, y una base para producir un intermedio diclorofosfato; y
- (b) hacer reaccionar el diclorofosfato intermedio en la etapa (a) con una sal de N-2-haloetil-N-(R_{13})amonio, en donde R_{13} es hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, heteroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, heterociclilo, arilo, heteroarilo, y una base en un disolvente para producir el profármaco alquilante de fosforamidato.

45 En un caso, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo a temperaturas por debajo de 0°C . En otra realización, la etapa (b) se realiza a una temperatura de 20 a 100°C mayor que la temperatura de la etapa (a).

En otro caso, la presente descripción proporciona un método para sintetizar profármacos alquilantes de fosforamidato heterocíclicos de la presente invención como se muestra a continuación:

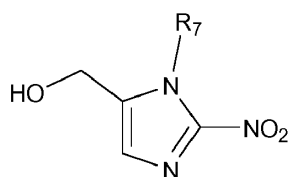


en donde X₄ = Br o Cl; e = 1-3

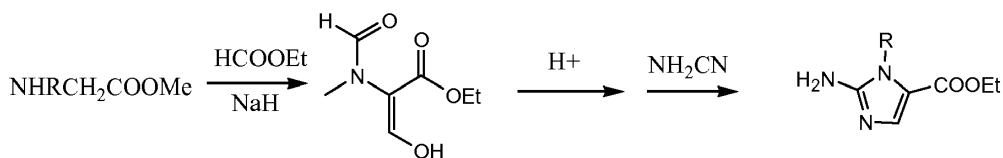
5 En un caso, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un profármaco alquilante de fosforamidato que comprende las etapas de:

- (a) hacer reaccionar PCl₃ con una sal de N, N-di(2-haloetil)amonio y una base en un disolvente para proporcionar un derivado de monoclorofosfamida;
- 10 (b) hacer reaccionar el derivado de monoclorofosfamida con un Disparador-OH para proporcionar un producto intermedio; y
- (c) oxidar el intermedio de la etapa (b) para producir el profármaco alquilante de fosforamidato.

15 En un caso, la base utilizada en la etapa (b) es trietilamina. En otro caso, el disolvente utilizado en la etapa (c) es dimetoxietano, diglima, o un acetato de alquilo C₁-C₆. En otro caso, el Disparador-OH en la etapa (c) es



20 Se pueden sintetizar diversos 1-N-alquil-2-aminoimidazol-5-carboxilatos como se describe esquemáticamente a continuación:



25 Los 1-N-alquil-2-aminoimidazol-5-carboxilatos se pueden reducir para producir diversos derivados de 1-N-alquil-2-amino-5-hidroximetilimidazol empleados en la presente descripción como grupo Z₃ biorreductor.

30 La síntesis de grupos biorreductores y profármacos alquilantes de fosforamidato, y los métodos de la presente descripción se pueden adaptar de las referencias Matteucci et al., Publicación de la Solicitud PCT Núm. WO 04/009667, y profármacos activados por hipoxia Solicitud de Patente de Estados Unidos titulada "Hypoxia Activated anti-Cancer Agents" de Groot et al., 2001, Current Med. Chem. 8:1093-1122; Denny et al., Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.750.782; 5.780.585; 5.872.129; y 6.251.933; Davis et al., Publicación de la Solicitud PCT Núm. WO 04/85421 y WO 04/85361; y Lin et al., Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/254103 y 2005/043244, y Borch et al. (*supra*).

35 Los ejemplos de los métodos para sintetizar los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención se proporcionan con más detalle en la sección de "EJEMPLOS" de más abajo.

Illa. Tratamientos

40 En una realización, la presente invención proporciona el profármaco alquilante de fosforamidato para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un paciente que necesite terapia mediante la administración al paciente del profármaco.

La terapia contra el cáncer con agentes alquilantes puede conducir al desarrollo de cánceres que sean resistentes a estos agentes alquilantes. Los agentes alquilantes pueden destruir células cancerosas en la región cancerosa que se divide más rápidamente o que contiene la concentración más alta de oxígeno en comparación con las células cancerosas de la región cancerosa hipóxica de crecimiento más lento. Las últimas células sobreviven al tratamiento con agentes alquilantes y pueden producir células resistentes a tales alquilantes. Se postula que el aumento de actividad de la guanina-O⁶-alquiltransferasa, glutatióna, glutatióna transferasas, la ruta de reparación de la escisión de nucleótidos, y/o las proteínas de reparación de emparejamientos erróneos, y la disminución de la penetración de fármacos transportados activamente tales como mecloretamina y melfalán, son responsables de la resistencia del cáncer a los alquilantes (*por ejemplo, véase, Hardman et al., páginas 1393 y 1433, más arriba*).

Los profármacos de la presente invención son eficaces en el tratamiento de cánceres resistentes a otras terapias. Las células cancerosas que se dividen lentamente en la zona cancerosa hipóxica actúan como fuente de células y cepas cancerosas resistentes y son destruidas por los profármacos de la presente invención. En una realización, la presente descripción proporciona los compuestos para su uso en un método para el tratamiento de un cáncer resistente al tratamiento mediante la administración de los compuestos solos o combinados con otro agente anticanceroso. En una descripción, un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención se administra combinado con un fármaco que no tiene sustancialmente nefrotoxicidad. En un caso el profármaco alquilante de fosforamidato se administra con carboplatino.

En un caso, la presente descripción proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato que no presentan resistencia cruzada con alquilantes conocidos. En otro caso, la presente descripción proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato que no presentan resistencia cruzada con los alquilantes ciclofosfamida, ifosfamida, glufosfamida, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, dacarbazina, temozolomida, carmustina, estreptoizocina, bendamustina, busulfán, tiotepa, cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración como terapia de primera línea de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de un cáncer metastásico mediante la administración como terapia de primera línea de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos. En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración como terapia de segunda línea de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos. En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración como terapia de tercera línea de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos. En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración como terapia de radiación de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos. En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer, habiendo vuelto a aparecer el cáncer después de quimioterapia, cirugía, radiación previas o cualquier combinación de ellas, mediante la administración de los compuestos de la presente invención solos o combinados con otros agentes anticancerosos.

En los métodos para el tratamiento del cáncer proporcionados por la presente descripción, se administra al sujeto una cantidad eficaz de profármaco alquilante de fosforamidato. Generalmente, el sujeto puede ser cualquier mamífero humano o no humano. El sujeto preferido es un sujeto humano. Otros sujetos concretos incluyen pero no están limitados a primates no humanos, perros, gatos, animales de granja y caballos. En una versión, el profármaco alquilante de fosforamidato se administra solo. En una versión el profármaco alquilante de fosforamidato se administra combinado con uno o más agentes anticancerosos adicionales. En una versión el profármaco alquilante de fosforamidato se administra junto con un tratamiento terapéutico del cáncer, incluyendo pero no limitado a cirugía y radiación. El profármaco alquilante de fosforamidato se administrará típicamente en una composición farmacéutica. Diversas composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar se describen en la sección de Formulaciones más abajo.

Los profármacos alquilantes de fosforamidato y sus composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para tratar cualquier tipo de cáncer en un sujeto, particularmente en un sujeto humano. Los cánceres que se pueden tratar incluyen pero no están limitados a leucemia, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, cáncer de vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, suprarrenal, tejido neural, cabeza y cuello, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulceroso y papilar, carcinoma de piel metastásico, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células del retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de pulmón de células pequeñas, cálculos biliares, tumores celulares de los islotes, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuroma mucoso, ganglioneuromas intestinales, tumor hiperplásico del nervio de la córnea, tumor habitus marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor leiomiomatoso, displasia cervical y carcinoma in situ, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejido blando, carcinoide maligno, lesión cutánea tóxica, micosis fungoide, rabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi,

sarcoma osteogénico y otros sarcomas, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, y carcinomas epidermoides.

5 El profármaco alquilante de fosforamidato se puede utilizar particularmente en el tratamiento del cánceres que contienen zonas significativas de tejido hipóxico. Tales cánceres incluyen pero no están limitados a cáncer de pulmón, especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y cáncer de próstata. Los ejemplos de los tipos del cánceres que se pueden tratar con los profármacos alquilantes de fosforamidato de la invención se proporcionan en las siguientes referencias: Tidmarsh *et al.*, Solicitud de patente PCT Núm. PCT/US2005/047314 presentada el 22 de Diciembre de 2005; Solicitud de Patente PCT titulada "Glufosfamide combination therapy", Núm. de expediente del Agente 021305-005900PC; y Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 60/760.599 y 60/719.787 y Publicación de Patente PCT Núm. WO 2005/076888. Algunos de estos cánceres se comentan con fines ilustrativos más abajo. Los expertos en la técnica apreciarán que la quimioterapia del cáncer implica a menudo la administración simultánea o sucesiva de una variedad de agentes anticancerosos, y como se comenta adicionalmente más abajo, se puede utilizar un profármaco alquilante de fosforamidato en terapias combinadas proporcionadas por medio de los métodos descritos en la presente memoria. De este modo, en la descripción de los cánceres ilustrativos que contienen regiones hipóxicas susceptibles al tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato, también se describen los ejemplos de las terapias combinadas.

20 El cáncer de pulmón afecta a más de 100.000 varones y 50.000 mujeres en los Estados Unidos, la mayoría de los cuales fallece en el plazo de 1 año desde el diagnóstico, haciéndolo la causa principal de muerte por cáncer. Los protocolos actuales para el tratamiento del cáncer de pulmón implican la integración de quimioterapia con o sin radioterapia o cirugía. Se puede utilizar un profármaco alquilante de fosforamidato como agente único o combinado con las terapias combinadas existentes. Se ha informado sobre una variedad de regímenes de quimioterapia combinados para el cáncer de pulmón de células pequeñas, incluyendo las combinaciones que consisten en ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina (CAV); etopósido y cisplatino (VP-16); y ciclofosfamida, doxorubicina y VP-16 (CAVP-16). Se ha informado de beneficios de supervivencia modestos a partir de la combinación de tratamiento con quimioterapia (etopósido más cisplatino) para el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

30 Asimismo, varios fármacos citotóxicos diferentes han producido al menos la regresión temporal del cáncer de ovario. Los fármacos más activos en el tratamiento del cáncer de ovario han sido los agentes alquilantes, incluyendo ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, tiotepa, cisplatino, y carboplatino. Las terapias combinadas actuales para el cáncer de ovario incluyen cisplatino o carboplatino combinados con ciclofosfamida a intervalos de 3 a 4 semanas durante seis a ocho ciclos. Los compuestos y los métodos descritos en la presente memoria proporcionan formas de profármacos y métodos para el tratamiento del cáncer de ovario en el que un profármaco alquilante de fosforamidato como el descrito en la presente memoria se utiliza como un solo agente o en tal terapia combinada existente, o bien para reemplazar a un agente o además del agente o los agentes utilizados actualmente.

40 El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común en hombres en los Estados Unidos y es la segunda causa más común de muerte por cáncer en hombres por encima de 55 años de edad, y se ha informado que este cáncer consiste principalmente en tejido hipóxico. Se ha informado sobre diversos protocolos de quimioterapia para su uso en la fase de enfermedad tardía después de la recaída tras el tratamiento hormonal. Los agentes para el tratamiento del cáncer de próstata incluyen los alquilantes fosfato de estramustina, prednimustina, y cisplatino. La quimioterapia combinada también se utiliza para tratar el cáncer de próstata, incluyendo el tratamiento con fosfato de estramustina más prednimustina y cisplatino, y 5-fluorouracilo, melfalán, e hidroxiaurea. La presente descripción proporciona métodos para el tratamiento del cáncer de próstata en los que se utiliza un profármaco alquilante de fosforamidato de la presente invención en tales combinaciones, o bien para reemplazar un agente o además del agente o los agentes utilizados actualmente.

50 El cáncer de intestino grueso es la segunda causa de muerte por cáncer más común en los Estados Unidos y es asimismo un cáncer caracterizado por regiones hipóxicas. Si bien se ha demostrado que la quimioterapia en pacientes con cáncer colorrectal avanzado tiene solo un beneficio marginal, el 5-fluorouracilo es el tratamiento más eficaz para esta enfermedad. El 5-fluorouracilo es útil solo o combinado con otros fármacos, pero está asociado solo con 15 a 20 por ciento de probabilidad de reducir las masas de tumor medibles en 50 por ciento o más. Utilizando 5-FU combinado con los compuestos y los métodos descritos en la presente memoria, y los métodos para el tratamiento del cáncer de colon utilizando un profármaco, se puede ofrecer un beneficio terapéutico significativo y el potencial para atender la necesidad no satisfecha de mejores métodos del tratamiento para esta enfermedad.

60 En una versión de los métodos de tratamiento, se puede utilizar un profármaco alquilante de fosforamidato en diversos enfoques conocidos para la terapia contra el cáncer incluyendo pero no limitados a "terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos" (ADEPT), "terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por virus (VDEPT)", "terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por genes" (GDEPT), y "terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por bacterias" (BDEPT). Los usos generales de un profármaco alquilante de fosforamidato no están limitados a los métodos de tratamiento anteriores.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas no cancerosas caracterizado por hiperproliferación celular (p. ej., un aumento anormal de velocidad o cantidad de proliferación celular). En un aspecto, la enfermedad hiperproliferativa tratada de acuerdo con el presente método se selecciona del grupo que consiste en angiitis alérgica y granulomatosis (enfermedad de Churg-Strauss), asbestosis, asma, gastritis atrófica, hiperplasia prostática benigna, penfigoide ampolloso, enfermedad celíaca, bronquitis crónica y enfermedad respiratoria obstructiva crónica, sinusitis crónica, enfermedad de Crohn, neuropatías desmielinizantes, dermatomiositis, eczema incluyendo dermatitis atópica, enfermedades de la trompa de eustaquio, arteritis de células gigantes, rechazo de injertos, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis por hipersensibilidad (púrpura de Henoch-Schonlein), dermatitis irritante, anemia hemolítica inflamatoria, neutropenia inflamatoria, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, miocarditis, miositis, pólipos nasales, enfermedades del conducto nasolacrimal, vasculitis neoplásica, pancreatitis, pénfigo vulgar, glomerulonefritis primaria, psoriasis, enfermedad periodontal, enfermedad renal poliquística, poliarteritis nodosa, síndrome de solapamiento de la poliangitis, colangitis esclerosante primaria, artritis reumatoide, enfermedad del suero, adherencias quirúrgicas, estenosis o restenosis, escleritis, esclerodermia, estenosis de los conductos biliares, estenosis (de duodeno, intestino delgado, y colon), silicosis y otras formas de neumoconiosis, diabetes de tipo I, colitis ulcerosa, proctitis ulcerosa, vasculitis asociada con trastornos del tejido conectivo, vasculitis asociada con deficiencias congénitas del sistema del complemento, vasculitis del sistema nervioso central, y granulomatosis de Wegener.

En algunos casos de la descripción, un compuesto de la presente invención se administra para tratar una enfermedad hiperproliferativa seleccionada del grupo que consiste en psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, restenosis, e hiperplasia prostática benigna. En una realización, la enfermedad hiperproliferativa tratada es la psoriasis, una enfermedad caracterizada por la hiperproliferación celular de queratinocitos que crecen sobre la piel para formar lesiones escamosas, elevadas. En otro caso, la enfermedad hiperproliferativa tratada es la esclerosis múltiple, una enfermedad caracterizada por desmielinización progresiva en el cerebro. En otro aspecto, la enfermedad hiperproliferativa tratada es la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria recurrente, crónica, multisistémica que puede conducir a la destrucción y anquilosis de las articulaciones afectadas. En otro caso, los compuestos de la presente invención se administran para prevenir una enfermedad hiperproliferativa resultante de la proliferación celular en una prótesis implantada en un sujeto recubriendo la prótesis con una composición que contiene un compuesto de la presente invención. En otro caso, la enfermedad hiperproliferativa tratada es la hiperplasia prostática benigna, una enfermedad en la que las células epiteliales de la próstata crecen anormalmente y de ese modo bloquean el flujo urinario.

IIIb. Formulaciones, modos de administración, dosificaciones

Un profármaco alquilante de fosforamidato se formulará típicamente en forma de formulaciones farmacéuticas para su administración a un sujeto. En esta sección se describen los modos de administración, formulaciones, y dosificaciones que se pueden utilizar cuando se tratan cánceres utilizando un profármaco alquilante de fosforamidato descrito en la presente memoria.

La administración de un profármaco alquilante de fosforamidato para el tratamiento del cáncer se puede efectuar por medio de cualquier método que posibilite la liberación de los profármacos en el sitio de acción, la región hipóxica de un tumor. Muchos fármacos contra el cáncer se administran mediante inyección intravenosa, y un profármaco alquilante de fosforamidato se puede formular para tal administración, incluyendo no solo formulaciones listas para su inyección sino también formulaciones liofilizadas o concentradas que se deben rehidratar o diluir, respectivamente, antes de su inyección. Además de estas formulaciones, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede formular para su administración por medio de las rutas orales, rutas intraduodenales, inyección parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o infusión), rutas tópica, y rectal. Los expertos en la técnica advertirán que un profármaco alquilante de fosforamidato puede ser activado por bacterias en el intestino. Si no se desea tal activación, el médico puede emplear una ruta de administración o una formulación que de como resultado la absorción de un profármaco alquilante de fosforamidato antes de que entre en el intestino grueso o el colon. La ruta de administración efectiva y la formulación correspondiente del profármaco alquilante de fosforamidato dependerá del tipo de cáncer que esté siendo tratado, el profármaco alquilante de fosforamidato seleccionado para su administración, la gravedad del cáncer, y la edad, el peso, y el estado del paciente, entre otros factores.

La cantidad administrada de un profármaco alquilante de fosforamidato, y por tanto la cantidad del profármaco alquilante de fosforamidato contenido en la dosis administrada y el producto que comprende esa dosis, dependerá del sujeto que esté siendo tratado, la gravedad del cáncer, la localización del cáncer, la tasa de administración, la disposición del profármaco (p. ej., peso molecular, solubilidad y citotoxicidad hipóxica y normóxica), el agente citotóxico liberado por un profármaco alquilante de fosforamidato, y la consideración del médico a cargo.

En una realización aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratamiento del cáncer en un paciente donde una dosificación eficaz se encuentra típicamente en el intervalo de alrededor de 0,001 a alrededor de 0,1 g por kg de peso corporal, o de alrededor de 0,1 a alrededor de 35 mg/kg/día en una sola dosis o en dosis divididas. Para un ser humano de 70 kg, ésta ascendería de alrededor de 0,05 a alrededor de 7 g/día, de alrededor de 0,2 a

alrededor de 2,5 g/día. En algunos casos, pueden ser más adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente mencionado, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario nocivo; las dosis mayores se pueden dividir también en varias dosis más pequeñas para su administración a lo largo del día mediante infusión durante una hora o continuamente utilizando catéteres centrales de inserción periférica (línea PICC) y bolsas y bombas intravenosas portátiles.

En un caso, la dosis eficaz de un compuesto de la presente descripción para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas se encuentra en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 35 mg/kg/día; de alrededor de 0,5 a alrededor de 20 mg/kg/día; de alrededor de 0,5 a alrededor de 15 mg/kg/día; de alrededor de 0,5 a alrededor de 10 mg/kg/día; de alrededor de 0,5 a alrededor de 8 mg/kg/día; y de alrededor de 1 a alrededor de 5 mg/kg/día en una sola dosis o en dosis divididas. En un caso, la dosis eficaz de un compuesto de la presente invención para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas se encuentra en el intervalo de alrededor de 2 a alrededor de 8 mg/kg/día; de alrededor de 2 a alrededor de 4 mg/kg/día; y alrededor de 2 mg/kg/día en una sola dosis o en dosis divididas. En un aspecto, la dosis eficaz de un compuesto de la presente invención para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas se encuentra en el intervalo de alrededor de 0,25 a alrededor de 2,5 mg/kg/día; de alrededor de 0,25 a alrededor de 1 mg/kg/día; y de alrededor de 0,25 a alrededor de 0,5 mg/kg/día en una sola dosis o en dosis divididas. En un aspecto, la dosis se administra i.v. diariamente, o bien como monoterapia (compuesto de la presente invención solo) o junto (combinada) con terapias asistenciales convencionales. En un aspecto, la dosis eficaz para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas se encuentra en el intervalo descrito antes administrada una vez a la semana.

En un caso, se administra una dosis mayor intermitentemente (menos frecuentemente); una dosis en el intervalo de alrededor de 3 a alrededor de 20 mg/kg; de alrededor de 6 a alrededor de 10 mg/kg; o 8 mg/kg una vez cada tres días durante dos semanas. En otro aspecto, se administra una dosis en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 30 mg/kg; de alrededor de 10 a alrededor de 15 mg/kg; o 12,5 mg/kg del profármaco alquilante de fosforamidato una vez a la semana durante cuatro semanas. En un aspecto, se administra una dosis en el intervalo de alrededor de 0,5 a alrededor de 8 mg/kg/día durante 5 días a lo largo de ciclos de dos semanas.

En otro caso, para el tratamiento de pacientes humanos, la dosis diaria máxima de un profármaco alquilante de fosforamidato no es superior a 500 mg/kg de peso del paciente y, por lo tanto, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra a una dosis diaria en el intervalo de alrededor de 1 mg de un profármaco alquilante de fosforamidato/kg de peso del paciente a alrededor de 500 mg de un profármaco alquilante de fosforamidato/kg de peso del paciente. En un caso, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra a una dosis diaria en el intervalo de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 500 mg/kg de peso corporal del paciente que se vaya a tratar. En otro caso, la dosis terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato es de alrededor de 10 mg/kg a alrededor de 250 mg/kg de peso corporal del paciente que se vaya a tratar. En otro caso, la dosis terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato es de alrededor de 25 mg/kg a alrededor de 150 mg/kg de peso corporal del paciente que se vaya a tratar. En otro caso, la dosis terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato es de alrededor de 25 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal del paciente que se vaya a tratar. En otro caso, la dosis terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato es de alrededor de 1,25 mg/kg a alrededor de 12,5 mg/kg de peso corporal del paciente que se vaya a tratar.

También se pueden proporcionar las pautas concernientes a la administración por medio y a partir de estudios en seres humanos y otros animales mamíferos. La dosis terapéuticamente eficaz determinada para un animal se puede convertir en la dosis correspondiente en seres humanos (HED) como se describe en la tabla de más abajo:

Animal	Factor de conversión de la Dosis Equivalente en Seres Humanos (HED) ^a
Ratón	12,3
Hámster	7,4
Rata	6,2
Hurón	5,3
Cobaya	4,6
Microcerdo	1,4
Minicerdo	1,1
Conejo	3,1
Perro	1,8

Animal	Factor de conversión de la Dosis Equivalente en Seres Humanos (HED) ^a
Monos ^b	3,1
Tití	6,2
Mono ardilla	5,3
Babuino	1,8

^aPara convertir la dosis para animal en mg/kg en HED (se supone un ser humano de 60 kg) en mg/kg, dividir la dosis para el animal por el factor de conversión de HED. Para especies no enumeradas o para pesos fuera de los intervalos convencionales, la dosis equivalente en humanos (HED) se puede calcular a partir de la fórmula:

HED = dosis para animal en mg/kg x (peso del animal en kg/peso del ser humano en kg)^{0,33}.

5 ^b Por ejemplo, cinomolgus, rhesus, o macacos cola de muñón.

Para lograr la eficacia terapéutica, la dosis diaria terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato se administra usualmente múltiples veces al paciente. En un caso, se administra diariamente un profármaco alquilante de fosforamidato durante un período de tiempo. Típicamente, se empleará una administración diaria durante al menos 3 días consecutivos. En los casos relacionados, la administración es durante al menos 5 días consecutivos, al menos 7 días consecutivos, o al menos 10 días consecutivos. Dependiendo de la dosis, la formulación, y la ruta de administración seleccionada por el médico y la conveniencia del paciente, la dosis diaria completa se puede administrar una vez al día, o la dosis diaria se puede administrar en dosis más pequeñas múltiples en el curso de un día (incluyendo mediante infusión con una bomba o administración intravenosa). Por ejemplo, la dosis se puede dividir en dosis más pequeñas y administrarla dos veces al día, o dividir en tres dosis más pequeñas y administrarla tres veces al día. Resultará evidente para un experto en la técnica del tratamiento del cáncer que, según se utiliza en la presente memoria, administración "diaria" no está limitada a una administración por día sino que puede incluir administraciones múltiples.

20 También se pueden utilizar programas de administración distintos de la administración en días consecutivos. Es particularmente conveniente la administración en días alternos (qod), y puede ser apropiada en algunos casos la administración una vez cada tres días, o una vez a la semana, pero en cualquier caso, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra repetidamente a lo largo de un período de tiempo. Por ejemplo, ya sea administración diaria (incluyendo, según se observe, una dosis diaria dividida), en días alternos, o menos frecuentemente, en una realización un profármaco alquilante de fosforamidato se administra al menos 2 días por semana durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas consecutivas, o, alternativamente, durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas en un período de seis meses, o, alternativamente, durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas en un período de doce meses. En un caso, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra al menos 3 días por semana durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas consecutivas, o, alternativamente, durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas en un período de seis meses, o, alternativamente, durante al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis semanas en un período de doce meses. En un caso un profármaco alquilante de fosforamidato se administra al menos 10 días al mes, opcionalmente al menos 20 días al mes, durante al menos un mes o al menos dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis meses consecutivos, o, alternativamente, al menos un, dos, tres, cuatro, cinco o al menos seis meses en un período de seis meses.

En un caso, la administración de la dosis terapéuticamente eficaz continúa durante múltiples días, típicamente durante al menos tres días consecutivos, y con frecuencia durante al menos cinco a diez días consecutivos, o durante una semana, o varias semanas o más. De este modo, se puede administrar a un paciente un profármaco alquilante de fosforamidato de acuerdo con los presentes métodos durante varios días, una semana, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, o un año o más.

Coincidiendo con los regímenes de administración de otros agentes anticancerosos, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar en múltiple "tandas" de administración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar una vez al día durante al menos tres a diez, o al menos cinco a diez días consecutivos, y tales tres a diez o cinco a diez días de tratamiento se pueden repetir una vez, dos veces, o tres o más veces, a veces con un período sin tratamiento (con un profármaco alquilante de fosforamidato) que oscila de una a varias semanas entre cada tratamiento de varios días. De un modo similar, en algunos casos, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra en días alternos durante dos a diez administraciones, más a menudo de tres a diez administraciones, o cinco a diez administraciones, y tales dos, tres o cinco a diez administraciones qod se pueden repetir una vez, dos veces, o tres o más veces con un período sin tratamiento (con un profármaco alquilante de fosforamidato) que oscila de una a varias semanas entre cada tratamiento de varios días. Otros programas de tandas múltiples de administración resultarán evidentes para el médico experto guiado por esta descripción.

En un aspecto, "administrar una dosis o régimen terapéuticamente eficaz de un profármaco alquilante de fosforamidato" hace referencia a (i) administrar un profármaco alquilante de fosforamidato en los intervalos establecidos (p. ej., 1 mg a 1 g de un profármaco alquilante de fosforamidato por kg de peso del paciente, típicamente de 25 a 150 mg de un profármaco alquilante de fosforamidato por kg de peso del paciente) durante un número de días mínimo especificado en un período de tiempo especificado, donde la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato tiene un efecto terapéutico sobre el cáncer en el paciente. Los regímenes de dosificación eficaces terapéuticamente ilustrativos para un profármaco alquilante de fosforamidato incluyen los descritos en la presente memoria, tal como la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato durante 3 días consecutivos, 5 días consecutivos, 7 días consecutivos, 10 días consecutivos, al menos 3 días por semana, al menos 3 días por semana durante un mes, al menos 10 días al mes, y al menos 20 días al mes.

Al optimizar un régimen tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato de acuerdo con la presente invención, la dosis y frecuencia de administración de un profármaco alquilante de fosforamidato se puede seleccionar para lograr un área sostenida máxima bajo la curva de concentración de plasma (AUC) en el curso del tratamiento. El régimen de dosificación teóricamente óptimo dará como resultado una exposición máxima de las células tumorales a un profármaco alquilante de fosforamidato, según se mide por medio de la AUC, a la vez que se minimiza la concentración máxima en plasma (C_{max}) para cualquier administración individual. Una C_{max} mayor contribuirá a la toxicidad mientras que la AUC determinará la eficacia. Según se entiende en la técnica para otros fármacos terapéuticos para el cáncer, el tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato se puede suspender temporalmente si se observa toxicidad, o por conveniencia para el paciente, sin apartarse del alcance de la invención, y se reanuda a continuación.

En un caso, la farmacocinética del profármaco alquilante de fosforamidato de la presente invención empleado para el tratamiento del cáncer puede determinar la dosis, el método de administración, y la clase de cáncer que se trata con el profármaco alquilante de fosforamidato. En un caso, el profármaco alquilante de fosforamidato de la presente invención puede tener una vida media *in vivo* de entre 1 y 300 minutos. En un caso, los compuestos de la presente invención pueden tener una vida media *in vivo* de entre 3 y 10 minutos. En un caso, los compuestos de la presente invención pueden tener una vida media *in vivo* de entre 10 y 30 minutos. Una vida media corta del profármaco alquilante de fosforamidato puede requerir un tiempo de infusión en tratamiento que es mayor que el requerido para un profármaco alquilante de fosforamidato que tiene una vida media más larga. Una vida media corta del profármaco alquilante de fosforamidato puede aumentar la dosis tolerada máxima (DTM) para ese profármaco.

En otro caso, la presente descripción proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato que permanecen sin cambios en 20% cuando se incuban con proteína microsomal de hígado de ratón durante 30 minutos. En otro caso, la presente invención proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato que permanecen sin cambios en 20-80% cuando se incuban con proteína microsomal de hígado de ratón durante 30 minutos. En otro caso, la presente invención proporciona profármacos alquilantes de fosforamidato que permanecen sin cambios en más de 80% cuando se incuban con proteína microsomal de hígado de ratón (MLM) durante 30 minutos. En otro caso, los ejemplos de los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención que cuando se incuban con proteína microsomal de hígado de ratón 30 minutos permanecen sin cambios en más de 80% incluyen 1, 25, y 36. A mayor estabilidad en MLM de un profármaco de la invención, menores serán su dosis terapéuticamente eficaz y los efectos secundarios no deseados para el paciente.

En un caso, el grupo biorreductor de los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención después de la reducción/activación en una zona hipóxica del tumor forma un producto conjugado de alquilante de fosforamidato- T_M . El producto conjugado de alquilante de fosforamidato- T_M puede difundirse y alcanzar otras partes del tumor o de otros tumores en el caso de una enfermedad metastásica. Diversos parámetros farmacocinéticos tales como el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), el aclaramiento (CL), el área bajo la curva (AUC), la estabilidad microsomal en hígado de ratón (estabilidad MLM), la estabilidad en plasma, y la C_{max} de los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención se midieron y enumeraron en la sección de EJEMPLOS (véase también Hardman *et al.*, *supra*).

En los regímenes de re-tratamiento, la dosis se puede ajustar para reflejar la tolerancia del paciente al tratamiento anterior. En cualquier caso, puesto que se observa toxicidad durante la administración repetida, la dosificación se puede detener temporalmente a medida que se observen síntomas graves. El periodo de interrupción temporal de la administración (vacaciones del medicamento) puede finalizar en el momento en el que el primer órgano de toxicidad ya no contiene concentraciones significativas de un profármaco alquilante de fosforamidato o un alquilante de fosforamidato liberado allí (que se puede medir o determinar indirectamente mediante el cese de los síntomas). Por lo tanto, se puede definir un período de dosificación intermitente no solo por los días específicos sino individualizado por las vacaciones de medicamento que están basados en los síntomas y el aclaramiento normal en el órgano de un profármaco alquilante de fosforamidato o un alquilante de fosforamidato liberado allí.

Una formulación de un profármaco alquilante de fosforamidato puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para su administración oral en forma de comprimido, cápsula, píldora, polvo, formulación de liberación sostenida,

solución, y suspensión; para su inyección parenteral en forma de una solución, suspensión o emulsión estéril; para su administración tópica en forma de una pomada o crema; y para su administración rectal en forma de un supositorio. Una formulación de un profármaco alquilante de fosforamidato puede estar en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración individual de dosificaciones precisas e incluirá típicamente un portador o excipiente farmacéutico convencional.

Los portadores farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes o cargas inertes, agua y diversos disolventes orgánicos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener, si se desea, ingredientes adicionales tales como aromas, aglutinantes, excipientes, y similares. De este modo para su administración oral, se pueden emplear comprimidos que contienen diversos excipientes, tales como ácido cítrico junto con diversos disgregantes, tales como almidón, ácido algínico, y ciertos silicatos complejos, y con agentes aglutinantes tales como sacarosa, gelatina y acacia. Adicionalmente, se pueden utilizar agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, y talco para preparar las formas en comprimido de las formulaciones de un profármaco alquilante de fosforamidato descritas en la presente memoria. Se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar en cápsulas de gelatina dura y blanda cargadas. Las sustancias preferidas, por lo tanto, incluyen lactosa o galactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas o elixires para su administración oral, el profármaco se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materias colorantes o tintes y, si se desea, agentes emulsionantes o agentes suspensores, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina, o combinaciones de los mismos.

Las formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones de un profármaco alquilante de fosforamidato en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, polietilenglicoles acuosos, propilenglicol o soluciones de dextrosa. Tales formas de dosificación se pueden tamponar adecuadamente, si se desea.

Los métodos para preparar diversas composiciones farmacéuticas con una cantidad específica de fármaco activo son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica a la vista de esta descripción. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17^a Edición (1984).

Los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento del cáncer son eficaces para destruir las células cancerosas más difíciles de eliminar que crecen en la región hipóxica de un tumor. Una vez liberado en la región hipóxica un profármaco de fosforamidato puede difundirse desde las células hipóxicas y destruir las células cancerosas en regiones adyacentes que contienen poblaciones crecientes de células que se dividen rápidamente. La región hipóxica actúa como una fábrica de fármaco para producir en el interior de un tumor un alquilante para destruir las células cancerosas normóxicas adyacentes conduciendo a una mayor concentración del alquilante de fosforamidato dentro del tumor, con respecto a los tejidos normales. El uso del profármaco para generar el alquilante de fosforamidato dentro del tumor puede reducir los efectos secundarios tóxicos que aparecen debido a la toxicidad celular normal. Después de destruir las células cancerosas en la región normóxica del tumor, una región hipóxica se puede volver normóxica y comenzar a dividirse. En este momento, tales células pueden ser destruidas por los alquilantes de fosforamidato generados a partir de un profármaco alquilante de fosforamidato de esta invención o los conocidos, o por otros agentes anticancerosos o citotoxinas administrados combinados con el profármaco alquilante de fosforamidato, como se describe en la sección siguiente.

IIIc. Terapias combinadas

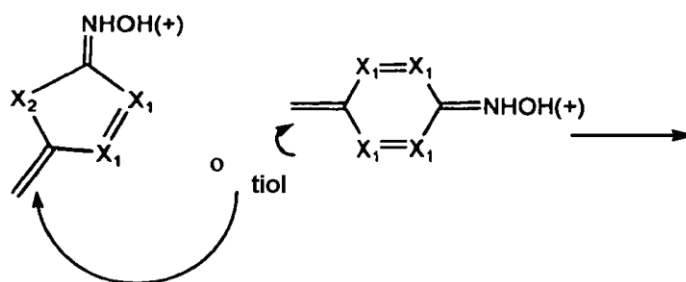
De acuerdo con los métodos de la descripción, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar simultáneamente combinado con otros agentes anticancerosos. Sin pretender estar ligado a ningún mecanismo o efecto concreto, tal administración simultánea puede proporcionar en algunos casos una o más de varias ventajas sobre otras terapias contra el cáncer conocidas, tal como, por ejemplo que la administración simultánea de un profármaco alquilante de fosforamidato y el agente anticanceroso tiene un efecto sinérgico sobre la inducción de la muerte de las células cancerosas. La administración simultánea proporciona un mejor resultado terapéutico que la administración del agente anticanceroso solo, p. ej., mayor alivio o mejora de uno o más síntomas del cáncer, disminución del grado de enfermedad, retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora, paliación o estabilización del estado de enfermedad, remisión parcial o completa, supervivencia prolongada u otros resultados terapéuticos beneficiosos.

La administración simultánea de un profármaco alquilante de fosforamidato aumenta la sensibilidad de células cancerosas al agente anticanceroso, permitiendo dosis menores del agente anticanceroso que se vaya a administrar al paciente o permitiendo el uso de un agente anticanceroso para el tratamiento de células resistentes por lo demás al agente anticanceroso o refractarias por lo demás al tratamiento. Mientras que los agentes anticancerosos conocidos en general se dirigen a las células que se dividen rápidamente en la región normóxica, los profármacos alquilantes de fosforamidato de la invención se dirigen a las células hipóxicas en las regiones de tumores que no son destruidas eficazmente por el agente anticanceroso solo.

Según se utiliza en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se "administra simultáneamente" con otro agente anticanceroso (también referido en la presente memoria como, "Agente") cuando un profármaco alquilante de fosforamidato y el Agente se administran como parte del mismo curso de terapia. En un caso, se administra en primer lugar un profármaco alquilante de fosforamidato antes de la administración del Agente, (es decir, el comienzo de la otra terapia contra el cáncer), y se continúa el tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato a lo largo del curso de administración del Agente (es decir, el curso de la otra terapia). En otro caso, se administra un profármaco alquilante de fosforamidato después del comienzo o finalización de la otra terapia contra el cáncer. En otros casos, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra en primer lugar simultáneamente al inicio de la otra terapia contra el cáncer. Véanse por ejemplo las terapias combinadas descritas en la sección de EJEMPLOS.

En un caso, se administra en primer lugar un profármaco alquilante de fosforamidato antes de la administración del Agente, y se continúa el tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato después del cese de la administración del Agente. En un caso, se administra en primer lugar un profármaco alquilante de fosforamidato antes de la administración del Agente, y se continúa el tratamiento con un profármaco alquilante de fosforamidato durante parte del período de administración del Agente. Para ciertos fármacos, tales como ciertos inhibidores de topoisomerasa, se puede iniciar la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato y completar antes de la administración del segundo fármaco.

En presencia de oxígeno, el anión radical formado después de la reducción de Z_3 reacciona con oxígeno para producir superóxido y Z_3 . Superóxido es una citotoxina y la producción de superóxido en tejidos normóxicos puede conducir a efectos secundarios no deseados. En un caso, la presente descripción proporciona un profármaco alquilante de fosforamidato administrado combinado con un agente quimioprotector o protector químico. Los agentes quimioprotectores protegen el tejido sano de los efectos tóxicos de los fármacos anticancerosos. En un caso, el agente quimioprotector es un tiol o un disulfuro. En un caso, el protector químico puede reducir superóxidos. En otro aspecto, el protector químico puede reaccionar con el "receptor de Michael" generado a partir de un profármaco alquilante de fosforamidato y evitar que el "receptor de Michael" reaccione con proteínas y ácidos nucleicos (véase más abajo).



La terapia con fármacos anticancerosos implica en la actualidad típicamente rondas, o "ciclos" múltiples de administración del agente o los agentes anticancerosos. En el contexto de la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato, cada ciclo de administración (así como una serie completa de ciclos) se puede considerar como la administración de un segundo fármaco. Un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar en cualquiera o en todos los múltiples ciclos de tratamiento con el otro Agente; en general, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra en una base diaria durante al menos dos o más días durante cada ciclo. En un aspecto de la descripción, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con el Agente de acuerdo con un programa repetido en cada ronda.

En una versión del profármaco alquilante de fosforamidato para su uso en un método para el tratamiento del cáncer, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra combinado con una cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos, una cantidad eficaz de radioterapia, un procedimiento de cirugía apropiado, o cualquier combinación de tales terapias adicionales.

Cuando un profármaco alquilante de fosforamidato se utiliza combinado con una o más de las terapias adicionales, un profármaco alquilante de fosforamidato y la terapia adicional se pueden administrar al mismo tiempo o se pueden administrar separadamente. Por ejemplo, si un profármaco alquilante de fosforamidato se administra con un agente quimioterapéutico adicional, los dos agentes se pueden administrar simultáneamente o se pueden administrar sucesivamente con algún tiempo entre administraciones. Un experto en la técnica concebirá métodos de administración de los agentes simultáneamente y sucesivamente y los posibles periodos de tiempo entre administraciones. Véanse por ejemplo las terapias combinadas descritas en la sección de EJEMPLOS.

Los Agentes se pueden administrar en forma de la misma formulación o de formulaciones diferentes y se pueden administrar a través de la misma ruta o de diferentes rutas.

Los agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar combinados con el profármaco alquilante de fosforamidato de la invención incluyen, pero no están limitados a, busulfán, improsulfán, pipsulfán, benzodepa, carbocuaona, 2-desoxi-D-glucosa, lonidamina y análogos de los mismos, glufosfamida, gemcitabina, erlotinib, meturedpa, uredepa, altrammina, imatinib, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, trimetilolomelamina, clorambucilo, clomafazina, estramustina, ifosfamida, gefitinib, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, aclacinomicinas, acetato de eliptinio, antramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carrubicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-fluorouracilo, tegafur, L-asparaginasa, pulmozima, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, carboplatino, defofamida, demecolcina, diazicuona, elfornina, acetato de eliptinio, etoglúcido, flutamida, nitrato de galio, hidroxiurea, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, interleuquina-2, lentinano, mitoguazona, mitoxantrona, mopidamol, nitracrina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, sizofirano, espirogermanio, paclitaxel, tamoxifeno, erlotinib, tenipósido, ácido tenuazónico, triazicuona, 2,2',2"-triclorotrietilamina, uretano, vinblastina, ciclofosfamida, y vincristina. Otros agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar incluyen derivados de platino, incluyendo pero no limitado a cisplatino, carboplatino, y oxoplatino.

En una versión, un profármaco alquilante de fosforamidato descrito en la presente memoria se puede utilizar combinado con un inhibidor de la angiogénesis incluyendo pero no limitado a Avastina y agentes terapéuticos similares. En una versión de los métodos de tratamiento combinados, un sujeto se trata con un inhibidor antiangiogénesis y con posterioridad se trata con un profármaco alquilante de fosforamidato. En una versión de los métodos de tratamiento combinados, un sujeto se trata con un inhibidor antiangiogénesis y con posterioridad se trata con un profármaco alquilante de fosforamidato con otro agente quimioterapéutico, incluyendo pero no limitado a Cisplatino, y carboplatino. En una versión de estos métodos de tratamiento combinados que utilizan un inhibidor antiangiogénesis, el método se utiliza para tratar el cáncer de mama.

En otro caso, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra con un agente anticanceroso que actúa, directamente o indirectamente, para inhibir el factor de crecimiento epidérmico o receptor EGFR. Los inhibidores de EGFR adecuados para su administración simultánea con un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención incluyen gefitinib y erlotinib.

En otra versión, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra con un agente anticanceroso que actúa, directamente o indirectamente, para inhibir el factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF1a) o para inhibir una proteína o enzima, tal como el transportador de glucosa o VEGF, cuya expresión o actividad aumenta después de aumentar los niveles de HIF1a. Los inhibidores de HIF1a adecuados para su uso en esta versión de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen inhibidores de la quinasa P13; LY294002; rapamicina; inhibidores de la histona desacetilasa tales como [(E)-(1S,4S,10S,21R)-7-[(Z)-etiliden]-4,21-diisopropil-2-oxa-12,13-ditia-5,8,20,23-tetraazabicyclo-[8,7,6]-tricos-16-eno-3,6,9,19,22-pentanona (FR901228, depsipéptido); inhibidores de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) tales como geldanamicina, 17-alilamino-geldanamicina (17-AAG), y otros análogos de geldanamicina, y radicol y derivados de radicol tales como KF58333; genisteína; indanona; estaurosporina; inhibidores de proteína quinasa-1 (MEK-1) tales como PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona); PX-12 (disulfuro de 1-metilpropil-2-imidazolilo); pleurotina PX-478; 1,4-dioxidos de quinoxalina; butirato de sodio (NaB); nitroprusiato de sodio (SNP) y otros donadores de NO; inhibidores de microtúbulos tales como novobiocina, panzem (2-metoxiestradiol o 2-ME2), vincristinas, taxanos, epotilones, discodermólido, y derivados de cualquiera de los anteriores; cumarinas; barbitúricos y análogos de ácido tiobarbitúrico; camptotecinas; e YC-1, un compuesto descrito en Biochem. Pharmacol., 15 de Abril de 2001, 61(8):947-954, y sus derivados.

En otra versión, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra con un agente anti-angiogénico, incluyendo pero no limitado a agentes anti-angiogénicos seleccionados del grupo que consiste en angiostatina, un agente que inhibe o suscita antagonismo de otro modo sobre la acción de VEGF, batimastat, captopril, inhibidor derivado de cartílago, genisteína, endostatina, interleuquina, lavendustina A, acetato de medroxiprogesterona, factor 4 plaquetario humano recombinante, Taxol, tecogalano, talidomida, trombospondina, TNP-470, y Avastina. Otros inhibidores de la angiogénesis útiles para los fines de las terapias combinadas proporcionadas por los presentes métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen inhibidores de Cox-2 como celecoxib (Celebrex), diclofenaco (Voltaren), etodolaco (Lodina), fenoprofeno (Nalfon), indometacina (Indocina), cetoprofeno (Orudis, Oruvail), cetalac (Toradol), oxaprozina (Daypro), nabumetona (Relafeno), sulindac (Clinoril), tolmetina (Tolectin), rofecoxib (Vioxx), ibuprofeno (Advil), naproxeno (Aleve, Naprosina), aspirina, y acetaminofeno (Tilenol).

Además, puesto que el ácido pirúvico juega un importante papel en la angiogénesis, se pueden utilizar miméticos de piruvato e inhibidores glicolíticos como los halopiruvatos, incluyendo bromopiruvato, combinados con un compuesto

anti-angiogénico y un profármaco alquilante de fosforamidato para tratar el cáncer. En otra versión, se administra un profármaco alquilante de fosforamidato con un agente anti-angiogénico y otros agentes anticancerosos, incluyendo pero no limitados a un agente citotóxico seleccionado del grupo que consiste en alquilantes, Cisplatino, Carboplatino, e inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, para tratar el cáncer.

Además de la combinación de un profármaco alquilante de fosforamidato con los Agentes descritos anteriormente, los presentes métodos y composiciones descritos en la presente memoria proporcionan una variedad de combinaciones sinérgicas de un profármaco alquilante de fosforamidato y otros fármacos anticancerosos. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los fármacos anticancerosos que actúan "sinérgicamente" con un profármaco alquilante de fosforamidato como se ha descrito en la presente memoria. Por ejemplo, las referencias Vendetti, "Relevance of Transplantable Animal-Tumor Systems to the Selection of New Agents for Clinical Trial", Pharmacological Basis of Cancer Chemotherapy, Williams y Wilkins, Baltimore, 1975, y Simpson Herren et al., 1985, "Evaluation of In Vivo Tumor Models for Predicting Clinical Activity for Anticancer Drugs", Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 26: 330 describen métodos para ayudar en la determinación de si dos fármacos actúan sinérgicamente.

Si bien no se requiere sinergia para el beneficio terapéutico de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método de tratamiento del cáncer, donde existe sinergia entre un profármaco alquilante de fosforamidato y otro agente anticanceroso. Se puede decir que dos fármacos poseen sinergia terapéutica si un régimen de dosificación combinado de los dos fármacos produce una destrucción de células tumorales significativamente mejor que la suma de los Agentes individuales a las dosis toleradas óptimas o máximas. El "grado de sinergia" se puede definir como el log neto de la destrucción de células tumorales por el régimen combinado óptimo menos el log neto de la destrucción de células tumorales por la dosis óptima de Agente individual más activo. Diferencias de destrucción celular mayores de diez veces (un log) se consideran indicativas de forma concluyente de sinergia terapéutica.

Cuando un profármaco alquilante de fosforamidato se utiliza con otro agente anticanceroso, un profármaco alquilante de fosforamidato se administrará, al menos en algunas realizaciones, antes del comienzo de la terapia con el otro fármaco o fármacos y administración continuará típicamente a lo largo del curso de tratamiento con el otro fármaco o fármacos. En algunas realizaciones, el fármaco administrado simultáneamente con un profármaco alquilante de fosforamidato se liberará a una dosis inferior, y opcionalmente durante período de tiempo más prolongados, de lo que sería el caso en ausencia de administración de un profármaco alquilante de fosforamidato. Tales terapias de "dosis bajas" pueden implicar, por ejemplo, la administración de un fármaco anti-canceroso, incluyendo pero no limitado a paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, cisplatino, o carboplatino, a una dosis inferior a la aprobada y durante un período de tiempo más prolongado junto con un profármaco alquilante de fosforamidato administrado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Estos métodos se pueden utilizar para mejorar el resultado en el paciente durante las terapias llevadas a la práctica en la actualidad destruyendo más eficazmente las células cancerosas o deteniendo el crecimiento de la células cancerosas así como disminuyendo los efectos secundarios no deseados de la otra terapia. Cuando se emplean combinados con un profármaco alquilante de fosforamidato, el agente o los agentes anticancerosos adicionales se dosifican utilizando cualquiera de las dosificaciones convencionales empleadas para esos Agentes (es decir, cuando se utilizan sin un profármaco alquilante de fosforamidato) o son menores que esas dosificaciones convencionales.

La administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria puede permitir al médico por lo tanto tratar el cáncer con fármacos existentes (o aprobados más tarde) a dosis menores (que las utilizadas en la actualidad), mejorando de este modo algunos o todos los efectos secundarios tóxicos de tales fármacos. La dosificación exacta para un paciente dado varía de paciente a paciente, dependiendo de numerosos factores incluyendo la combinación de fármacos empleada, la enfermedad concreta que esté siendo tratada, y el estado e historial médico previo del paciente, pero se puede determinar utilizando solo el conocimiento práctico del experto normal en la técnica en vista de las enseñanzas de la presente memoria.

Los regímenes de dosificación específicos para los agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos conocidos y aprobados (es decir, la dosis eficaz recomendada) son conocidos por los médicos y se proporcionan, por ejemplo, en las descripciones de productos encontradas en The Physician's Desk Reference 2003, (Physicians' Desk Reference, 57^a Ed) Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J y/o son asequibles de la Federal Drug Administration. Los regímenes de dosificación ilustrativos para ciertos fármacos anticancerosos también se proporcionan más abajo.

Los fármacos contra el cáncer se pueden clasificar generalmente como alquilantes, antraciclinas, antibióticos, inhibidores de aromataza, bisfosfonatos, inhibidores de ciclo-oxigenasa, moduladores de receptores de estrógeno, antagonistas de folato, arseniatos inorgánicos, inhibidores de microtúbulos, modificadores, nitrosoureas, análogos de nucleósidos, inhibidores de osteoclastos, compuestos que contienen platino, retinoides, inhibidores de topoisomerasa 1, inhibidores de topoisomerasa 2, e inhibidores tirosina quinasas. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar simultáneamente

con cualquier fármaco anticanceroso de cualquiera de estas clases o se puede administrar antes o después del tratamiento con cualquiera de tales fármacos o una combinación de tales fármacos. Además, un profármaco alquilante de fosforamidato se puede administrar combinado con una terapia biológica (p. ej., tratamiento con interferones, interleuquinas, factores esestimuladores de colonias y anticuerpos monoclonales). Los agentes biológicos utilizados para el tratamiento del cáncer son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, trastuzumab (Herceptina), tositumomab e ¹³¹I-Tositumomab (Bexxar), rituximab (Rituxan).

Los alquilantes útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a busulfán (Mileran, Busulfex), clorambucilo (Leukeran), ifosfamida (con o sin MESNA), ciclofosfamida (Cytosan, Neosar), glufosfamida, melfalán, L-PAM (Alkeran), dacarbazina (DTIC-Dome), y temozolamida (Temodar). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un alquilante para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es la leucemia mielógena crónica, el mieloma múltiple, o el astrocitoma anaplásico.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer tratable mediante la administración de un alquilante administrando los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención solos o combinados con al menos otro alquilante o un profármaco del mismo. Alquilantes, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, glufosfamida, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, dacarbazina, temozolomida, carmustina, estreptozocina, bendamustina, busulfán, tiotepa, cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino, y los tipos del cánceres tratados utilizando uno cualquiera de tales alquilantes solos o combinados con otros agentes anticancerosos o quimioprotectores se describen por ejemplo en la referencia Hardman *et al.* (supra).

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración simultánea de un profármaco alquilante de fosforamidato con al menos el alquilante Ciclofosfamida, en el tratamiento de linfomas malignos en Fases III y IV, mieloma múltiple, leucemia, micosis fungoides, neuroblastoma, adenocarcinoma ovárico, retinoblastoma, y carcinoma de mama. La Ciclofosfamida se administra para terapia de inducción a dosis de 1500-1800 mg/m² que se administran intravenosamente en dosis divididas a lo largo de un período de tres a cinco días; para la terapia de mantenimiento, se administran 350-550 mg/m² cada 7-10 días, o se administran intravenosamente 110-185 mg/m² dos veces a la semana. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con ciclofosfamida administrada a tal dosis o a una dosis inferior y/o durante más tiempo que el normal para la administración de Ciclofosfamida sola.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención junto con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos el alquilante Mecloretamina. Por ejemplo, la Mecloretamina se utiliza en el régimen de quimioterapia combinada MOPP (mecloretamina, Oncovin (vincristina), procarbazona, y prednisona) en pacientes con enfermedad de Hodgkin y se administra por medio de administración de embolada intravenosa en dosis de 6 mg/m² los días 1 y 8 de ciclos de 28 días de cada curso de tratamiento.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos el alquilante Ifosfamida. La Ifosfamida se utiliza para tratar sarcomas pediátricos y adultos, carcinomas de cérvix y pulmón, y combinado con otros fármacos para el cáncer testicular de células germinales. La Ifosfamida se utiliza como parte de los regímenes CIE (Ifosfamida, Carboplatino, y Etopósido) y RICE (Rituxan y CIE) para el tratamiento del linfomas (véase Hardman *et al.*, supra).

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos el alquilante Glufosfamida. La Glufosfamida está en uso clínico para el tratamiento del o del cáncer de páncreas resistente a Gemzar. La Glufosfamida se puede utilizar para el tratamiento del cáncer de mama, Hodgkin Morbus, cáncer de tracto gastrointestinal, o como parte del régimen GCE (Glufosfamida, Carboplatino, y Etopósido) o RGCE (Rituxán y GCE), para el tratamiento del linfomas. (Véase Tidmarsh *et al.*, Solicitud de Patente PCT Núm. PCT/US2005/047314 presentada el 22 de Diciembre de 2005; Solicitud de Pat. PCT titulada "Glufosfamida combination therapy", Núm. de Expediente del Agente 021305-005900PC; y Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 60/760.599 y Publicación de Pat. PCT Núm. WO 2005/076888).

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos un alquilante seleccionado del grupo que consiste en etileniminas y metilmelaminas. En otro caso, la etilenimina es Trietilenmelamina o Tiotepa.

La Tiotepa se puede utilizar para tratar adenocarcinomas de mama, ovario, y vejiga, linfomas malignos, carcinomas broncogénicos, y tumor de Wilms. La Tiotepa se utilizó a una dosis alta en la quimioterapia combinada con

ciclofosfamida en pacientes con malignidades refractarias tratadas mediante trasplante de hueso autólogo y para tratar a variedad del cánceres incluyendo vejiga, ovario, mama, pulmón, cerebro, y linfomas (véase, International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1975, 9 : 286, Lyon, France; International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluación of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1990, 50 : 415, Lyon, France; y MEDLINE plus, 2003, Drug Information: Thiotepa, National Library of Medicine). La metilmelamina Altretamina se utiliza para tratar el cáncer de ovario avanzado después del fracaso de las terapias de primera ronda.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos el alquilante Melfalán, Clorambucilo, o Bendamustina. El Melfalán se utiliza para tratar el mieloma múltiple y se puede administrar oralmente. El Clorambucilo se utiliza para tratar la leucemia linfocítica crónica y la macroglobulinemia primaria. La Bendamustina, desarrollada por Salmedix Inc. se puede utilizar para tratar neoplasias malignas hematológicas, tales como, por ejemplo, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, y mieloma múltiple.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos el alquilante Busulfán. El Busulfán se utiliza para tratar la leucemia granulocítica crónica y la leucemia mielógena crónica. Se pueden utilizar altas dosis de busulfán combinadas con Ciclofosfamida para tratar pacientes con leucemia mielógena aguda antes del trasplante de médula ósea.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos un alquilante de nitrosourea. En otro caso, el alquilante de nitrosourea es la Carmustina. La Carmustina se puede utilizar para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas, mielomas, astrocitomas malignos, tumores metastásicos del cerebro, melanomas, y tumores gastrointestinal. En otro aspecto, la nitrosourea es la Estreptozocina que se utiliza para tratar el carcinoma de células de los islotes pancreáticos.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos un alquilante de triazeno. En un caso, el alquilante de triazeno es la Dacarbazina. La Dacarbazina se utiliza para tratar melanomas malignos, la enfermedad de Hodgkin, y sarcomas en adultos. En otro caso, el alquilante de triazeno es la Temozolomida. La Temozolomida se puede utilizar para tratar gliomas malignos.

En un caso, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato de la invención con un régimen de tratamiento del cáncer utilizando al menos un alquilante de complejo de coordinación de platino. En una realización, el alquilante de complejo de coordinación de platino es el Cisplatino. El Cisplatino se puede utilizar para tratar el cáncer de vejiga, cabeza y cuello, endometrio, carcinoma de pulmón de células pequeñas, y algunos neoplasmas de niños. El Cisplatino solo o con ciclofosfamida se utiliza para tratar el cáncer de ovario avanzado. La quimioterapia combinada de Cisplatino con Bleomicina, Etopósido, y Vinblastina se utiliza para tratar el cáncer testicular avanzado; y con uno de Paclitaxel, Ciclofosfamida, o Doxorubicina para tratar el carcinoma ovárico.

Las Antraciclinas útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitadas a, doxorubicina (Adriamicina, Doxil, Rubex), mitoxantrona (Novantrone), idarrubicina (Idamicina), valrubicina (Valstar), y epirubicina (Ellence). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con una antraciclina para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es la leucemia no linfocítica aguda, el sarcoma de Kaposi, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga, el carcinoma de ovario metastásico, y el cáncer de mama.

Como ejemplo el compuesto (8S,10S)-10-[(3-Amino-2,3,6-tridesoxi-alfa-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicolil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftacenediona, conocido más comúnmente como doxorubicina, es un antibiótico de antraciclina citotóxico aislado de cultivos de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. La Doxorubicina se ha utilizado eficazmente para producir la regresión de afecciones neoplásicas diseminadas tales como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilm, neuroblastoma, sarcomas de tejido blando y de hueso, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, carcinoma de vejiga de células transicionales, carcinoma de tiroides, linfomas de tipo tanto Hodgkin como no Hodgkin, carcinoma broncogénico, y carcinoma gástrico. La Doxorubicina se administra típicamente a una dosis en el intervalo de 30-75 mg/m² en forma de una sola inyección intravenosa administrada a intervalos de 21 días; inyección intravenosa semanal a dosis de 20 mg/m²; o dosis de 30 mg/m² en cada uno de tres días sucesivos repetidas cada cuatro semanas. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente comenzando antes y continuando después de la administración de doxorubicina a tales dosis (o a dosis inferiores). Los profármacos de

la citotoxina Antraciclina cíclica útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria se proporcionan mediante la referencia Matteucci et al., Solicitud de Patente PCT Núm. US05/008161 .

5 Los antibióticos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a dactinomicina, actinomicina D (Cosmegen), bleomicina (Blenoxano), daunorrubicina, y daunomicina (Cerubidina, DanuoXome). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un antibiótico para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda, otras leucemias, y sarcoma de Kaposi.

10 Los inhibidores de aromatasas útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a anastrozol (Arimidex) y letrozol (Femara). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de aromatasas para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de mama.

15 Los inhibidores de bisfosfonato útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a zoledronato (Zometa). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con inhibidor de bisfosfonato para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en el mieloma múltiple, metástasis ósea de tumores sólidos, o cáncer de próstata.

20 Los inhibidores de ciclo-oxigenasa útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a celecoxib (Celebrex). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de ciclo-oxigenasa para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de colon o una afección pre-cancerosa conocida como poliposis adenomatosa familiar.

25 Los moduladores de receptores de estrógenos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a tamoxifeno (Nolvadex) y fulvestrant (Faslodex). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un modulador de receptores de estrógenos para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de mama o el tratamiento se administra para prevenir la aparición o reaparición del cáncer de mama.

30 Los antagonistas de folato útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a metotrexato y tremetrexato. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un antagonista de folato para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es un osteosarcoma.

35 Como ejemplo, el compuesto ácido N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil-metilamino]benzoil]-L-glutámico, conocido comúnmente como metotrexato, es un fármaco antifolato que ha sido utilizado en el tratamiento del coriocarcinoma gestacional y en el tratamiento de pacientes con corioadenoma destruens y mola hidatiforme. También es útil en el tratamiento de fases avanzadas de linfoma maligno y en el tratamiento de casos avanzados de micosis fungoides. El Metotrexato se administra como sigue. Para el coriocarcinoma, se administran diariamente inyecciones intramusculares de dosis de 15 a 30 mg durante un curso de cinco días, repitiéndose tales cursos según se necesite con períodos de descanso de una o más semanas intercalados entre los cursos de terapia. Para las leucemias, se administran dos veces a la semana inyecciones intramusculares en dosis de 30 mg/m². Para la micosis fungoides, se administran semanalmente inyecciones intramusculares de dosis de 50 mg o, alternativamente, de 25 mg dos veces a la semana. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con metotrexato administrado a tales dosis (o dosis inferiores). La 5-metil-6-[[[(3,4,5-trimetoxifenil)-amino]metil]-2,4-quinazolindiamina (conocida comúnmente como trimetrexato) es otro fármaco antifolato que se puede administrar simultáneamente con un profármaco alquilante de fosforamidato.

40 Los arsenatos inorgánicos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a trióxido de arsénico (Trisenox). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un arsenato inorgánico para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es leucemia promielocítica aguda refractaria (APL).

45 Los inhibidores de microtúbulos (según se utiliza en la presente memoria, un "inhibidor de microtúbulos" es cualquier agente que interfiere en el ensamblaje o desensamblaje de microtúbulos) útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a vincristina (Oncovina), vinblastina (Velban), paclitaxel (Taxol, Paxeno), vinorelbina (Navelbina), docetaxel (Taxótero), epotilona B o D o un derivado de cualquiera, y discodermólido o sus derivados. Los fármacos anticancerosos que se unen a Tubulina y sus profármacos que se pueden utilizar en la práctica de los métodos de la presente invención se proporcionan en la referencia Matteucci *et al.*, Solicitud de Patente PCT Núm. PCT/US2005/042095; Solicitud de Patente de Estados

Unidos titulada "Tubulin Binding Anti Cancer Agents and Prodrugs Thereof" (Núm. de Ref. del Agente. 021305-008500US, 021305-008400US y 021305-004520). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de microtúbulos para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de Kaposi, y cáncer metastásico de mama o de origen ovárico. Como ejemplo, el compuesto 22-oxo-vincalécoblastina, también conocido comúnmente como vincristina, es un alcaloide obtenido de la planta vincapervinca (*Vinca rosea*, Linn.) y es útil en el tratamiento de la leucemia aguda. También se ha demostrado que es útil combinado con otros agentes oncológicos en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, el linfoma, el sarcoma de células del retículo, el rhabdomioma, el neuroblastoma, y el tumor de Wilm. La Vincristina se administra en dosis intravenosas semanales de 2 mg/m² para niños y de 1,4 mg/m² para adultos. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con vincristina administrada a tales dosis. En una versión, un profármaco alquilante de fosforamidato no se administra antes del tratamiento con un inhibidor de microtúbulos, tal como un taxano, pero en lugar de eso, se administra simultáneamente un profármaco alquilante de fosforamidato de unos pocos días a una semana después del comienzo del tratamiento con un inhibidor de microtúbulos.

Los modificadores útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a Leucovorina (Wellcovorin), que se utiliza con otros fármacos tales como 5-fluorouracilo para tratar el cáncer colorrectal. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un modificador y otro agente anticanceroso para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de colon. En una versión, el modificador es un compuesto que aumenta la capacidad de una célula para absorber glucosa, incluyendo pero no limitado al compuesto N-hidroxiurea. Se ha informado que la N-hidroxiurea aumenta la capacidad de una célula para absorber 2-desoxiglucosa (véase la referencia Smith et al., 1999, *Cancer Letters* 141: 85), y la administración de N-hidroxiurea a los niveles referidos para aumentar la absorción de 2-desoxiglucosa o para tratar la leucemia junto con la administración de 2-desoxiglucosa y un profármaco alquilante de fosforamidato como se ha descrito en la presente memoria es una versión de los métodos terapéuticos proporcionados en la presente memoria. En otra de tal versión, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con óxido nítrico o un precursor de óxido nítrico, tal como un nitrito orgánico o un NONOato de espermina, para tratar el cáncer, como últimos compuestos que estimulan la absorción de glucosa.

Las nitrosoureas útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitadas a procarbazona (Matulano), lomustina, CCNU (CeeBU), carmustina (BCNU, BiCNU, Oblea Gliadel), y estramustina (Emcit). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con una nitrosourea para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer de próstata o glioblastoma, incluyendo glioblastoma multiforme recurrente.

Los análogos de nucleósidos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a mercaptopurina, 6-MP (Purineto), fluorouracilo, 5-FU (Adrucil), tioguanina, 6-TG (Tioguanina), hidroxiurea (Hydrea), citarabina (Cytosar-U, DepoCyt), floxuridina (FUDR), fludarabina (Fludara), azacitidina (Vidaza), pentostatina (Nipent), cladribina (Leustatina, 2-CdA), gemcitabina (Gemzar), y capecitabina (Xeloda). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un análogo de nucleósido para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer leucemia linfocítica de células B (LLB), leucemia de células pilosas, adenocarcinoma de páncreas, cáncer de mama metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, o carcinoma colorrectal metastásico. Como ejemplo, el compuesto 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinodiona, conocido comúnmente también como 5-fluorouracilo, es un análogo de nucleósido antimetabólico eficaz en el manejo paliativo del carcinoma de colon, recto, mama, estómago, y páncreas en pacientes que se consideran incurables por medios quirúrgicos u otros medios. El 5-Fluorouracilo se administra en una terapia inicial a dosis de 12 mg/m² administrada intravenosamente una vez al día durante 4 días sucesivos no excediendo la dosis diaria de 800 mg. Si no se observa toxicidad en ningún momento en el curso de la terapia, se administran intravenosamente 6 mg/kg los días 6^o, 8^o, 10^o, y 12^o. No se administra terapia los días 5^o, 7^o, 9^o, o 11^o. En pacientes con bajo riesgo o aquellos que no están en un estado nutricional adecuado, se administra una dosis diaria de 6 mg/kg durante tres días, no excediendo la dosis diaria de 400 mg. Si no se observa toxicidad en ningún momento durante el tratamiento, se pueden administrar 3 mg/kg los días 5^o, 7^o, y 9^o días. No se administra terapia los días 4^o, 6^o, u 8^o. Una secuencia de inyecciones en cualquier programa constituye un curso de terapia. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con 5-FU administrado a tales dosis o con la forma de profármaco Xeloda con dosis ajustadas correspondientemente. Como otro ejemplo, el compuesto 2-amino-1,7-dihidro-6H-purino-6-tiona, también conocido comúnmente como 6-tioguanina, es un análogo de nucleósido eficaz en la terapia de leucemias no linfocíticas agudas. La 6-tioguanina se administra oralmente a dosis de alrededor de 2 mg/kg de peso corporal por día. La dosis diaria total se puede proporcionar de una vez. Si al cabo de cuatro semanas de dosificación a este nivel no hay mejora, la dosificación se puede aumentar cuidadosamente prudentemente a 3 mg/kg/día. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con 6-TG administrada a tales dosis (o a dosis inferiores).

Los inhibidores de osteoclastos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a pamidronato (Aredia). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de osteoclastos para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es la metástasis ósea osteolítica de cáncer de mama, y también se administran simultáneamente uno o más agentes anticancerosos adicionales con un profármaco alquilante de fosforamidato.

Los compuestos de platino útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a cisplatino (Platinol) y carboplatino (Paraplatino). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un compuesto de platino para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es cáncer testicular metastásico, cáncer de ovario metastásico, carcinoma ovárico, y cáncer de vejiga de células transicionales. Como ejemplo, el compuesto cis-Diaminodicloroplatino (II), conocido comúnmente como cisplatino, es útil en el tratamiento paliativo de tumores testiculares y ováricos metastásicos, y para el tratamiento del cáncer de vejiga de células transicionales que no es susceptible de cirugía o radioterapia. El Cisplatino, cuando se utiliza para el cáncer de vejiga avanzado, se administra inyecciones intravenosas a dosis de 50-70 mg/m² una vez cada tres a cuatro semanas. De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con cisplatino administrado a estas dosis (o a dosis inferiores). Se pueden administrar simultáneamente uno o más agentes anticancerosos adicionales con el compuesto de platino y un profármaco alquilante de fosforamidato. Como ejemplo, se pueden administrar simultáneamente Platinol, Blenoxano, y Velbam con un profármaco alquilante de fosforamidato. Como otro ejemplo, se pueden administrar simultáneamente Platinol y Adriamicina con un profármaco alquilante de fosforamidato.

Los retinoides útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a tretinoína, ATRA (Vesanoide), alitretinoína (Panretina), y bexaroteno (Targretina). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un retinoide para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en APL, sarcoma de Kaposi, y linfoma de células T.

Los inhibidores de topoisomerasa 1 útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a topotecan (Hicamtina) e irinotecan (Camptostar). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de topoisomerasa 1 para tratar el cáncer. Los inhibidores de topoisomerasa y sus profármacos útiles en la práctica de los métodos de la presente invención se proporcionan en la referencia Matteucci et al., Solicitud de Patente PCT Núm. PCT/US2005/041959. En una versión, el cáncer es carcinoma metastásico de ovario, colon, o recto, o cáncer de pulmón de células pequeñas. Como se ha observado anteriormente, no obstante, en una versión de los métodos descritos en la presente memoria, la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato precede o sigue, o ambos, a la administración de un inhibidor de topoisomerasa 1 pero no se administra concurrentemente con el mismo.

Los inhibidores de topoisomerasa 2 útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a etopósido, VP-16 (Vepesid), tenipósido, VM-26 (Vumon), y fosfato de etopósido (Etopofos). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de topoisomerasa 2 para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en tumores testiculares refractarios, leucemia linfoblástica aguda refractaria (LLA), y cáncer de pulmón de células pequeñas. Como se ha observado anteriormente, no obstante, en una versión de los métodos descritos en la presente memoria, la administración de un profármaco alquilante de fosforamidato precede o sigue, o ambos, a la administración de un inhibidor de topoisomerasa 2 pero no se administra concurrentemente con el mismo.

Los inhibidores de tirosina quinasas útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a imatinib (Gleevec). De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria un profármaco alquilante de fosforamidato se administra simultáneamente con un inhibidor de tirosina quinasas para tratar el cáncer. En una versión, el cáncer es CML o un tumor estromático gastrointestinal maligno no extirpable.

De este modo, en la presente memoria se describen los métodos para el tratamiento del cáncer en el que se administran a un paciente un profármaco alquilante de fosforamidato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más agentes anticancerosos adicionales. Las versiones específicas de tales otros agentes anticancerosos incluyen sin limitación 5-metil-6-[[[(3,4,5-trimetoxifenil)amino]-metil]-2,4-quinazolindiamina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, (8S,10S)-10-(3-amino-2,3,6-tridesoxi-alfa-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicoliloil-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12-naftaceno-diona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinodiona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; 2-amino-1,7-dihidro-6H-purino-6-tiona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; 22-oxo-vincalcublastina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; 2-bis[(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina, 2-óxido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; ácido N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]-metilamino]benzoil]-L-glutámico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; o cisdiaminodicloro-platino (II).

IV. EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, cualquier referencia a un compuesto designado por una letra es una referencia a la estructura mostrada a continuación o antes de la letra en los esquemas de reacción correspondientes.

Síntesis

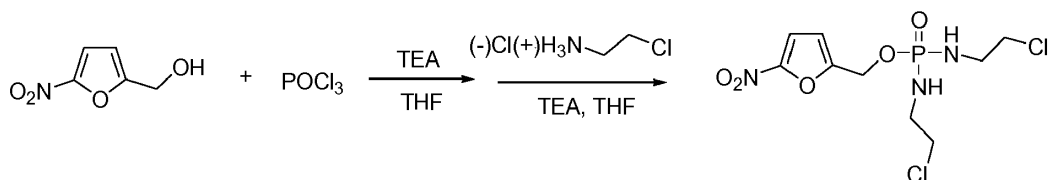
Los métodos para sintetizar los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención se proporcionan en la sección IIb. Las sustancias de partida utilizadas en la síntesis de los profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención se adquirieron, cuando estuvieron disponibles, de fabricantes comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma-Aldrich Co. El 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol se adquirió de Syngene, India. Las sustancias de partida no asequibles comercialmente se pueden sintetizar a través de procedimientos de la literatura convencionales. Tales procedimientos se pueden identificar a través de herramientas de búsqueda de literatura tales como SciFinder asequible de The American Chemical Society o Beilstein, asequible de MDL Software.

Las reacciones con compuestos sensibles a la humedad, tales como, por ejemplo, POCl_3 y PCl_3 , y sus derivados mono- y diclorados se realizaron empleando disolventes anhidros y en nitrógeno o argón. La separación de un producto de la mezcla de reacción se realizó empleando una elaboración cuando fue necesario, seguido de destilación a vacío, cristalización, cromatografía en columna, o cromatografía en capa fina preparativa. Se puede determinar un eluyente adecuado para la cromatografía en columna de un compuesto leyendo esta descripción y/o determinando el R_f del compuesto por medio de cromatografía en capa fina y eligiendo un disolvente que permita la separación del compuesto deseado de los compuestos no deseados. La elección del eluyente concreto puede depender, entre otros factores, de la naturaleza polar del compuesto, la existencia de otros compuestos que eluyen cerca, el tipo de fase estacionaria utilizada tal como gel de sílice o alúmina, y la cantidad de presión utilizada para eluir el disolvente a través de la fase estacionaria. En la práctica, se pueden utilizar diferentes composiciones de disolventes para separar el mismo compuesto.

Los compuestos separados se analizaron para determinar su pureza por medio de técnicas analíticas convencionales, tales como, CCF, espectroscopía RMN, y CL-EM, y se almacenaron en un congelador o en un frigorífico, evitando la humedad, la luz, o el aire. Se prepararon soluciones de partida de los compuestos profármaco alquilantes de fosforamidato en DMSO y se almacenaron en un congelador.

Ejemplo 1

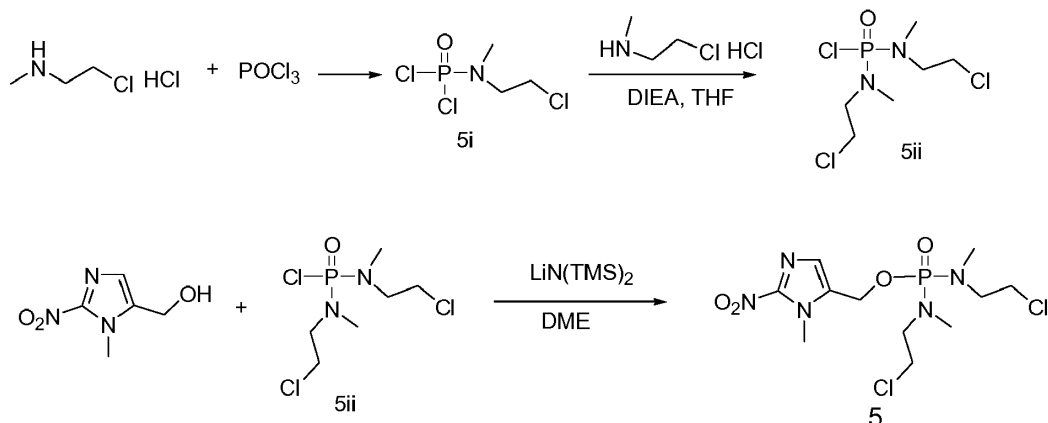
Síntesis del Compuesto 23



A una solución de alcohol 5-nitrofurfurílico (200 mg, 1,4 mmoles) en THF (10 ml) a -78°C se le añadió POCl_3 en una porción seguido de una adición gota a gota de trietilamina (TEA, 0,22 ml, 1,54 mmoles). La temperatura se aumentó a -30°C en una hora y, a continuación se añadió hidrocloreuro de 2-cloroetilamina, seguido de la TEA (1 ml, 7 mmoles). Después de que la temperatura se elevó a temperatura ambiente (rt), se continuó la reacción durante una hora más, la mezcla de reacción se sofocó con agua y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con DCM y la solución orgánica combinada se secó y se concentró. El Compuesto 23 se separó mediante cromatografía en columna ultrarrápida y se analizó que era puro mediante LC/MS y espectroscopia de RMN.

Ejemplo 2

Síntesis del compuesto 5 (no de la invención)

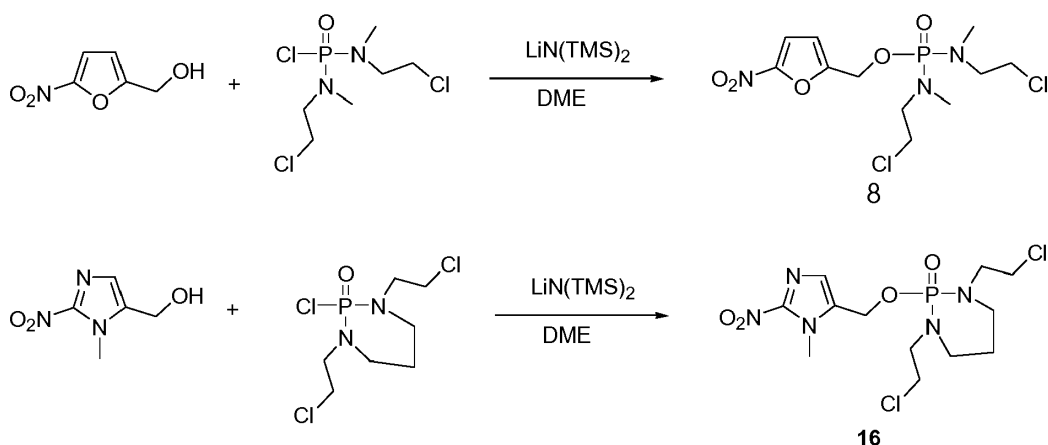


5 Una suspensión de cloruro de *N*-metil-2-cloroetilamonio (10 g) en POCl_3 (40 ml) se calentó a reflujo (135°C) durante la noche. Después de eliminar el exceso de POCl_3 a vacío, el producto **5i** se separó por destilación a vacío en forma de aceite de color amarillo claro y se analizó que era puro mediante espectroscopía de RMN ^1H y ^{31}P .

10 A una solución de **5i** (1 g, 4,75 mmoles) y cloruro de *N*-metil-2-cloroetilamonio (0,62 g, 4,75 mmoles) en THF a -78°C se le añadió lentamente diisopropiletilamina (DIEA, 1,65 ml, 9,5 mmoles) y la mezcla de reacción se calentó a rt. Después de agitar a rt durante una hora, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró para producir un residuo que se separó mediante cromatografía ultrarrápida produciendo el compuesto **5ii** en forma de aceite.

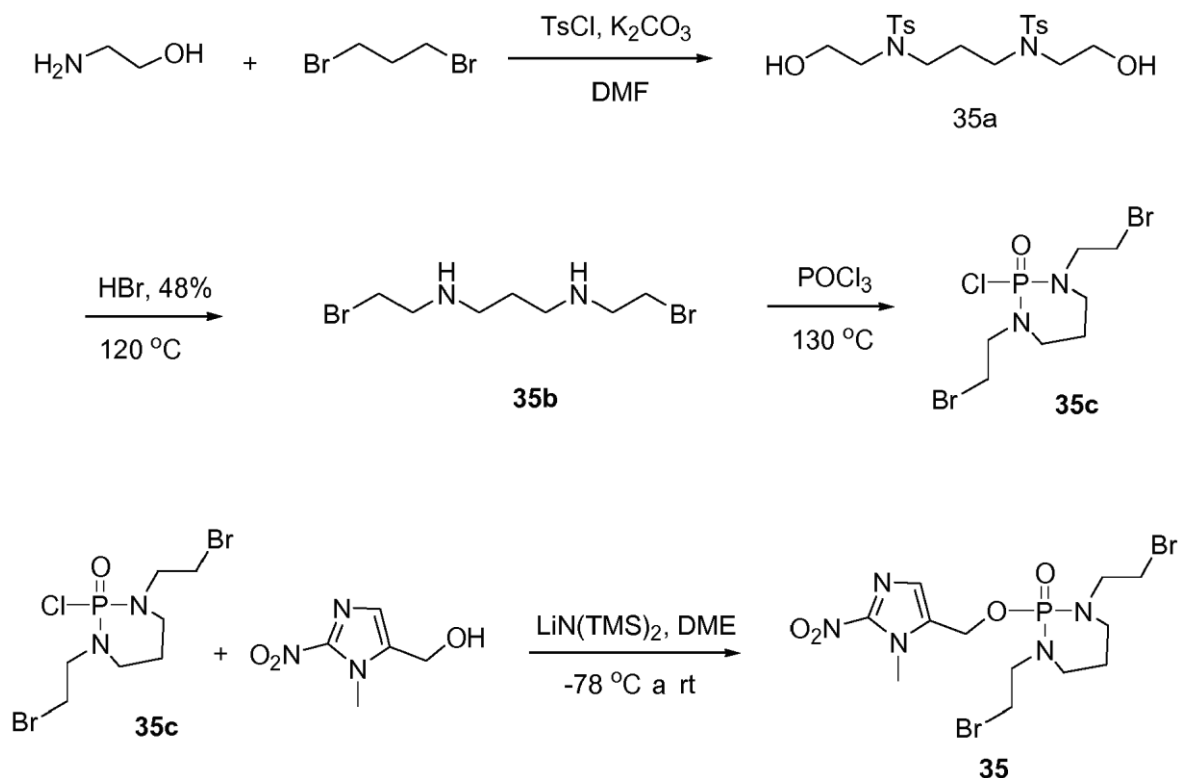
15 A una solución de *N*-metil 2-nitroimidazol-5-metanol (0,5 g, 3,2 mmoles) en dimetoxietano (DME) se le añadió bis(trimetilsilil)amiduro de litio (3,2 mmoles, 3,2 ml, 1 M en THF) a -78°C . Después de 5 min, se añadió **5ii** (2,9 mmoles, 770 mg) y la mezcla de reacción se calentó hasta -20°C , se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida con metanol al 6-12% en DCM produjo **5**.

20 Los compuestos de 8 y 16 se sintetizaron empleando el procedimiento utilizado para la preparación del compuesto_5.



Ejemplo 3

25 Síntesis del Compuesto 35 (no de la invención)



A una solución de etanolamina (6,03 ml, 100 mmoles) y K_2CO_3 (13,8 g, 100 mmoles) en DMF (38 ml) se le añadió gota a gota una solución de cloruro de p-toluenosulfonilo (19 g, 100 mmoles) a rt y la mezcla de reacción se calentó hasta 120°C (temperatura del baño). Se añadió K_2CO_3 (27,6 g, 200 mmoles) a la mezcla de reacción, seguido de la adición gota a gota de 1,3-dibromopropano (10 g, 50 mmoles). Después de calentar durante dos horas más, la reacción se enfrió a rt, se vertió en agua (250 ml), y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró para producir el compuesto **35a** en forma de un aceite de color amarillo que se empleó en la siguiente reacción.

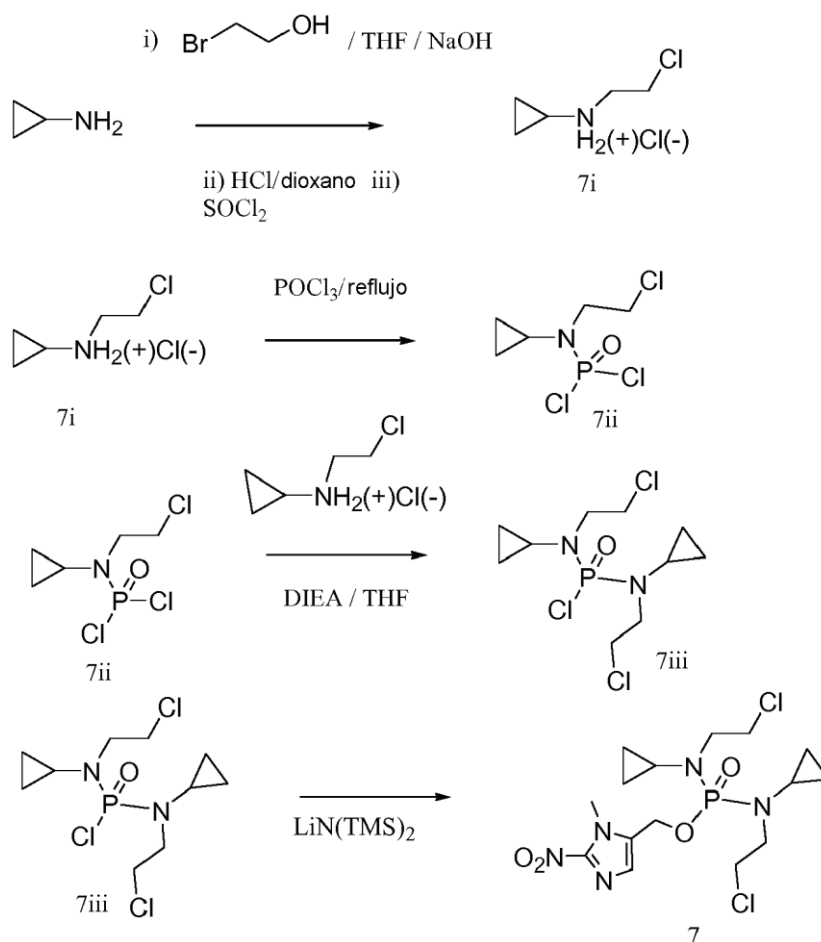
Una solución de compuesto **35a** (5 g) en HBr acuoso (48%, 50 ml) se destiló para eliminar la porción acuosa (aproximadamente 20 ml), y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 40 h. La porción acuosa adicional (5 ml) se eliminó mediante destilación y la mezcla de reacción se sometió a reflujo (4 h). La mezcla de reacción se enfrió a rt, se diluyó con agua (20 ml), y se filtró a través de un lecho de celite. El producto filtrado se concentró hasta sequedad para proporcionar un residuo que se coevaporó con etanol tres veces, y después de la adición de un gran volumen de acetona se filtró un producto sólido blanco **35b** y se lavó con acetona dos veces y se empleó en la fosforilación proporcionada a continuación.

Una suspensión de compuesto **35b** (1 g) en $POCl_3$ (14 ml) se calentó a 130°C durante aproximadamente 14 h y el exceso de $POCl_3$ se eliminó a vacío a 130°C (temperatura del baño). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando EtOAc de 10 a 80%/hexano para proporcionar el producto **35c** que se convirtió en el compuesto 35 de la presente invención empleando el mismo procedimiento proporcionado en el Ejemplo 2 empleando para la separación cromatográfica columna gel de sílice y acetona al 10-80%/tolueno como eluyente.

Ejemplo 4

Síntesis del Compuesto 7 (no de la invención)

El Compuesto 7 se preparó empleando el cloruro de N-ciclopropil-2-cloroetilamonio proporcionado a continuación



5 A una solución de ciclopropilamina (25 g) en THF seco (30 ml) se le añadió gota a gota una solución de 2-bromoetanol (17,6 g, 0,141 mol) en 30 ml de THF durante 35 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a rt, y se calentó a 50°C durante 75 minutos. Después de enfriar, la mezcla de reacción se concentró para producir un aceite de color naranja al que se añadió una solución de hidróxido de sodio (7 g) en agua (50 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos, y se extrajo 4 veces con acetato de etilo (75 ml). La capa orgánica combinada se secó (MgSO_4) y se evaporó para proporcionar un residuo oleoso de color naranja. El residuo se destiló a vacío a 53-56°C (133 Pa (1 mm Hg)) para proporcionar un alcohol intermedio (5,94 g, 42% de rendimiento) en forma de un líquido transparente, incoloro que se analizó que era puro mediante LC/MS y RMN ^1H .

15 A una solución del alcohol intermedio (3,7 g, 36,6 mmoles) en THF seco (30 ml) se le añadió una solución de HCl en dioxano (4,0 M, 18,3 ml, 73,2 mmoles). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió SOCl_2 (6,50 g, 54,9 mmoles) mediante una jeringa. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (6 h), se enfrió, y se concentró para producir un residuo. El residuo se trituró con éter seco (100 ml), se filtró, y los volátiles residuales se eliminaron a vacío para proporcionar **7i** (5,42g, 95% de rendimiento) que se analizó que era puro mediante RMN ^1H .

20 Se añadió **7i** (3,00 g, 19,2 mmoles) a POCl_3 (15 ml) y se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 7,5 horas. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se destiló a vacío a través de un aparato de destilación de trayecto corto para producir **7ii** en forma de un aceite transparente de color amarillo pálido, (3,6 g, 79% de rendimiento) que se analizó que era puro mediante RMN ^1H .

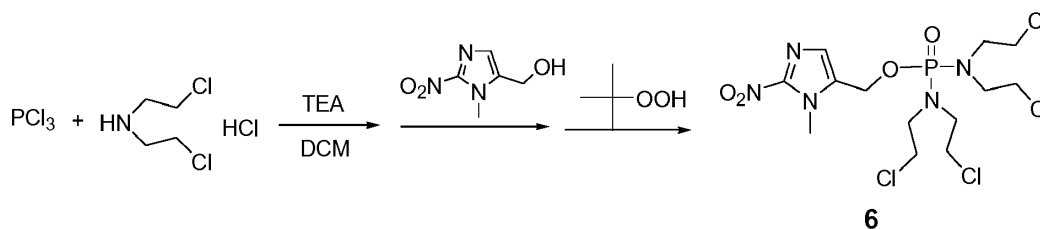
25 Se combinaron **7ii** (0,50 g, 2,11 mmoles) e hidrocloreto de N-ciclopropil-2-cloroetilamina (0,33 g, 2,11 mmoles) en THF seco en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a -78°C y añadió lentamente mediante una jeringa DIEA (0,545 g, 4,22 mmoles), se templó a rt lentamente, se agitó durante 1,5 horas y se concentró para proporcionar un residuo oleoso de color naranja. El residuo se separó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice utilizando hexano al 0-50% en acetato de etilo para proporcionar 315 mg (47% del teórico) de aceite de color amarillo pálido que se analizó que era **7iii** mediante MS.

30 Se disolvió parcialmente N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (76,8 mg, 0,489 mmoles) en THF seco (2 ml) en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a -78°C y se añadió una solución de bis(trimetilsilil)amiduro de

litio de litio en THF (1,6 M, 0,306 ml, 0,489 mmoles). Después de 15 minutos, se añadió una solución de 7iii (172 mg, 0,538 mmoles) en 2 ml de THF. Después de 15 minutos la mezcla de reacción se calentó lentamente a rt, se agitó durante 2 horas, se vertió en 25 ml de agua y se extrajo 3 veces con acetato de etilo (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para proporcionar un residuo oleoso de color amarillo. El residuo se separó mediante cromatografía ultrarrápida en metanol al 0-10% en DCM para proporcionar el compuesto_7 (110 mg, 51% de rendimiento) en forma de un aceite de color amarillo que se analizó que era puro mediante LC-MS y RMN H¹.

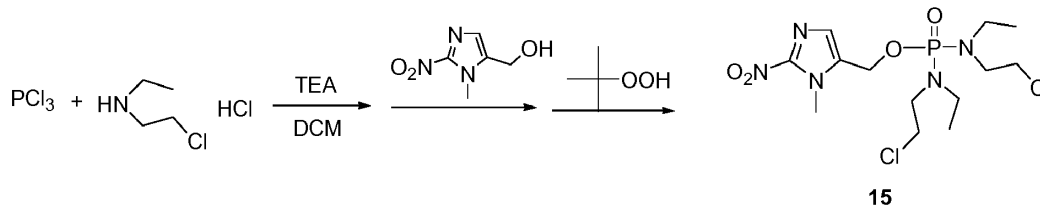
Ejemplo 5

Síntesis de los compuestos 6 y 15 (no de la invención)



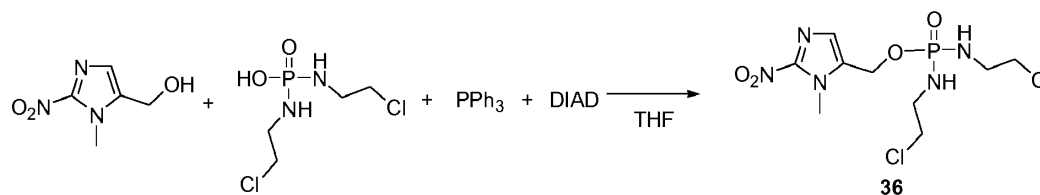
A una suspensión de cloruro de bis(2-cloroetil)amonio (1,43 g, 8,01 mmoles) en diclorometano (DCM) se le añadió tricloruro de fósforo (0,32 ml, 3,64 mmoles) a rt seguido de la adición de TEA (3,05 ml, 21,84 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a rt durante 30 minutos y a continuación se añadió *N*-metil 2-nitroimidazolil metanol (0,474 g, 3,31 mmoles) en DME. Después de agitar durante 0,5 horas, la mezcla de reacción se enfrió a -20°C y se añadió hidroperóxido de *tert*-butilo (0,7 ml, 3,82 mmoles, 5,5 M en decano). La mezcla de reacción se calentó a rt durante un periodo de una hora, y se vertió en HCl acuoso al 10%. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con DCM. La solución orgánica combinada se secó con MgSO₄ y se concentró para producir un residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con 6-12% de metanol en DCM produciendo **6**.

El Compuesto **15** se sintetizó utilizando el procedimiento descrito para la síntesis del Compuesto 6 anterior.



Ejemplo 6

Síntesis de los compuestos 23, 26 y 36

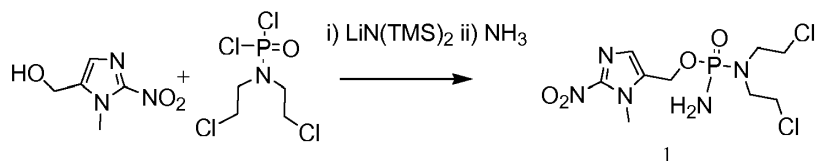


A una solución de *N*-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (180 mg, 1,14 mmoles), trifenílfosfina (300 mg, 1,14 mmoles), y mostaza de isofosforamida (1c, 127 mg, 0,57 mmoles) en THF (10 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 0,22 ml, 1,14 mmoles) a rt. Después de dos horas la mezcla de reacción se concentró y el residuo se separó mediante cromatografía ultrarrápida con acetona al 30-100% en tolueno produciendo el compuesto_36.

Los Compuestos **23** y **26** se sintetizaron empleando el procedimiento del Ejemplo 6.

Ejemplo 7

Síntesis del Compuesto 1 (no de la invención)



5

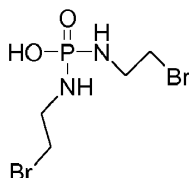
Se disolvió N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (50 mg, 0,318 mmoles) en THF seco (2 ml) en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a -78°C y se añadió mediante una jeringa una solución de bis(trimetilsilil)amiduro de litio (1 M en tolueno, 0,35 ml, 0,35 mmoles). Después de 5 minutos se añadió una solución de dicloruro bis(cloroetil)fosforamídico (91 mg, 0,35 mmoles) en THF (2 ml). Después de agitar a 78°C durante 30 minutos, la temperatura se redujo a -20°C empleando un baño de NaCl/hielo y se hizo burbujear amoníaco anhidro a través de la mezcla de reacción durante 5 minutos. La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno, se calentó a rt, se vertió en 25 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (4 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO_4) y se concentraron para proporcionar un aceite de color amarillo pálido que se separó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice utilizando metanol al 0-10% en diclorometano produciendo el compuesto 1 (32 mg, 28% de rendimiento) en forma de un aceite que solidificó al reposar y se analizó que era puro mediante LC/MS y RMN ^1H .

Ejemplo 8

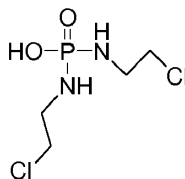
Síntesis de los compuestos 25, 26

A una solución de bromuro de 2-bromoetilamonio (19,4 g) en DCM (90 ml) a -10°C se le añadió una solución de POCl_3 (2,3 ml) en DCM (4 ml) seguido de la adición de una solución de TEA (14,1 ml) en DCM (25 ml). La mezcla de reacción se filtró, el producto filtrado se concentró a aprox. 30% del volumen original y se filtró. El residuo se lavó con DCM (3x25 ml) y las porciones de DCM combinadas se concentraron para proporcionar un sólido al que se añadió una mezcla de THF (6 ml) y agua (8 ml). El THF se eliminó en un evaporador rotatorio, la solución resultante se enfrió durante la noche en un frigorífico. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con agua (10 ml) y éter (30 ml), y se secó a vacío para producir 2,1 g de:

30



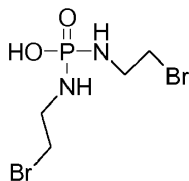
La mostaza de isofosforamida



se puede sintetizar empleando el método proporcionado anteriormente, sustituyendo el bromuro de 2-bromoetilamonio por cloruro de 2-cloroetilamonio. La síntesis de mostaza de isofosforamida se ha descrito (véase, por ejemplo Wiessler *et al.*, más arriba).

La toxina alquilante de fosforamidato:

40



se transformó en los compuestos 24 y 25, empleando el método proporcionado en el Ejemplo 6 y el Disparador-OH

apropiado.

Ejemplo 9

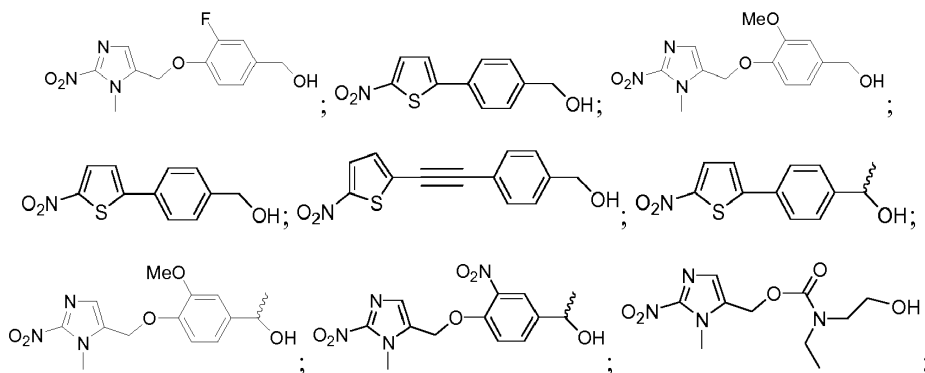
5 Síntesis de los compuestos 37 a 105

Los compuestos 37-39, 41-51, 54, 56, 60-62, 66-73, 81-85, 97-99 y 93-105 son compuestos ilustrativos de la invención.

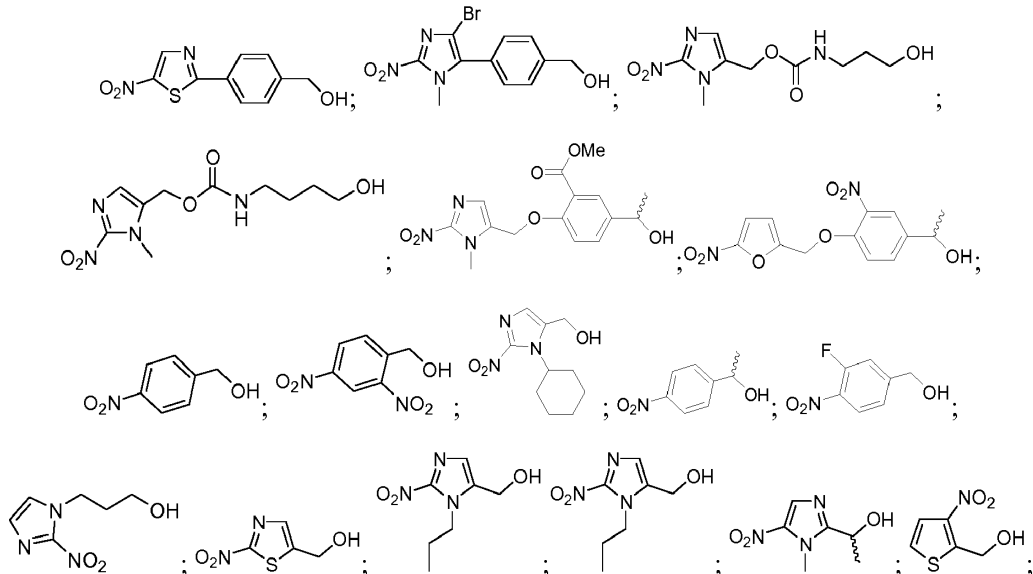
10 Los siguientes compuestos 37 a 105 se sintetizaron empleando el acoplamiento de tipo Mitsunobu descrito para la síntesis de 25 o 36 anterior, y después de la sustitución apropiada del Disparador-OH y el análogo de mostaza ifosfamida empleado. Por ejemplo, para la síntesis de los compuestos 40, 81, 83, 87, 89, 95, 96, 100, y 104, el análogo de mostaza de ifosfamida empleado fue HOP(=O)(NHCH₂CH₂Cl)₂; en los compuestos 50, 53, 55, 56, 58 - 65, 68 - 71, 73 - 75, 77 - 80, 82, 84 - 86, 88, 90 - 92, 94 y 97 - 99, 101 - 103, y 105, el análogo de mostaza de ifosfamida empleado es HOP(=O)(NHCH₂CH₂Br)₂; en los compuestos 37, 39, 52, 54 y 93, el análogo de mostaza de ifosfamida empleado es el enantiómero R de HOP(=O)(NHCHMeCH₂Cl)₂; en los compuestos 38, 41, 51, y 57 el análogo de mostaza de ifosfamida empleado es el enantiómero S de HOP(=O)(NHCHMeCH₂Cl)₂; en los compuestos 43 a 45 y 49 el análogo de mostaza de ifosfamida empleado fue el enantiómero R de HOP(=O)(NHCH(CHMe₂)CH₂Cl)₂; y en los compuestos 46 - 48, el análogo de mostaza de ifosfamida empleado fue el enantiómero S de HOP(=O)(NHCH(CHMe₂)CH₂Cl)₂.

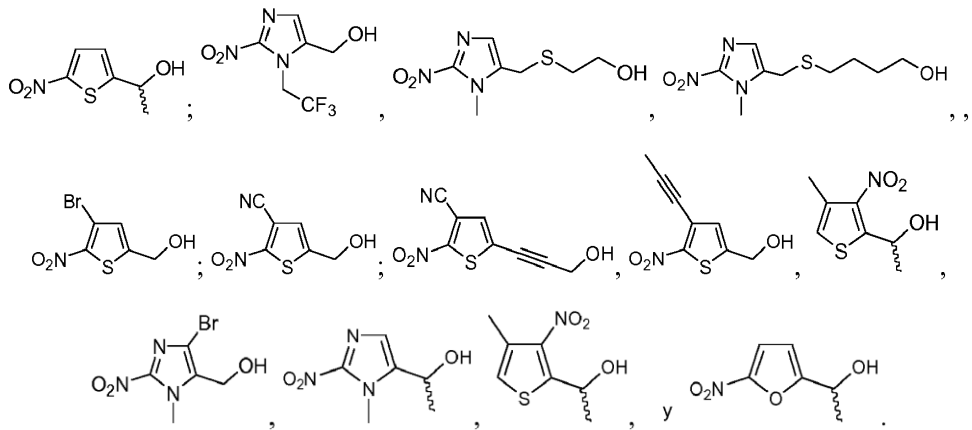
Los diversos compuestos de Disparador-OH empleados en la síntesis de los compuestos 37 - 105, incluyen los siguientes compuestos de Disparador-OH: 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-metanol, 1-N-metil-5-nitro-imidazol-2-metanol, 5-nitrofuran-2-metanol, 5-nitrotiofeno-2-metanol;

25



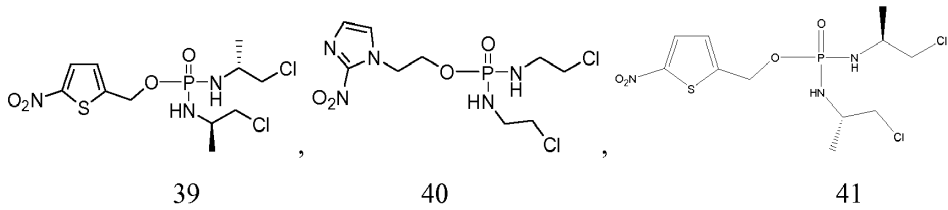
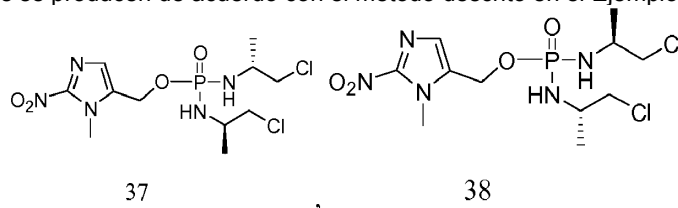
35



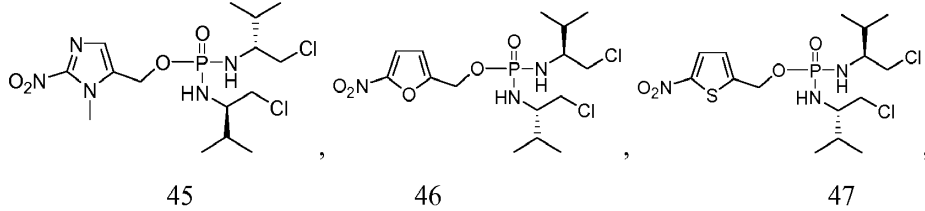
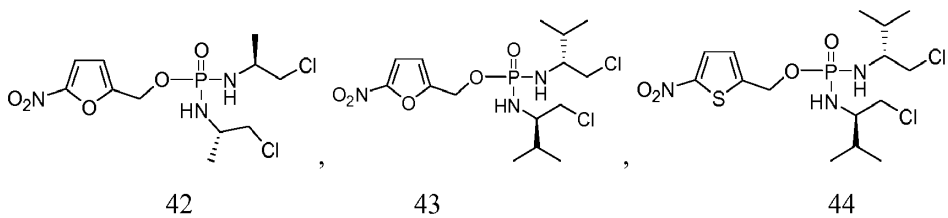


5

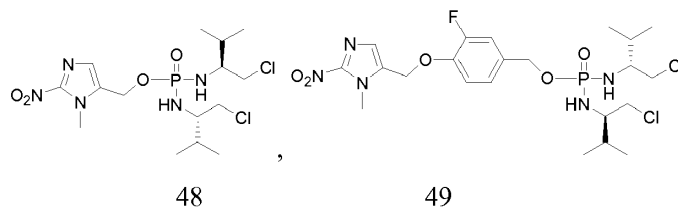
Los siguientes compuestos se producen de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6.

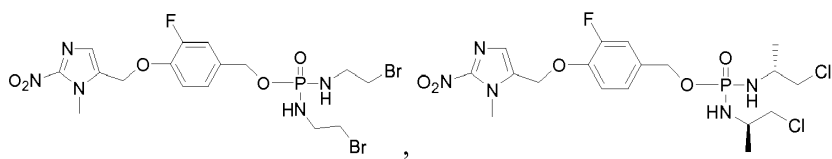


10



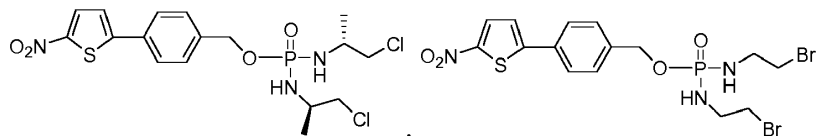
15





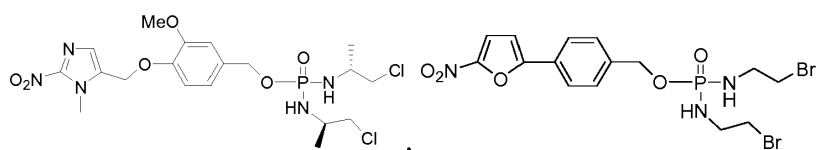
50

51



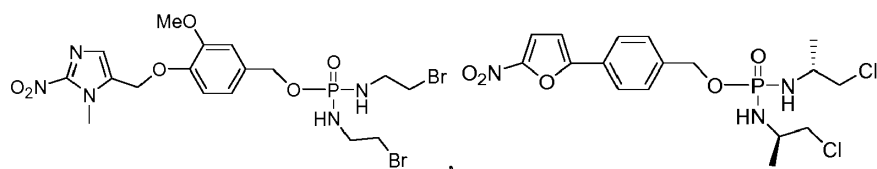
52

53



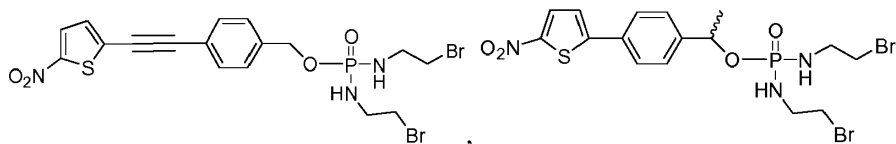
54

55



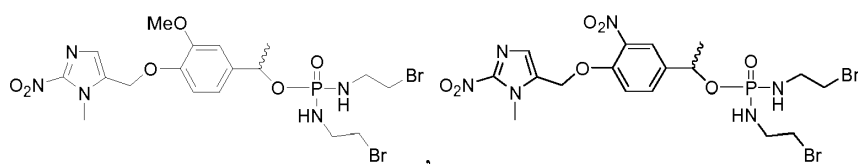
56

57



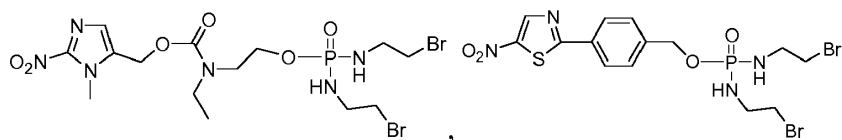
58

59



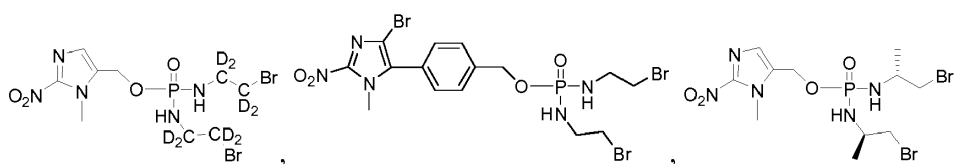
60

61



62

63



64

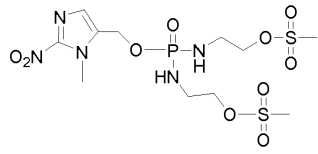
65

66

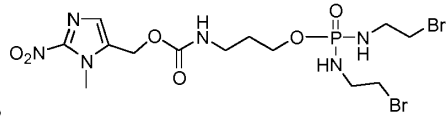
5

10

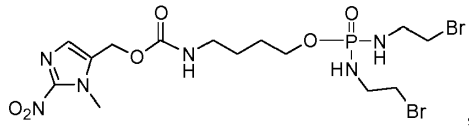
15



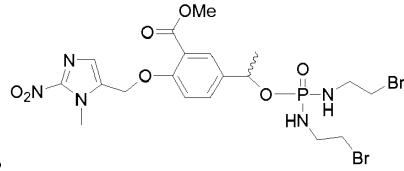
67



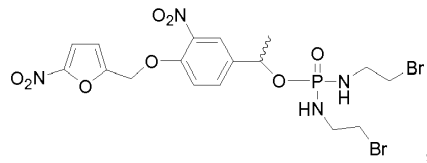
68



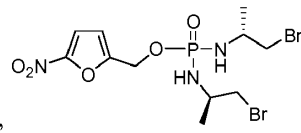
69



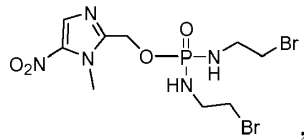
70



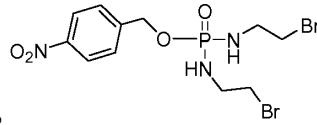
71



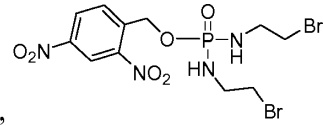
72



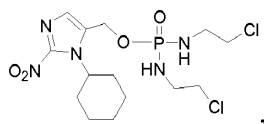
73



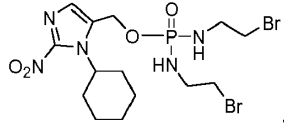
74



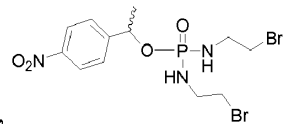
75



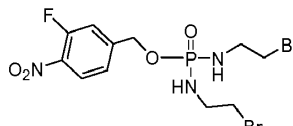
76



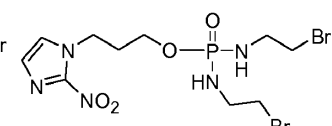
77



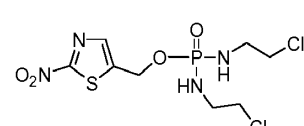
78



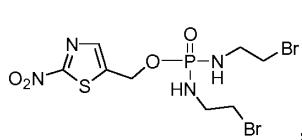
79



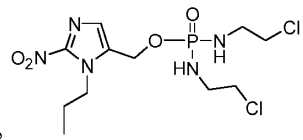
80



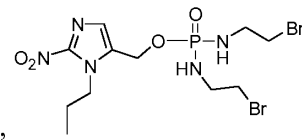
81



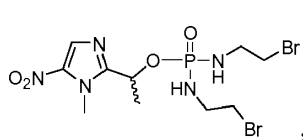
82



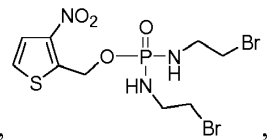
83



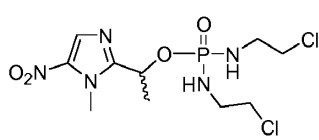
84



85



86

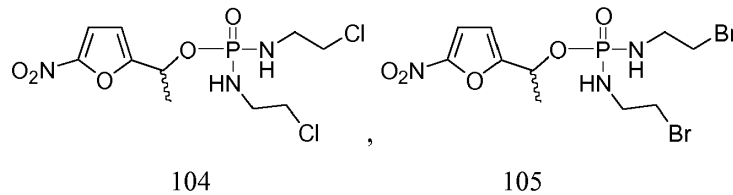
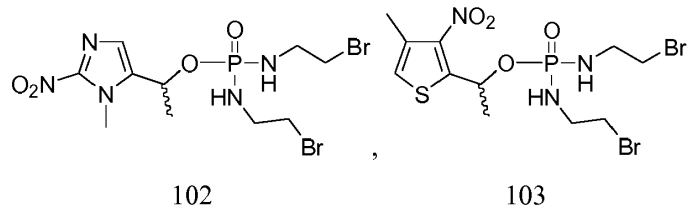
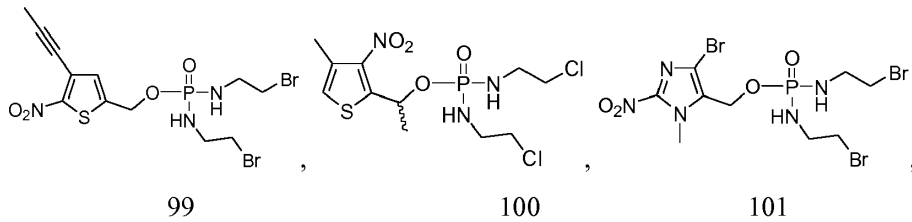
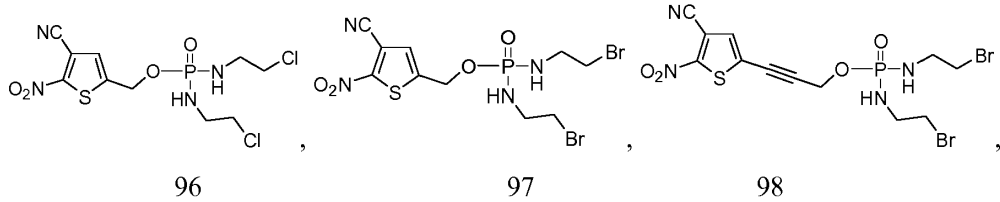
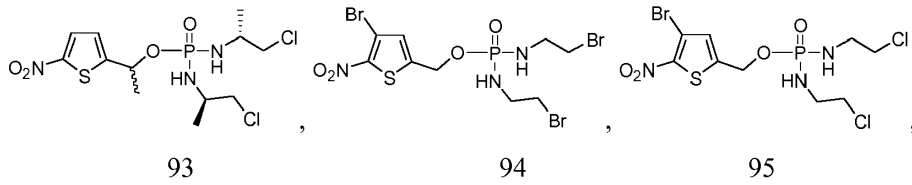
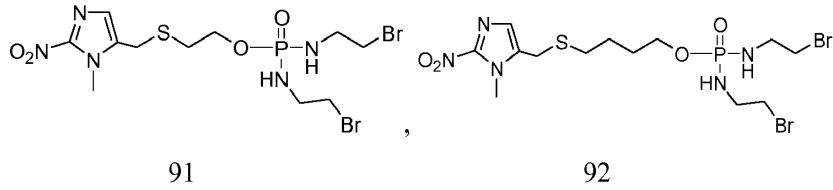
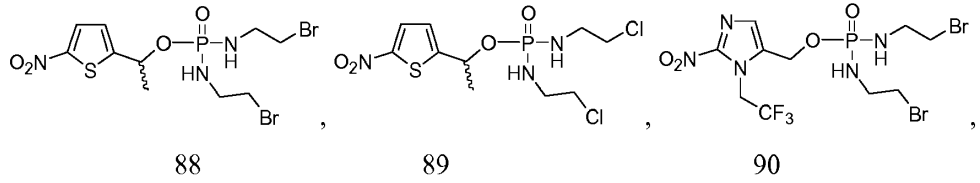


87

5

10

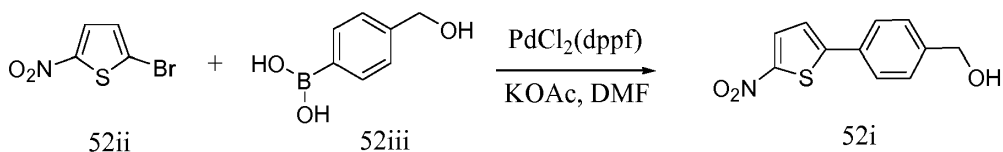
15



Los Ejemplos 10 a 22 describen la síntesis de diversos compuestos de Disparador-OH empleados en la síntesis de profármacos alquilantes de fosoramidato fármaco de la invención.

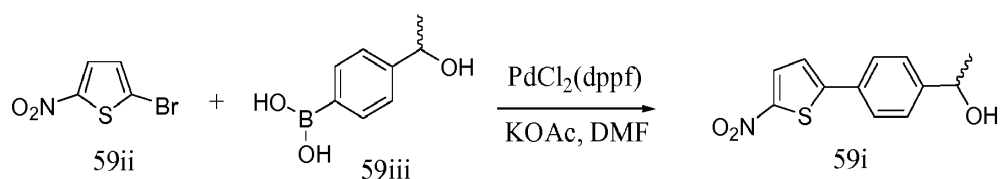
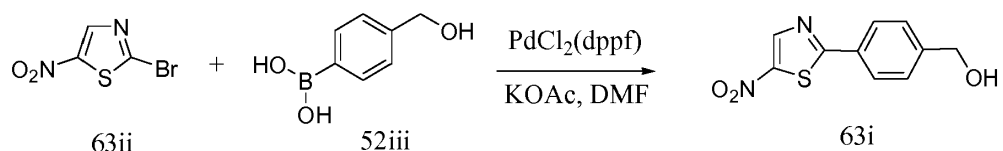
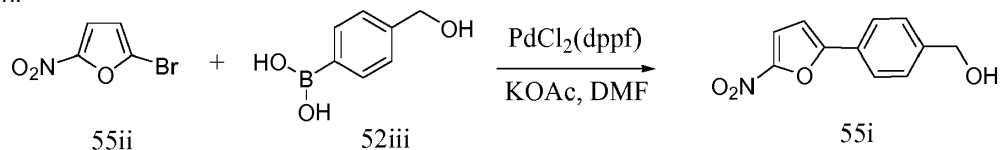
Ejemplo 10

Síntesis de Compuesto 52i (no de la invención)

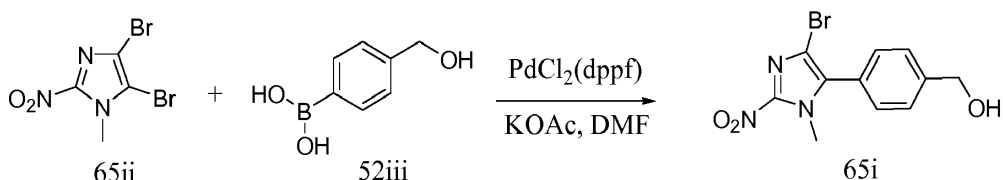


5 Una solución de 52ii compuestos (100 mg, 0,48 mmoles), 52iii (73 mg, 0,48 mmoles), y KOAc (190 mg, 1,92 mmoles) en DMF (5 ml) se desgasificó tres veces y se añadió a la misma PdCl₂(Dppf) (36 mg, 0,048 mmoles) a rt en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante dos horas, se diluyó con acetato de etilo (AE) y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó, se concentró, y el residuo se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente AE/Hex (0 - 80%) para producir 52i.

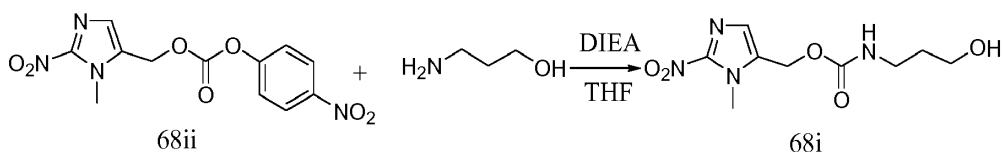
10 Los compuestos 55i, 63i, 59i, 65i, 68i y se prepararon de una manera similar como se describe esquemáticamente a continuación:



15

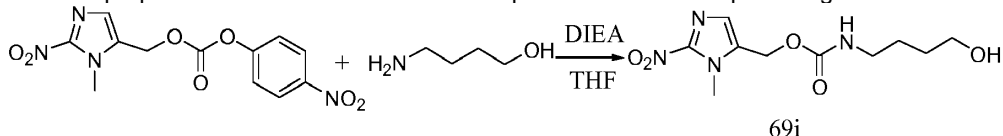


20 Ejemplo 11 (no de la invención)



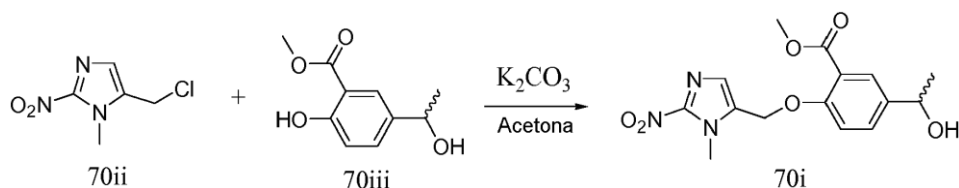
25 A una solución de los compuestos 68ii (100 mg, 0,31 mmoles) y 3-amino-1-propanol (0,047 ml, 0,62 mmoles) en THF (2,5 ml), se le añadió DIEA (0,162 ml, 0,93 mmoles) a rt. La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se concentró para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente AE/Hex (0-80%) para proporcionar el compuesto 68i.

El compuesto 69i se preparó de una manera similar a la representada en el esquema siguiente.



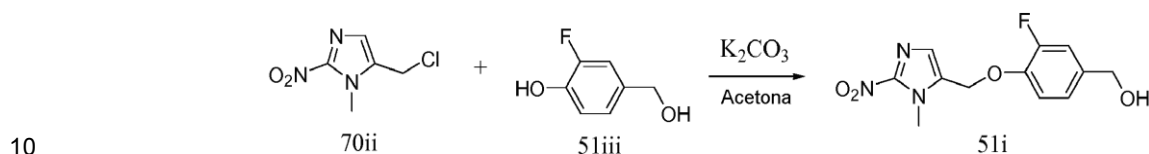
30

Ejemplo 12 (no de la invención)

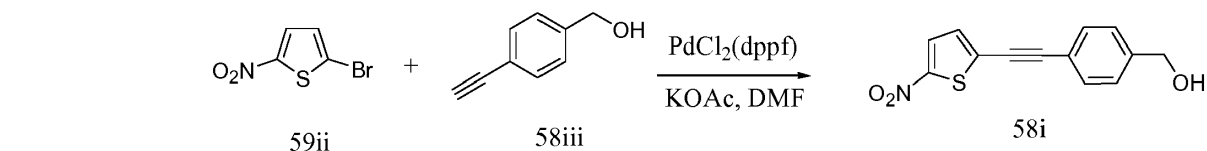


5 A una solución del compuesto 70ii (100 mg, 0,87 mmoles) y el compuesto 70iii (112 mg, 0,87 mmoles) en acetona (8 ml), se le añadió K_2CO_3 (780,6 mg, 0,87 mmoles) a rt. La mezcla de reacción se calentó a $60^\circ C$ con agitación durante 1 h, se filtró, y se concentró para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando (AE\Hex) al 0-60% para proporcionar el compuesto 70i.

El compuesto 51i se preparó de manera similar a la representada en el esquema siguiente.

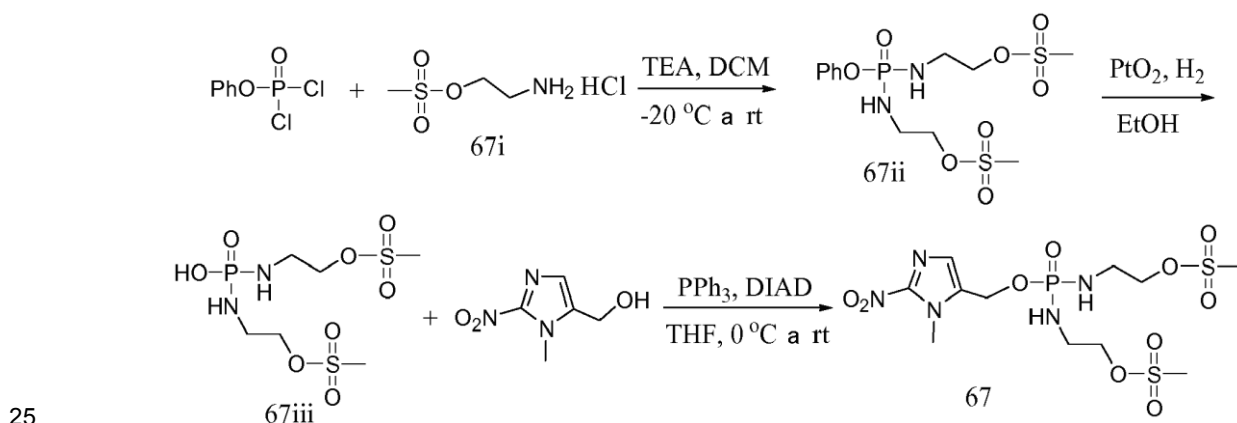


Ejemplo 13 (no de la invención)



15 Una solución del compuesto 59ii (200 mg, 0,96 mmoles) y 59iii (127 mg, 0,96 mmoles) en DMF (3 ml) se desgasificó tres veces y se añadió a la misma $PdCl_2(Dppf)$ (50 mg, 0,07 mmoles), seguido de CuI (8,5 mg, 0,043 mmoles) y TEA (0,27 ml, 1,92 mmoles), a rt, bajo atmósfera de argón y la mezcla de reacción se calentó a $60^\circ C$ durante dos horas. La mezcla de reacción se diluyó con AE, se lavó con salmuera, se separó la capa orgánica, se secó, y se concentró para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente AE\Hex (0-70%) para producir el compuesto 58i.

Ejemplo 14

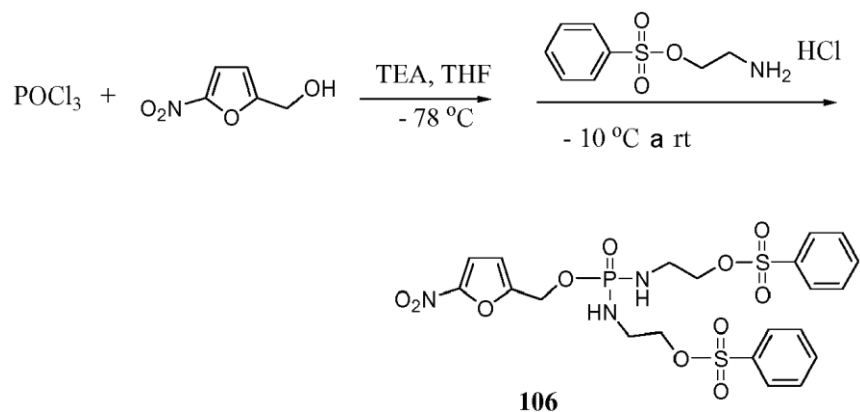


25 A una suspensión de 67i (472 mg, 2,69 mmoles) en DCM (20 ml) se le añadió diclorofosfato de fenilo (0,2 ml, 1,34 mmoles) a $-20^\circ C$, seguido de la adición gota a gota de TEA (0,75 ml, 5,38 mmoles) y agitación. La mezcla de reacción se calentó hasta rt, se agitó a rt durante 1 h, se vertió en salmuera, la capa orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron con $MgSO_4$ y se concentraron. El residuo se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente AE/hexano (10 a 100%) para producir el compuesto 67ii. A una solución del compuesto 67ii (42 mg) en EtOH (5 ml) se le añadió óxido de platino (IV) (20 mg), la mezcla de reacción se desgasificó, y se agitó vigorosamente bajo hidrógeno durante 0,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH, se filtró a través de un filtro de jeringa, el producto filtrado se concentró a vacío y se evaporó simultáneamente con tolueno para producir el compuesto 67iii. El compuesto 67iii se hizo reaccionar con 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol empleando una reacción de tipo Mitsunobu como se describe

para la síntesis del compuesto 36.

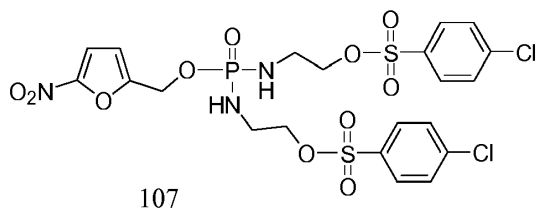
Ejemplo 15

5 Síntesis de los Compuestos 106 y 107



10 A una solución de alcohol 5-nitrofurfurílico (200 mg, 1,4 mmoles) en THF (10 ml) se le añadió POCl₃ (0,13 ml, 1,4 mmoles) a -78°C, seguido de la adición gota a gota de TEA (0,216 ml, 1,54 mmoles). La temperatura de la reacción se templó hasta -10°C en 1 h, se añadió a la misma hidrocloreuro de 2-(fenilsulfonyl)etilamina (832 mg, 3,5 mmoles), seguido de la adición de TEA (1 ml, 7 mmoles). La reacción se calentó a rt, se agitó durante 1 h, se sofocó con agua y la capa acuosa se extrajo con DCM dos veces, las capas orgánicas combinadas se secaron, se concentraron para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente acetona/tolueno (30 a 100%) para proporcionar el producto 106. El Compuesto 107

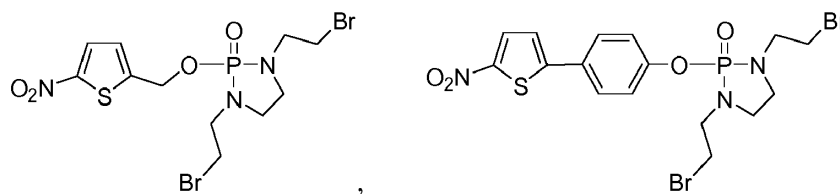
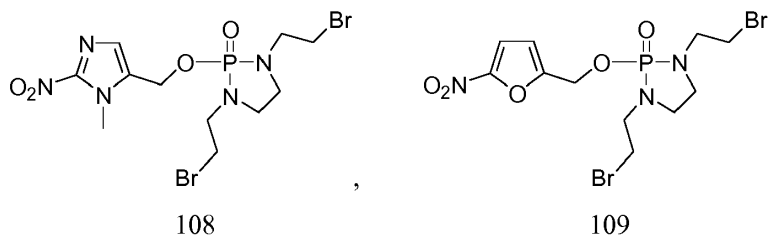
15 (no de la invención):



se sintetizó utilizando un método similar.

20

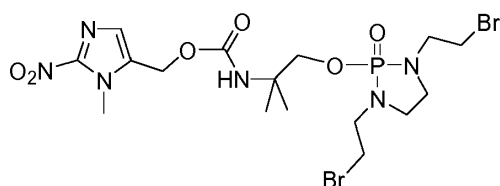
Los compuestos 108-112 (no de la invención), mostrados a continuación:



25

110

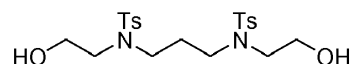
111



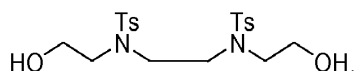
112

se sintetizaron empleando el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto 35 en el Ejemplo 3 y sustituyendo

5

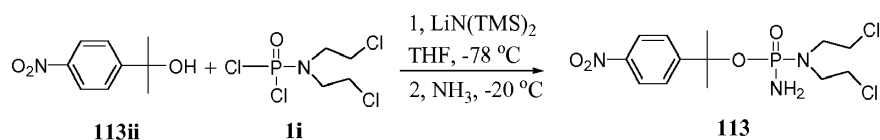


por



10 Ejemplo 16

Síntesis de los compuestos 113 a 117 (no de la invención)



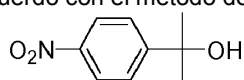
15

20

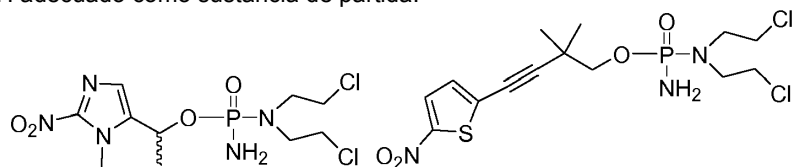
El Compuesto 113 se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7 como se describe aquí. A una solución de 113ii (181 mg, 1,16 mmoles) en THF (8 ml) se le añadió gota a gota LiN (TMS)₂ (10,2 ml, solución 1 M en THF, 1,2 mmoles) a -78°C, seguido de la adición de 1i. La mezcla de reacción se calentó hasta -20°C y se hizo burbujear NH₃ a través de la mezcla de reacción durante 5 minutos. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se extrajo tres veces con AE (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron y se concentraron para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando acetona/tolueno (30-100%) para proporcionar el compuesto 113.

25

Los compuestos 114-117 se sintetizaron de acuerdo con el método descrito para el Compuesto 13 y sustituyendo

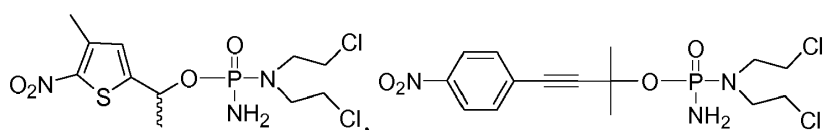


con el Disparador-OH adecuado como sustancia de partida.



114

115



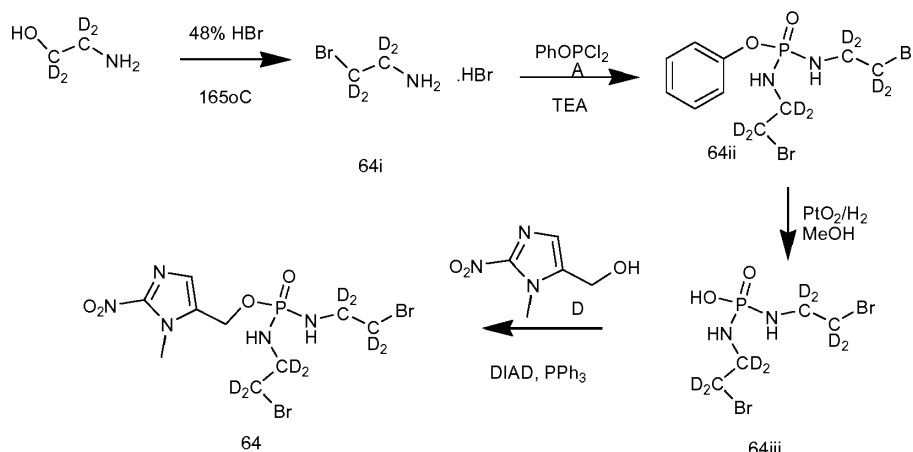
116

117

30

Ejemplo 17 (no de la invención)

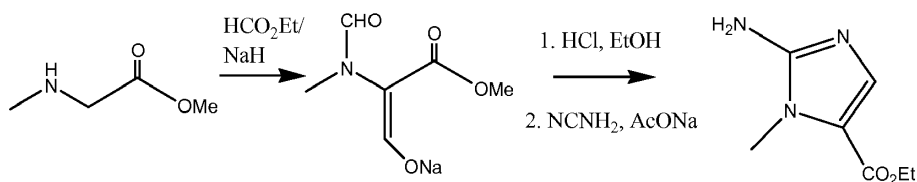
Síntesis de ifosfamida octadeuterada y del Compuesto 64 (Compuesto 25 octadeuterado)



5 Se añadió gota a gota HBr al 48% (60 ml) a d_4 -etanolamina a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a rt y después se calentó a reflujo suavemente y se destiló lentamente, recogiendo 16 ml de líquido en 2 horas hasta 155°C (baño de aceite). Este fue sustituido dos veces por 60 ml de HBr al 48% y la destilación continuó durante 5 horas más. Se recogieron 90 ml de líquido. La solución resultante se calentó a 165°C durante 2 horas y se evaporó a vacío. El residuo se recristalizó en etanol absoluto (10 ml)-acetato de etilo (30 ml) hasta 11,3 g de hidrobromuro de d_4 -2-bromoetamina (compuesto 64i). Se añadió gota a gota el compuesto 64i (19,5 mmoles, 1,0 eq.) a una suspensión de hidrobromuro de d_4 -2-bromoetamina (40,0 mmoles, 2,05 eq.) en DCM seco (100 ml) en atmósfera de argón, a -20°C, seguido de la adición gota a gota de TEA (81,9 mmoles, 4,2 eq.) a -20°C. La mezcla de reacción se agitó a -20°C durante 0,5 h, y a rt durante 2 h, se vertió en agua y se extrajo dos veces con DCM (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida para producir un residuo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando hexano/AE como eluyente (100: 70 (v/v)) para proporcionar 7,0 g del compuesto 64ii. Se añadió PtO_2 (0,7 g) a una solución del compuesto 64ii (7,0 g) en MeOH (160 ml), la mezcla de reacción se desgasificó y se intercambió por H_2 tres veces, se agitó bajo H_2 durante 3 h a rt, y se diluyó con MeOH hasta que se disolvió el sólido de color blanco en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción diluida se filtró, el producto filtrado se concentró a presión reducida para producir un residuo que se lavó con éter anhidro dos veces para proporcionar 2,9 g del compuesto 64iii. A una suspensión del compuesto 64iii (1,92 g 1,0 eq.), 1-N-metil-2-nitroimidazolmetanol (1,01 g, 1,1 eq.), y PPh_3 (2,39 g, 1,5 eq.) en THF (20 ml) se le añadió DIAD (1,76 ml, 1,5 eq.), bajo argón, a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas mientras se calentaba de 0°C a rt, después de lo cual las sustancias volátiles se eliminaron a vacío para producir un residuo. El residuo se separó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice empleando como eluyente acetona/tolueno (100:70 (v/v)) para proporcionar 1,35 g del compuesto 64.

25 Ejemplo 18 (no de la invención)

Síntesis de éster etílico de ácido 1-N-metil-2-amino-imidazol-5-carboxílico



30 Se añadió formiato de etilo (500 ml) a hidrocloreto del éster metílico de sarcosina (82 g, 585,7 mmoles, triturado hasta polvo antes de la reacción) contenido en un matraz de fondo redondo de 1 L. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo-agua, se agitó, se conectó una salida de gas al matraz, se añadió lentamente NaH (suspensión en aceite al 60%, 54 g, 1,35 mol) durante un periodo de 2 h, y se agitó a rt durante aproximadamente 14 h. Las sustancias volátiles se eliminaron utilizando un evaporador rotatorio para proporcionar un residuo que se trituró dos veces con hexano (500 ml) para proporcionar una pasta pegajosa de color pardo claro que se disolvió en etanol (400 ml) y HCl conc. (50 ml) y se agitó a 110°C durante 1,5 h. Después la mezcla de reacción se enfrió, el precipitado de color blanco se separó mediante filtración y el residuo se lavó con 2 x 25 ml de etanol. El producto filtrado se evaporó para proporcionar un aceite espeso de color pardo al que se añadió HOAc acuoso al 10%, H_2NCN (45 g, 1,07 mol), y acetato de sodio (88 g, 1,07 mol). La mezcla de reacción se agitó a 90-100°C durante 1,5 h para proporcionar una solución transparente que se enfrió, su pH se ajustó a 1 con HCl concentrado y la solución resultante se concentró hasta 1/5 de su volumen original utilizando un evaporador rotatorio a una temperatura no

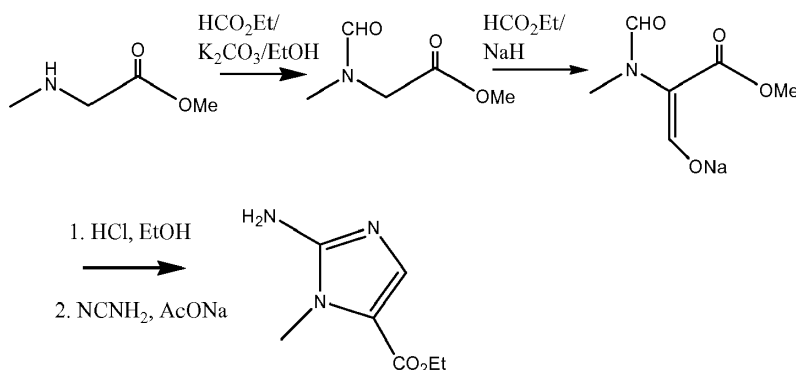
mayor de 45°C. La mezcla de reacción concentrada se neutralizó cuidadosamente mediante la adición de K_2CO_3 a un pH de 8-9 y se extrajo con AE (5 x 200 ml, seguido de 3 x 50 ml). Las capas de acetato de etilo combinadas se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y las sustancias volátiles se eliminaron para proporcionar 48 g de éster etílico de ácido 1-N-metil-2-amino-imidazol-5-carboxílico.

5

Ejemplo 19 (no de la invención)

Síntesis de éster etílico de ácido 1-N-metil-2-amino-imidazol-5-carboxílico

10



15

20

25

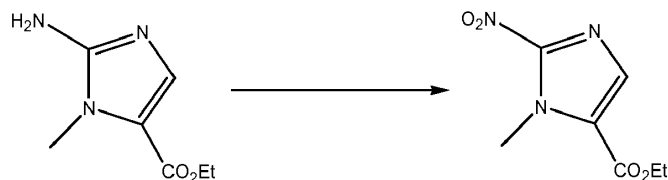
30

Se añadió formiato de etilo (850 ml) a sal de HCl de éster metílico de sarcosina (205 g, 1,46 mol, triturada hasta un polvo antes de su uso), carbonato de potasio (205 g, 1,48 mol) y EtOH (800 ml), se agitó durante la noche a rt, y se filtró. El producto filtrado se concentró en un evaporador rotatorio durante lo cual el residuo se separó en dos capas. La capa superior se separó y la capa inferior se extrajo con AE. Las capas AE se combinaron y la capa superior se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró para proporcionar 185 g (81%) de éster metílico de N-formilsarcosina que se utilizó para la siguiente reacción. Se añadió cuidadosamente NaH (suspensión al 60% en aceite, 16,0 g, 0,4 moles) en varias porciones en 1 h a una mezcla de éster metílico de N-formilsarcosina (50 g, 0,34 mol) y formiato de etilo (160 ml) enfriada en un baño de hielo-agua. La mezcla de reacción se agitó, la temperatura se elevó a rt, y la agitación continuó durante la noche. La mezcla de reacción se trituró dos veces con hexano (100 ml cada vez), el residuo se disolvió en EtOH (100 ml) y HCl concentrado (60 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 110°C. Después de 1 h, la mezcla de reacción se enfrió, se filtró, el residuo se lavó con EtOH y el producto filtrado se concentró para proporcionar un aceite espeso de color pardo. Se añadió el aceite a HOAc al 10% en agua (200 ml), NH_2CN (35 g) y acetato de sodio (90 g), se agitó a 95°C. Después de 1 h la mezcla de reacción se concentró hasta 1/3 de su volumen original en un evaporador rotatorio y su pH se ajustó a aproximadamente 9 mediante la adición de carbonato de sodio. La mezcla de reacción se extrajo con AE (8 x 100 ml), las capas de AE combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron para producir un residuo que se purificó mediante recristalización para producir éster etílico de ácido 1-N-metil-2-amino-imidazol-5-carboxílico ("aminoéster").

Ejemplo 20 (no de la invención)

Síntesis de éster etílico de ácido 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-carboxílico

35



40

45

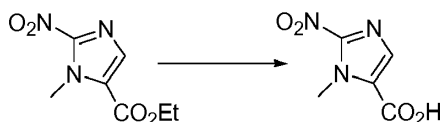
Una solución del aminoéster (36,94 g, 0,218 mol) en 200 ml de ácido acético se añadió gota a gota a una solución de nitrito de sodio (100 g, 1,449 mol) y agua (300 ml) se enfrió en un baño de hielo-agua, y se agitó. La temperatura de la mezcla de reacción, que se midió para que fuera de alrededor de -5 a 10°C se elevó a rt y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se extrajo con DCM (3 x 150 ml). Las capas de DCM combinadas se secaron y se evaporaron para producir un residuo rojizo que se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente AE/hexano (30%) para proporcionar éster etílico de ácido 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-carboxílico ("nitroéster") en forma de un sólido de color pardo claro (27 g, rendimiento 62%).

Este método descrito anteriormente y empleando ácido acético acuoso es una mejora del método que utiliza ácido

sulfúrico a aproximadamente 7% (v/v) para la formación de iones de diazonio a partir del aminoéster. Utilizando ácido sulfúrico acuoso, el volumen de reacción se vuelve grande causando dificultad en la agitación eficaz de la mezcla de reacción. Por ejemplo, una reacción que implica 150 g del éster amino requiere un volumen de la mezcla de reacción de aproximadamente 12 L. El nitroéster pegajoso se formó como producto en ácido sulfúrico acuoso e interrumpió la agitación de la mezcla de reacción.

Ejemplo 21 (no de la invención)

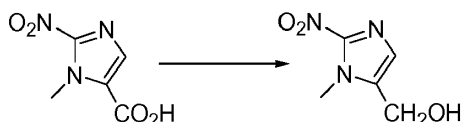
Síntesis de ácido 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-carboxílico



Una suspensión del nitroéster (39,2 g, 196,9 mmoles) en NaOH (600 ml) y agua (200 ml) se agitó a rt durante aproximadamente 20 horas para proporcionar una solución transparente de color pardo claro. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a aproximadamente 1 mediante la adición de HCl conc. El HCl y la mezcla de reacción se extrajeron con AE (5 x 150 ml). Las capas de acetato de etilo combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para proporcionar ácido 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-carboxílico ("nitroácido") en forma de un sólido de color pardo claro (32,2 g, 95%).

Ejemplo 22 (no de la invención)

Síntesis de 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-metanol

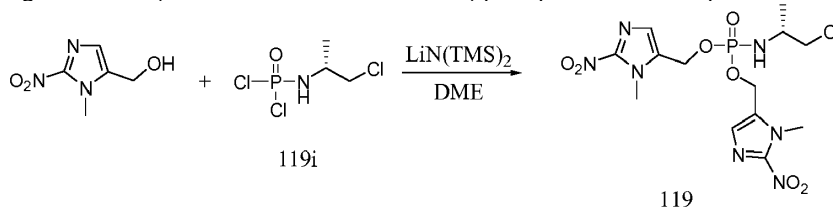


Una mezcla del nitroácido (30,82 g, 180,23 mmoles) y trietilamina (140 ml, 285 mmoles) en THF anhidro (360 ml) se agitó mientras la mezcla de reacción se enfriaba en un baño de hielo seco-acetonitrilo (temperatura < -20°C). Se añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (37,8 ml, 288 mmoles) a esta mezcla de reacción enfriada durante un período de 10 min y se agitó durante 1 h seguido de la adición de borohidruro de sodio (36 g, 947 mmoles) y adición gota a gota de agua durante una periodo de 1 h mientras se mantenía una temperatura de alrededor o inferior a 0°C. La mezcla de reacción se calentó hasta 0°C. El sólido se separó mediante filtración y se lavó con THF. Las porciones de THF combinadas se evaporaron para proporcionar 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-metanol en forma de un sólido de color naranja (25 g) que se recristalizó en acetato de etilo.

Ejemplo 23 (no de la invención)

Síntesis del compuesto 119

A una suspensión de 1-N-metil-2-nitro-imidazol-5-metanol (50 mg, 0,32 mmoles) en DME, se le añadió LiN(TMS)₂ a -78°C con agitación vigorosa. Después de 10 min, se añadió el compuesto 119i (67 mg, 0,32 mmoles) y la mezcla de reacción se calentó a rt. Después de 1 h, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se separó mediante cromatografía sobre gel de sílice (acetona al 0 - 100% \ tolueno) para producir el Compuesto 119.



Ejemplo 24

La solubilidad de los siguientes compuestos es la indicada a continuación:

Compuesto	Solubilidad (en solución salina a temperatura ambiente)
10	10 mg/mL
25	15 mg/mL

Compuesto	Solubilidad (en solución salina a temperatura ambiente)
73	10 mg/mL

Ejemplo 25

Análisis Antiproliferación

5 Para determinar el efecto de los profármacos alquilantes de fosforamidato sobre la proliferación celular, se sometió a ensayo la actividad antiproliferativa de estos compuestos en un análisis basado en Alamar Blue de múltiples pocillos. Se comparó el crecimiento celular en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, medido mediante un lector de placa de fluorescencia a una excitación de 550 nm y una emisión de 590 nm (véase Biosource International Inc., Tech Application Notes, *Use of Alamar Blue in the measurement of Cell Viability and Toxicity*, Determinación de la CI_{50}). Se sometieron a ensayo las siguientes líneas celulares con 20.000 células/pocillo/500 μ L de medio: células NCI-H460 (ATCC HTB-177, medio RPMI (Gibco Products, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)), células HT29 (ATCC HTB-38, medio RPMI (Gibco)), células MES-SA (ATCC CRL-1976, medio de McCoy 5a (ATCC)), células MES-SA/Dx5 ((ATCC CRL-1977), medio de McCoy 5a (ATCC)), células ACHN (ATCC CRL-1611, Medio esencial mínimo, Eagle (ATCC)), células PC3 (ATCC CRL-1435, medio F12K de Ham (ATCC)). Las células se sembraron en insertos de vidrio colocados en cada uno de los pocillos de una placa de 24 pocillos a la densidad y en el medio especificados más arriba un día antes del ensayo con el compuesto. Después de 24 horas, estas placas se dividieron en dos grupos – grupo con anoxia y grupo con aire. Se añadió un compuesto de ensayo a cada pocillo (volumen 200 μ L) en los grupos de tratamiento a concentraciones que variaban de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, a 0,01 μ M. Todos los compuestos de ensayo fueron diluidos seriadamente en medio completo con concentraciones finales de DMSO menores o iguales a 1% en cada pocillo. Las células del grupo de tratamiento con anoxia se incubaron durante 2 horas en una cámara anaeróbica Bactron II. Las células del grupo de tratamiento con aire se incubaron durante 2 horas en incubadoras para el cultivo de tejidos convencionales. Después del tratamiento de 2 horas con un compuesto de ensayo, el compuesto de ensayo se retiró de cada pocillo, las células se lavaron con 500 μ L de medio, y se incubaron durante 3 días en 500 μ L de medio de nueva aportación. Después de 3 días, las células se tiñeron con Alamar Blue al 10% durante 2 horas después de lo cual se midió la capacidad de las células para proliferar (como se ha mencionado antes), y se calculó la concentración inhibidora del crecimiento del 50% (GI_{50} (también referida como CI_{50} en la presente memoria)) de los compuestos de ensayo y se tabuló en la Tabla X de más abajo.

30

Tabla X: Valores de CI_{50} (μ M)

Compuesto	H460 Anoxia/Aire	HT29 Anoxia/Aire	MES-SA Anoxia/ Aire	MES-SA/Dx5 Anoxia/Aire	ACHN Anoxia/ Aire	PC3 Anoxia/Aire
23	0,04 / 5	7,5 / -				
23	0,1 / 14					
36	0,88 / >100	55 / >100	5 / > 100	7,5 / >100		
25	0,15 / 86	16 / >100	0,9 / >100	0,3 / >100	0,2 / 62	0,6 / >100
26	0,1 / 35					
10	100 / >100					
24	0,01 / 4		0,1 / 2	0,1 / 0,8		
27	25 / 100					
34	0,01 / 1,8	0,8 / 57	0,13 / 10			
74	>100 / >100					
75	9/26					
76	9 / >100					
77	1,6 / 5,5					
78	>100 / >100					
79	3,5 / 3,5					
118	>100 / >100					

ES 2 579 235 T3

Compuesto	H460 Anoxia/Aire	HT29 Anoxia/Aire	MES-SA Anoxia/ Aire	MES-SA/Dx5 Anoxia/Aire	ACHN Aire	Anoxia/ Aire	PC3 Anoxia/Aire
80	>100 / >100						
81	0,05 / 0,3						
82	0,03 / 0,02						
83	0,3 / >100						
84	0,003 / 40						
85	0,7 / 100						
86	1,4 / 3						
119	0,3 / >100						
37	0,36 / >100						
87	22 / > 100						
88	0,03 / 0,53						
89	0,33 / 3,7						
90	0,01 / 3,4						
38	0,33 / >100						
106	0,09 / 3,5						
107	0,06 / 2,8						
108	1,1/>100						
109	0,3 / 13						
110	0,3 / 21						
39	0,2 / 5						
91	- / >100						
92	>100 / >100						
41	- / 7						
42	0,5 / 9						
93	0,1 / 3,8						
94	0,3 / 2						
95	- / 2,7						
96	0,1 / 0,1						
43	2 / 60						
44	3 / 100						
45	6 / >100						
46	5 / > 100						
47	4 / >100						
48	- / >100						
97	0,01 / 0,1						
49	- / >100						
50	0,1 / 3						
98	0,1 / 2						
51	3 / 7						

ES 2 579 235 T3

Compuesto	H460 Anoxia/Aire	HT29 Anoxia/Aire	MES-SA Anoxia/ Aire	MES-SA/Dx5 Anoxia/Aire	ACHN Aire	Anoxia/ Aire	PC3 Anoxia/Aire
52	15 / 20						
53	3 / 10						
99	0,1 / 1						
100	0,5 / 35						
54	1 / 60						
55	5 / 12						
56	0,5 / 10						
57	14 / 100						
111	50 / 100						
58	5 / 10						
59	2 / 6						
60	15 / 15						
61	0,3 / 4						
62	2 / 45						
63	1 / 8						
112	70 / > 100						
103	0,02 / 2						
113	1 / 100						
65	25 / 75						
114	1 / 80						
115	0,5 / 5						
116	0,5 / 15						
66	0,3 / 100						
67	48 / >100						
68	100 / >100						
69	71 / >100						
70	2 / 65						
117	8 / 70						
71	0,1 / 0,1						
72	0,5 / 12						
104	0,4 / 12						
105	<0,1 / 1						

Ejemplo 26

Análisis Antiproliferación – Dependencia de Oxígeno

5 Para determinar la dependencia del oxígeno de los profármacos alquilantes de fosforamidato, se sometió a ensayo la actividad antiproliferativa de estos compuestos en un análisis basado en Alamar Blue de múltiples pocillos como se ha descrito previamente (véase el Ejemplo 25). Se sembraron células NCI-H460 (ATCC HTB-177, medio RPMI (Gibco)) o HT29 (ATCC HTB-38, medio RPMI (Gibco)) a 20.000 células/pocillo/500 µL de medio en insertos de vidrio en placas de 24 pocillos un día antes del ensayo. Las células se incubaron durante 2 horas en una cámara anaeróbica Bactron II purgada con gases con las concentraciones de oxígeno deseadas que variaban desde la

10

ES 2 579 235 T3

anoxia, oxígeno al 0,1%, 0,3%, 0,6%, 1%, 10%, y aire. Los valores de Cl_{50} calculados (μM) se tabulan en la Tabla Y1 (células H460) o en la Tabla Y2 (células HT29) de más abajo.

Tabla Y1: Valores de Cl_{50} (μM) en células H460

Compuesto	N ₂	0,1% O ₂	0,3% O ₂	0,6% O ₂	1% O ₂	10% O ₂	Aire
23	0,05	5		6	5		5
36	1	30		60	60	>100	>100
25	0,1	1	3	5	10	25	55
26	0,3	3		6	5	10	40
10	>100	>100		>100	>100		>100
24	0,007			0,85			>1
34	0,01		1				5
84	0			3			40
119	0,3			>100			>100
37	0,5			25			>100
88	0,03		0,5	0,2			0,5
38	0,4			45	>100		
106	0,1			0,7			4
108	1			>100			>100
109	0,3			10			15
110	0,3			3			25
44				45			>100
46				50			100
47				60			100
97	0,006			0,01			0,02
49				100			100
50				3			3
98				0,5			2
51				7			7
52				10			20
53				5			10
99				0,5			1
100	0,5			10			35
54	1			30			60
55	5			8			12
56	0,5			8			10
61	0,3			4			4
62	2			30			45
63	1			15			8
113	1			>100			>100
114	1			5			80
66	0,3			20			100

Compuesto	N ₂	0,1% O ₂	0,3% O ₂	0,6% O ₂	1% O ₂	10% O ₂	Aire
70	2			30			65

Tabla Y2: Valores de CI₅₀ (μM) en células HT29

Compuesto	N ₂	0,1% O ₂	0,3% O ₂	0,6% O ₂	1% O ₂	10% O ₂	Aire
25	2			25			>100

5 Ejemplo 27

Análisis Clonogénico – Dependencia de Oxígeno

Para determinar la dependencia de oxígeno de los profármacos alquilantes de fosforamido, se llevó a cabo un análisis de supervivencia clonogénica. Se cultivaron en placa las células en bandejas de vidrio de 60 mm (5x10⁵ células por bandeja en 5 mL de medio) 2 días antes de someter a ensayo el compuesto. Se sometieron a ensayo las siguientes líneas celulares: células NCI-H460 (ATCC HTB-177, medio RPMI (Gibco)), células HT29 (ATCC HTB-38, medio RPMI (Gibco)), células PC3 (ATCC CRL-1435, medio F12K de Ham (ATCC)). Se elaboró una solución del compuesto de ensayo en medio completo inmediatamente antes del ensayo y se añadió directamente a las células (volumen 2 mL). Se lograron la anoxia o la hipoxia (menos de 200 ppm de O₂) exponiendo las bandejas de vidrio a una cámara anaeróbica Bactron II o en recipientes de aluminio (véase el Ejemplo 13) durante 2 horas. Para la cámara anaeróbica, se lograron los niveles deseados de oxigenación entre 200 ppm y aire purgando la cámara anaeróbica con gases pre-calibrados antes de la experimentación. Para los recipientes de aluminio, se lograron la anoxia o la hipoxia exponiendo las bandejas de vidrio en guías de aluminio herméticas, pre-calentadas a una serie de cinco evacuaciones rápidas y purgados con 95% de nitrógeno más 5% de dióxido de carbono en un baño de agua a 37°C sobre una plataforma de sacudimiento (los controles también se purgan). Después de la quinta evacuación y purgado, la plataforma (con baño de agua y guías) se sacudieron durante 5 minutos, después de lo cual se llevaron a cabo una evacuación y purgado más, y las guías se transfirieron a un aparato de sacudimiento en una incubadora a 37 grados C durante las 1 a 2 horas restantes de exposición al fármaco. Los niveles de oxigenación entre 200 ppm y aire se lograron variando el grado y el número de las evacuaciones. Se verificaron las concentraciones de oxígeno en el medio y las fases gaseosas utilizando un electrodo de oxígeno (Anima, Phoenixville, PA) en una guía de aluminio especialmente modificada que permitía el control de las fases tanto gaseosas como líquidas. Después de la exposición al fármaco, las bandejas de vidrio se retiraron de la cámara o de los recipientes de aluminio y el fármaco se separó de las células por lavado, enjuagando con el medio. Después las células se tripsinizaron y se cultivaron en placa para determinar la supervivencia clonogénica en placas de Petri de plástico. De 10 a 14 días más tarde, las bandejas se tiñeron con cristal violeta (0,25% en etanol del 95%), y se contaron las colonias que contenían más de 50 células (véase el Ejemplo 13). Se calculó la concentración inhibidora del 90% del crecimiento (CI₉₀, eliminación 90%, supervivencia 10%) de los compuestos de ensayo y se tabuló en la Tabla Y3 de más abajo.

35

Tabla Y3: Valores de CI₉₀ (μM)

Compuesto (Línea Celular)	N ₂	0,1% O ₂	0,6% O ₂	Aire
25 (H460)	0,1	0,4	5	30
25 (HT29)	0,2		3	40
25 (PC3)	0,3			50
24 (H460)	0,07		0,25	14
37 (H460)	0,2		5	90
70 (H460)	2		8	20

Ejemplo 28

40 Electroquímica

Para determinar las propiedades electroquímicas y los potenciales de reducción de los profármacos alquilantes de fosforamido, se generaron voltamogramas cíclicos de estos compuestos por medio de Bioanalytical Systems, Inc. Todos los experimentos se llevaron a cabo sobre electrodos de trabajo de carbono vítreo (3,0 mm de diámetro), electrodos de referencia de Ag/AgCl, y electrodos auxiliares de alambre de platino. Los compuestos se disolvieron en 1 mL de metanol para obtener concentraciones finales de fármaco entre 0,5 y 1,5 mM después de la adición de 9

45

5 mL de Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS). La solución se añadió a un vial con una pila electroquímica y se purgó con Argón durante 5 minutos para eliminar la mayor parte del oxígeno. Se realizó una voltametría cíclica a velocidades de barrido de 100 mV/seg y 10.000 mV/seg en un electrodo de trabajo de carbono vítreo. Se realizó una ronda de ensayo en un electrodo de mercurio CGME (CGME en modo SMDE, 150 µm de diámetro capilar, tamaño de gota 8), pero se observó poca diferencia entre los voltamogramas de mercurio y carbono vítreo, de manera que el electrodo de mercurio no se utilizó más. Se generaron los potenciales de reducción de un solo electrón o de múltiples electrones de los compuestos a cada velocidad de barrido y se tabulan en la tabla de más abajo.

Tabla: Potenciales de Reducción (mV)

Compuesto	100 mV/seg	10.000 mV/seg
36	-609	-634
25	-594	-626
24	-568	-636
34	-584	-663
78	-704	-746
82	-428, -610	-414, -769
88	-559	-629
108	-614	-593
103	-638, -769, -875	-756
2-NO ₂ -Imidazol	-634	-693
5-NO ₂ -Furano	-487	-638
4-NO ₂ -Benceno	-712, -1106	-735, -1268

10 Ejemplo 29

Análisis de Supervivencia Clonogénica

15 Se sometieron a ensayo los profármacos alquilantes de fosforamidato de la invención en el siguiente análisis. Se sembraron células H460 humanas en crecimiento exponencial (obtenidas de la ATCC) en placas de vidrio con muescas de 60 mm a una densidad de entre 2,5 y 5 x 10⁵ células por placa y se hicieron crecer en medio RPMI con un suplemento de suero bovino fetal al 10% durante 2 días antes de iniciar el tratamiento con el fármaco. El día del ensayo, se prepararon soluciones de partida de fármaco de concentraciones conocidas en medio completo, y se añadieron 2 ml de la solución de partida deseada a cada placa. Para lograr un equilibrio completo entre la fase gaseosa circundante y la fase líquida, se retiró la tapa de la placa de vidrio y la placa se sacudió durante 5 minutos sobre un aparato de sacudimiento orbital. Las placas se recuperaron y se almacenaron en el interior de una caja de manipulación con guantes. La caja de manipulación con guantes se evacuó y se gaseó o bien con una mezcla gaseosa anóxica certificada (95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono) o bien con una mezcla gaseosa aerobia (normóxica) (95% de aire y 5% de dióxido de carbono). Después las células se incubaron con el fármaco durante 2 horas a 37°C.

30 Al final del tratamiento con el profármaco, se retiraron las placas de cada recipiente, y el profármaco fue rápidamente retirado de las células. Las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y una solución de tripsina-EDTA y después se trataron con tripsina durante 5 minutos a 37°C. Las células separadas se neutralizaron con medio más suero y se recogieron por centrifugación durante 5 min a 100 xg. Las células se resuspendieron a aproximadamente 1x10⁶ células/ml y se diluyeron 1:10 para producir concentraciones de partida para el cultivo en placa. La concentración de cada solución de partida se determinó mediante recuento con un contador de partículas Coulter Z2. Se cultivaron en placa números conocidos de células, y las placas se colocaron en una incubadora entre 7 y 10 días. Las colonias se fijaron y se tiñeron con una solución de etanol del 95% y cristal violeta al 0,25%. Se contaron las colonias de más de 50 células, y se determinó la fracción superviviente.

40 Se llevaron a cabo análisis clonogénicos basados en células HT29 de la misma manera que se ha descrito más arriba y en el Ejemplo 27.

Se determinó la citotoxicidad de los compuestos (Tablas 1A y 1B) en hipoxia y en normoxia mediante análisis clonogénico empleando las líneas celulares H460 y HT29 proporcionadas en el Ejemplo 11 y se expresó como la CI₉₀ en µM, y mediante análisis anti-proliferación realizado modificando un análisis de múltiples pocillos descrito por

Hay et al., J. Med. Chem., 2003, 46:169-82 empleando las líneas celulares H460, HT29, HCT116, y DX-5 y se expresó como la CI_{50} en μM (véase el Ejemplo 9). La razón de CI_{50} o CI_{90} determinada en normoxia e hipoxia se denomina razón de citotoxicidad en hipoxia (HCR) y puede ser una medida de la citotoxicidad selectiva en hipoxia de los profármacos de la presente invención.

5

Tabla 1A (H460)

Núm. de Comp.	logP	Hipoxia		Normoxia		HCR	
		P	C	P	C	P	C
10		100		>100		>1	
23		0,04	0,2	5	10	125	50
24		0,01		4		400	
25		0,05		50		1000	
26		0,1		35		350	
27		2,5		100		40	
34		<0,01		1,8		>180	
36	-0,1	0,88	0,2	>100	>100	>110	>500

Tabla 1B

Núm. de Comp		HT29						DX-5				HCT116					
		P		C		HCR		P		HCR		P		HCR			
		H	N	H	N	P		C	H	N			H	N			
23	7,5		2														
36	55(35)	>100	3		>2		7,5	>100	>13	5		>100	>20				
25	16	>100			>6		1	>100	>100	0,9		>100	>100				
34	0,8	57			70					0,13		10	77				

P = Proliferación; C = Clonogenica; H = Hipoxia; N = Normoxia

10 Ejemplo 30

Efecto del Compuesto 25 sobre la Distribución del Ciclo Celular

15 Se sembraron las células (H60, PC3 y HT29) a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/3 ml de medio por placa de 60 mm. Después de 24 h de anclaje, las células se expusieron al Compuesto 25 a las concentraciones indicadas durante 2 h o bien en normoxia (aire) o bien en anoxia (nitrógeno). Las células se lavaron dos veces, y se incubaron durante 22 h más en medio de nueva aportación. Las células se trataron con tripsina, se centrifugaron, y se fijaron en etanol del 75% al menos durante 24 h a $-20^{\circ}C$. Se determinó la distribución del ciclo celular utilizando el reactivo para el Ciclo celular Guava (Guava, Hayward, CA) mediante citometría de flujo (Guava, Hayward, CA). Los datos demuestran que el Compuesto 25 induce la detención del ciclo celular de una manera dependiente del oxígeno y de la concentración en múltiples líneas celulares cancerosas humanas.

20

		Células H460		
μM		G_0/G_1	S	G_2/M
0	Aire	56	12	30
	Nitrógeno	59	11	26
0,005	Aire	38	18	42
	Nitrógeno	50	12	38
0,05	Aire	58	11	28

ES 2 579 235 T3

		Células H460		
μM		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
	Nitrógeno	30	7	59
0,5	Aire	58	11	28
	Nitrógeno	23	31	40
5	Aire	42	6	59
	Nitrógeno	47	15	17
50	Aire	14	19	65
	Nitrógeno	33	14	11
		células PC3		
μM		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	Aire	54	13	33
	Nitrógeno	60	12	28
0,0005	Aire	55	12	32
	Nitrógeno	59	10	31
0,005	Aire	52	13	34
	Nitrógeno	56	11	32
0,05	Aire	55	12	33
	Nitrógeno	43	12	44
0,5	Aire	55	13	32
	Nitrógeno	21	33	46
5	Aire	55	12	32
	Nitrógeno	35	38	26
		células HT29		
μM		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	Aire	50	14	36
	Nitrógeno	47	13	39
0,005	Aire	52	12	35
	Nitrógeno	46	14	40
0,05	Aire	50	15	35
	Nitrógeno	37	11	52
0,5	Aire	48	14	37
	Nitrógeno	8	8	84
5	Aire	47	13	39
	Nitrógeno	14	50	36
5	Aire			
	Nitrógeno			

Ejemplo 31

5 Modelo de Esferoide

Se utilizaron dos líneas celulares cancerosas humanas en estos estudios de esferoides para determinar la eficacia de los profármacos alquilantes de fosforamidato activados hipóxicos. Se sembraron células de adenocarcinoma colorrectal HT29 (carcinoma de colon) directamente en un matraz de agitación de 125 ml a 10.000 células/mL y se hicieron crecer en medio RPMI con un suplemento de FBS al 10% y antibióticos. A medida que estas células se dividían, se adherían entre sí y formaban esferoides. Se sembraron células de carcinoma de pulmón H460 en un matraz recubierto con una superficie no adherente para formar pequeñas bolas de células que se pueden sembrar en un matraz de agitación. Para iniciar las siembras de células H460, se recubrieron matraces para el cultivo de tejidos de 150 cm² con agarosa al 1% y después se añadieron 10.000 células por matraz y se dejó que crecieran en medio RPMI con un suplemento de FBS al 10% y antibióticos durante 3 a 5 días antes de sembrarlas en cultivos celulares con agitación centrífuga. Para ambas líneas celulares, el medio de crecimiento se cambió cada día después de que los esferoides se hicieran visibles a simple vista.

Con el fin de determinar la morfología y la localización de las regiones hipóxicas dentro de un esferoide intacto, se prepararon los esferoides completos para la histología. Para las secciones congeladas, se lavaron los esferoides intactos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se embebieron en OCT y se congelaron rápidamente en una solución de hielo seco/2-metilbutano antes de ser almacenados a -80°C. Para las secciones embebidas en parafina, los esferoides intactos se fijaron en una solución recién preparada de paraformaldehído al 4% en PBS y con posterioridad se embebieron y se seccionaron.

Para evaluar la capacidad de un profármaco alquilante de fosforamidato para penetrar en las células cancerosas hipóxicas internas, activadas, liberar el alquilante de fosforamidato, y eliminar aquellas células cancerosas internas, se midió la supervivencia clonogénica de los esferoides expuestos al fármaco durante 2 h. Los esferoides se colocaron en un nuevo medio de crecimiento y se incubaron durante al menos 1 h antes de comenzar los experimentos. Los esferoides entre 500 y 600 µm se aislaron mediante filtración del cultivo de esferoides a través de una serie de filtros de malla estéril de tamaño definido. Se colocaron entre 10 y 20 esferoides sobre una placas Pyrex de 60 mm con muescas siliconizada en 3 mL de medio con la concentración deseada de compuesto de ensayo. Las bandejas se colocaron en recipientes de aluminio sellados y se expusieron a una serie de evacuaciones y gaseados con gases certificados que contenían 5% de CO₂ y una cantidad definida de O₂ (0% de O₂, 3% de O₂, 10% de O₂ o aire). Se incubaron los esferoides en un baño de agua con sacudimiento para asegurar tanto el equilibrio del O₂ disuelto en la solución como la integridad de los esferoides en la solución durante 2 h. El compuesto de ensayo se retiró y los esferoides se lavaron antes de ser completamente digeridos con tripsina. Puesto que el núcleo necrótico contiene desechos celulares se requirió un tratamiento con ADNasa I para producir una sola suspensión celular uniforme. Las células se resuspendieron a 10⁶/mL y se cultivaron para la supervivencia clonogénica.

Los experimentos de respuesta a la dosis inicial se llevaron a cabo en células en monocapa en nitrógeno, 0,6% de O₂, o aire para establecer el intervalo de dosis apropiado y la dependencia del oxígeno de la liberación del alquilante de fosforamidato a partir de un profármaco alquilante de fosforamidato. La supervivencia clonogénica fue el criterio de valoración y los datos se resumen por los valores de la CI₉₀ o C₉₀ (la concentración inhibitoria requerida para eliminar el 90% de las células y producir un 10% de supervivencia). Se emplearon daunorrubicina y cisplatino, cada uno de los cuales penetra en los esferoides en un grado diferente, para eliminar las células cancerosas aeróbicas externas del esferoide. Se utilizó daunorrubicina para penetrar las capas externas de un esferoide multicelular debido a su elevada afinidad hacia las células y se utilizó cisplatino a una dosis apropiada para eliminar solamente las células cancerosas aeróbicas externas. Como control para un fármaco biorreductor que eliminaba las células en hipoxia en cultivos monocapa, pero no en cultivos celulares multicelulares debido a su elevada reactividad y escasa penetración, se utilizó Tirapazamina tanto en experimentos basados en monocapas como en esferoides como se tabula más abajo para las células H460 expuestas durante 2 h.

Valores de CI₉₀ para las células H460 expuestas en forma de monocapas o esferoides

Fármaco	Monocapa			Esferoide 10% de O ₂
	N ₂	0,6% de O ₂	Aire	
Cisplatino	4,2 µM	7,7 µM	7,3 µM	8,0 µM
Daunorrubicina	0,16 µM			19 µM
Tirapazamina	14 µM	27 µM	>100 µM	>200 µM

Se sometieron a ensayo los profármacos alquilantes de fosforamidato en esferoides para determinar su capacidad para penetrar en las células cancerosas hipóxicas que yacen en el interior, activarse, y eliminar las células hipóxicas. Los resultados se tabulan más abajo.

CI₉₀ para las células H460 expuestas en forma de monocapas o esferoides a profármacos de fosforamidato durante 2 h.

Compuesto	Monocapa			Esferoide 10% de O ₂
	N ₂	0,6% de O ₂	Aire	
25	0,1 µM	0,6 µM	20 µM	15 µM
24	0,07 µM	0,25 µM	4 µM	3 µM
97				13 µM
70	1,25 µM			25,5 µM
36	1 µM		100 µM	>>100 µM

Se demostraron resultados similares para la eficacia del Compuesto 25 en los esferoides de HT29 como se tabula más abajo:

Compuesto	Monocapa			Esferoide 10% de O ₂
	N ₂	10,6% O ₂	Aire	
25	0,2 µM	3 µM	40 µM	29 µM

- 5 El profármaco alquilante de fosforamidato se combinó simultáneamente con cisplatino o daunorrubicina y los esferoides se expusieron durante 2 h a la combinación, seguido de la medición de la supervivencia clonogénica. Los resultados se tabulan más abajo:

Compuesto	CI50 (µM)	
Daunorrubicina	17	
Compuesto 25	9	
Daunorrubicina + Compuesto 25	2,3	
Compuesto	CI50 (µM)	CI99 (µM)
Cisplatino	14	
Compuesto 25	12	
Cisplatino + Compuesto 25	2,3	5,4

- 10 Los profármacos alquilantes de fosforamidato demuestran una capacidad para penetrar en las células subyacentes internas en el esferoide y eliminar las células cancerosas hipóxicas solos y combinados con otros agentes que eligen como diana las células cancerosas aeróbicas.

Ejemplo 32

- 15 Análisis Antiproliferación – Células Mutantes para la Reparación de ADN

Se obtuvieron células de ovario de hámster Chino mutantes para rutas de reparación de ADN específicas de la ATCC. Se sometieron a ensayo las siguientes líneas celulares con 2.500 o 3.000 células/pocillo/500 µL de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (Gibco) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y antibióticos: células AA8 (ATCC CRL-1859), células EM9 (ATCC CRL-1861), células UV41 (ATCC CRL-1860), células UV135 (ATCC CRL-1867), células IRS1SF. Todas las líneas celulares se escrutaron inicialmente con un análisis anti-proliferación y aquellas que demostraron sensibilidad se volvieron a someter a ensayo con el análisis clonogénico (como se ha descrito previamente) para confirmar los resultados de la proliferación. Las células se expusieron a dosis seleccionadas de profármacos alquilantes de fosforamidato de la presente invención durante 2 h en condiciones hipóxicas o aeróbicas, el compuesto de ensayo se retiró, y las células se analizaron. La siguiente tabla enumera las líneas celulares, la ruta mutada, y el defecto en el gen específico:

Línea celular	Ruta mutante	Defecto en el gen
AA8	Ninguna (Tipo salvaje)	(Ninguno)
EM9	Reparación de la escisión de bases	XRCC1
UV135	Reparación de la escisión de	XPG

Línea celular	Ruta mutante	Defecto en el gen
	nucleótidos	
UV41	Reparación de la escisión de nucleótidos y Recombinación homóloga	XPF
Irs1SF	Recombinación homóloga	XRCC3

La siguiente tabla enumera el efecto de la exposición de diferentes líneas celulares a los Compuestos 25 y 36 en condiciones anóxicas o aeróbicas y analizadas mediante la proliferación medida por la Cl_{50} .

Compuesto	AA8 (Anoxia/Aire)	EM9 (Anoxia/Aire)	UV41 (Anoxia/Aire)	UV135 (Anoxia/Aire)	IRS1SF (Anoxia/Aire)
36	2/>100	4/>100	0,03/20	2/>100	0,3/59
25	8/>100	7/>100	0,2/95	6/>100	2/>100

5 La siguiente tabla enumera los valores de Cl_{90} para la supervivencia clonogénica para célula seleccionadas expuestas al Compuesto 25 en condiciones anóxicas o anaeróbicas.

Línea Celular	Cl_{90} (μ M)	
	N ₂	Aire
AA8	0,85	>300
UV41	0,02	17
Irs1SF	0,02	20

10 Solamente las líneas celulares con una recombinación homóloga defectuosa fueron sensibles al Compuesto 25 en hipoxia. Puesto que UV41 participa tanto en la ruta de reparación de la escisión de nucleótidos como en la ruta de reparación de la recombinación homóloga, el Compuesto 25 posiblemente también produjo una cantidad significativa de monoadductos. Sin embargo, UV135 que también está implicado en la reparación de la escisión de nucleótidos no fue sensible al Compuesto 25. Las lesiones predominantes producidas por el Compuesto 25 fueron los entrecruzamientos intercatenarios en el ADN. Estos resultados fueron confirmados en células UV41 e Irs1SF con el análisis clonogénico. La exposición en condiciones aeróbicas produjo el mismo espectro de sensibilidades que se había observado en hipoxia, indicando que la toxicidad aeróbica también estaba causada por la formación de entrecruzamientos intercatenarios en el ADN. El Compuesto 36 mostró un patrón de sensibilidad similar en las líneas celulares mutantes, indicando que el Compuesto 36 también producía entrecruzamientos intercatenarios en el ADN.

20 Ejemplo 33

Análisis de Cultivos Celulares de Múltiples capas

25 Este ejemplo demuestra el efecto del Compuesto 25 sobre la penetración en el tejido utilizando cultivos celulares de múltiples capas (MCC) y evalúa cualquier efecto presencal. Los MCC se incubaron con medio oxigenado (20% de O₂ y 5% de O₂) o medio hipóxico (aproximadamente 0% de O₂) y se expusieron al compuesto de ensayo desde un lado (superficie expuesta, lado normóxico) mientras el otro lado fue temporalmente cerrado (lado más alejado, lado hipóxico). Cuando se incuban los MCC en un medio con 20% de O₂ o 5% de O₂ se desarrolla un gradiente de oxígeno desde la superficie expuesta al medio hacia la superficie más lejana del cultivo. Los 50 μ m de tejido más lejano agotan el oxígeno. El grado de agotamiento de O₂ es mayor en el medio gaseado con 5% de O₂ que en el gaseado con 20% de O₂; la incubación con 5% de O₂ refleja la situación *in vivo* más exactamente. La incubación de los MCC con medio a 0% de O₂ modela la hipoxia limitada por perfusión, donde los vasos sanguíneos tumorales se quedan completamente sin oxígeno y el compuesto de ensayo penetra considerables distancias para alcanzar todas las células. Esta situación por lo tanto supone una barrera mayor para la penetración del fármaco, si la unión del fármaco activado actúa limitando su penetración.

40 Se llevaron a cabo experimentos basados en MCC con medios gaseados con 0, 5 o 20% de O₂ durante 45 minutos antes y durante la incubación con el compuesto de ensayo. Se hicieron crecer células HCT116 hasta un grosor de 150 μ m sobre un soporte sólido y un lado del cultivo se pinzó para desarrollar una hipoxia por difusión limitada. Los cultivos se expusieron al compuesto de ensayo durante 1 hr bajo 0% de O₂, 5% de O₂ o 20% de O₂ y se evaluó la eficacia midiendo la inhibición de la incorporación de BrdU. Los cultivos se incubaron durante una segunda hora en

medio de nueva aportación a 20% de O₂ y se retiraron del aparato y se devolvieron a una cámara de crecimiento normal, donde el medio fluye a ambos lados del MCC. Los cultivos se incubaron durante 24 horas antes del marcaje con BrdUrd y la posterior criosección. Se analizaron el marcaje con BrdUrd en los lados expuesto y alejado del MCC utilizando la tinción inmunohistoquímica, imágenes microscópicas y análisis de imágenes por ordenador para evaluar el efecto del Compuesto 25 sobre la proliferación celular.

Cuando los cultivos se expusieron a dosis graduales del Compuesto 25 en 20% de O₂, se requirieron 5 veces menos de compuesto en el lado lejano (hipóxico) en comparación con el lado expuesto (normóxico) para producir resultados comparables, demostrando la penetración y la activación hipóxica del Compuesto 25. Cuando los MCC se expusieron al compuesto de ensayo en una condición más fisiológicamente relevante de 5% de O₂, el Compuesto 25 fue 10 veces más eficaz en la inhibición de la incorporación de BrdU en el lado hipóxico en comparación con el lado normóxico. Los lados normóxicos de los cultivos a 5% y 20% de O₂ resultaron igualmente afectados por la exposición al Compuesto 25.

El Compuesto 25 es más eficaz en el lado hipóxico de los cultivos con 5% de O₂ que con 0% de O₂. La comparación de los lados normóxicos versus los lados hipóxicos de los cultivos en 5% de O₂ demostró que el Compuesto 25 penetra eficazmente a través de tejidos relativamente bien oxigenados. El Compuesto 25 es capaz de eliminar las células hipóxicas localizadas a alrededor de 150 μm de los vasos sanguíneos funcionales. Se observó una reducción de aproximadamente 3 veces en la exposición al Compuesto 25 para el lado hipóxico en 0% de O₂ con respecto a la exposición en condiciones de 5% de O₂. Se observó un efecto presencial solamente a la concentración más elevada.

La siguiente tabla enumera el efecto de e expuesto a dosis graduales del Compuesto 25 medido mediante la Cl₅₀ (concentración para inhibir la incorporación de BrdU en 50%).

Lado	0% de O ₂ (μM)	5% de O ₂ (μM)	20% de O ₂ (μM)
Hipóxico	~1,1	0,7	2,6
Normóxico	~1,7	8,0	>10

Ejemplo 34

Metabolismo del Compuesto 25

Por Proteína Microsomal Humana y de Ratón

Se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de la estabilidad metabólica de un profármaco alquilante de fosoramidato (Compuesto 25) utilizando proteínas microsomales de hígado humano (HLM), de rata (RLM) y de ratón (MLM) que contenían enzimas citocromo P450. Se preparó una solución del Compuesto 25 (500 μL, 5μM) diluyendo una solución de partida de DMSO 100 veces en una solución puente de agua:metanol, añadiendo proteína microsomal (1 mg/mL) en PBS/MgCl₂, y se iniciaron las reacciones enzimáticas añadiendo una solución de NADPH. Se retiraron 50 μl de la mezcla de reacción a los 0, 10, 20, y 30 minutos de la adición de la solución de NADPH, se hicieron precipitar las proteínas con acetonitrilo y se analizó el sobrenadante claro para determinar la cantidad del Compuesto 25 mediante CL-EM/EM de fase inversa. Se utilizaron nifedipina y testosterona como controles positivos. El primer estudio comparó RLM con MLM (Tabla 1) y el segundo estudio comparó HLM con RLM (Tablas 2A y 2B)

Tabla 1

Compuesto	Estabilidad metabólica (% a los 30 min)	
	RLM	MLM
25	84%	89%
Nifedipina	6%	4%
Testosterona	0%	6%

Tabla 2A

Compuesto	Estabilidad metabólica (% a los 30 min)	
	HLM	RLM
25	127%	137%
Nifedipina	22%	2%

Compuesto	Estabilidad metabólica (% a los 30 min)	
	HLM	RLM
Testosterona	65%	33%

Tabla 2B

Comp. Núm.	Estabilidad metabólica (MLM) (% a los 30 min)	Estabilidad en plasma (% a los 30 min)	MTD (mg/ml)	Administración intravenosa en ratones					Administración intraperitoneal en ratones		
				t 1/2 (hr)	Cmax (µg/ml)	AUC (µg/ml x hr)	V _{ss} (l/kg)	CL (ml/min/kg)	t 1/2 (hr)	Cmax (µg/ml)	AUC (µg/ml x hr)
23	71	84		0,15	7,8	2,3	3,3	368	0,16	8,5	3,5
25	92	102 (a los 20 min)		0,11 (6,7 min)	27,5				0,18 (11 min)	22,9	
26	56	85									
34	28	85 (a los 20 min)									
36	90	60	400	0,24	27,7	10,8	1,27	77,4	0,18	44	26,1

Ejemplo 35

5 Farmacocinética In Vivo de los Profármacos Alquilantes de Fosforamidato

Se determinaron diferentes parámetros farmacocinéticos en plasma de los profármacos alquilantes de fosforamidato en ratones CD-1 excepto cuando se indica como se enumera más abajo en la Tabla 3.

10

Tabla 3

Fármaco (mg/kg)	Dosis (mg/kg)	Ruta	Formulación	T _{max} (min)	C _{max} (µg/mL)	AUC (µg-h/mL)	Vida media (min)
23	50	i.p.	PEG al 25%/Solución salina al 75%	5,00	8,50	210	9,60
23	50	i.v.	PEG al 25%/Solución salina al 75%	5,00	7,80	136	8,87
36	50	i.p.	PEG al 25%/Solución salina al 75%	15,0	44,0	1439	11,0
36	50	i.v.	PEG al 25%/Solución salina al 75%	5,00	27,7	646	14,1
37	20	i.p.	Crefofor:Etanol:Solución salina (1:2:7)	2,00	12,6	196	23,2
37	20	i.v.	Crefofor:Etanol:Solución salina (1:2:7)	2,00	15,0	172	9,00
85	25	i.p.	10% PEG	5,00	3,93	89,1	10,0
24	50	i.p.	Solución salina	5,00	7,60	64,0	4,10

^aRatones Balb/c

Ejemplo 36

Farmacocinética In Vivo del Compuesto 25

15

Se determinaron diferentes parámetros farmacocinéticos en plasma o tumor del Compuesto 25 en ratones CD-1 excepto cuando se indica como se enumera más abajo en la Tabla 4.

Tabla 4

Dosis (mg/kg)	Ruta	Formulación	T _{max} (min)	C _{max} (µg/mL)	AUC (µg-h/mL)	Vida media (min)	F ^c (%)
150 ^a	i.p.	Solución salina	5,00	90,1	1239	58,7	-
150 ^{a,b}	i.p.	Solución salina	15,0	3,38	307	ND	-
100	p.o.	Solución salina	15,0	15,8	784	95,2	-
50	i.p.	PEG 30%/ Solución salina al 70%	5,00	22,9	438	11,0	-
50	i.v.	PEG 30%/ Solución salina al 70%	2,0	27,5	325	6,7	-
50	i.p.	PEG 30%/ Solución salina al 70%	15,0	9,2	-	-	-
50	i.v.	PEG 30%/ Solución salina al 70%	2,0	27,5	177	10,1	-
50	i.p.	Solución salina	5,00	38,5	635	7,91	-
50	p.o.	Solución salina	15,0	0,93	40,4	25,7	13,6
25	i.p.	PEG al 10%	45,0	6,33	247	4,43	

^aRatones atómicos con tumor H460

^bPK tumor

^cBiodisponibilidad

5

Ejemplo 37

Inhibición por Citocromo P450 del Metabolismo del Compuesto 25

- 10 Se prepararon 8 pocillos de reacción con 100 µL de una solución que contenía fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4, NADP⁺ 2,6 mM, glucosa-6-fosfato 6,6 mM, 0,8 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y diluciones seriadas 1:3 del compuesto de ensayo (tal como el Compuesto 25) junto con ocho pocillos de diluciones seriadas 1:3 de un inhibidor de control positivo adecuado (tal como furafilina para CYP1A2, sulfafenazol para CYP2C9, N-bencilnirvanol para CYP2C19, quinidina para CYP2D6 y cetoconazol para CYP3A4). Las concentraciones de compuesto de ensayo oscilan entre 0,0229 µM y 200 µM. Las reacciones se iniciaron añadiendo 100 µL de una solución de enzima/sustrato previamente calentada. Se preparó una reacción de control a tiempo cero añadiendo 50 mL de ácido fórmico al 10% (400 mL de acetonitrilo para 2C 19) en agua a 100 mL de solución de cofactor para inactivar las enzimas, añadiendo después 100 mL de solución de enzima/sustrato. También se preparó una reacción de control sin inhibidor. Después de una incubación adecuada a 37°C, las reacciones se terminaron por medio de la adición de 50 mL de ácido fórmico al 10% en agua (400 mL de acetonitrilo para 2C 19). Las reacciones se prepararon y se analizaron para determinar las formas de metabolito del sustrato de la sonda (fenacetina para CYP1A2, diclofenaco para CYP2C9, (S)-mefenitoina para CYP2C19, dextrometorfano para CYP2D6 y midazolam, testosterona y nifedipina para CYP3A4) utilizando CLAR-EM/EM. Cada análisis se llevó a cabo por duplicado. Más abajo se enumera un resumen de los valores de la CI50.

25

Tabla 5

Isoforma	CI50 (mM)	
	Control	Compuesto 25
1A2	8,6	NI
2C9	0,20	~10
2C19	6,0	NI
2D6	0,21	>50
3A4 Midazolam	0,049	>50

Isoforma	CI50 (mM)	
	Control	Compuesto 25
3A4 Nifedipina	0,03	NI
3A4 Testosterona	0,10	>50
NI = Sin inhibición significativa detectada		

Ejemplo 38

5 Determinación de los Metabolitos Potenciales del Compuesto 25 Formados en Hepatocitos de Ratón, Rata, Perro y Ser Humano

Se incuban el Compuesto 25 con hepatocitos crioconservados de ratón, rata, perro, mono y ser humano a una concentración de 10 μ M. Las reacciones se detienen a los 0 (pre-incubación), 30, 60 y 120 minutos sofocando con acetónitrilo antes de la centrifugación y el análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) junto con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). Los metabolitos potenciales se identifican llevando a cabo barridos completos de 100 a 520 amu. Los espectros iónicos producto de los metabolitos potenciales se recogen con posterioridad y se comparan con el espectro iónico producto del compuesto parental para determinar si cada metabolito potencial está relacionado con el Compuesto 25. La desaparición del compuesto parental (Compuesto 25) y la aparición de metabolitos potenciales a lo largo del tiempo se controlan comparando las alturas de los picos en cada momento puntual adquirido.

Ejemplo 39

20 Determinación de la Farmacocinética *In Vivo* del Compuesto 25 y sus Metabolitos en Rata, Perro y Mono

Se determinan los parámetros farmacocinéticos del Compuesto 25 y sus metabolitos en ratas Sprague Dawley después de la administración intravenosa de 5, 20, 50 y 100 mg/kg de Compuesto 25. También se determinará la farmacocinética del Compuesto 25 y sus metabolitos en perros beagle y monos cinomologus después de una única administración intravenosa de 20 mg/kg de Compuesto 25. Se determinan las concentraciones del Compuesto 25 y sus metabolitos en plasma mediante el método CL-EM/EM y se computan los parámetros farmacocinéticos medios.

Ejemplo 40

30 Estudio del Equilibrio de Masas en Ratas

Se administra Compuesto 25- C^{14} a ratas Sprague-Dawley normales y con una cánula en el conducto biliar como única dosis intravenosa. Se recogen el plasma sanguíneo, la orina, y las heces en momentos especificados y se determinan las concentraciones de radiactividad total mediante recuento de centelleo en líquido (RCL).

35 Ejemplo 41

Autorradiografía Cuantitativa del Organismo Completo

Se administra a ratas Sprague-Dawley una única dosis intravenosa de Compuesto 25- C^{14} . En los momentos especificados, se somete a eutanasia una rata por momento puntual. Se centrifuga la sangre para obtener el plasma, y se analizan la sangre y el plasma para determinar la concentración de la radiactividad. Las canales congeladas de las ratas se embeben en CMC al 2%, se congelan en un bloque, y se hacen secciones de 40 μ m en un criomicrotomo Leica CM 3600. Las secciones recogidas se liofilizan, se montan y se exponen sobre placas de fósforo para el diagnóstico de imágenes junto con patrones autorradiográficos C^{14} para el posterior calibrado con un soporte lógico de análisis de imágenes. Las pantallas expuestas se escanean utilizando Molecular Dynamics Storm 820 o 860. Se mide la concentración de radiactividad en tejidos incluyendo tejido adiposo (pardo y blanco), glándula suprarrenal, sangre, cerebro (cerebro, cerebelo, médula), hueso, médula ósea, ciego y contenidos, epidídimo, esófago, globo ocular (tracto uveal, humor acuoso, cristalino), glándula Harderiana, corazón, riñón (córtes, médula, papila y sección completa), intestino grueso y contenidos, hígado, pulmón, ganglio linfático submaxilar), páncreas, glándula pituitaria, glándula prostática, glándula salivar, vesículas seminales, músculo esquelético, piel, estómago (y contenidos), intestino delgado (y contenidos), bazo, médula espinal, tráquea, tiroides y vejiga urinaria (y contenidos) mediante análisis de imágenes. Se producen autorradioluminografías e imágenes digitales para cada animal.

55 Ejemplo 42

Unión a Proteínas del Plasma del Compuesto 25

Se determina la unión a proteínas del plasma de ratón, rata, perro, mono y ser humano del Compuesto 25 utilizando ultrafiltración. La ultrafiltración se lleva a cabo tomando alícuotas del plasma preparadas a tres concentraciones con Compuesto 25 en un dispositivo Centrifree® por triplicado. Después todas las muestras de plasma se equilibran a 37°C. El aparato Centrifree® se centrifuga a 37°C durante 30 minutos a 2500 x g. Una alícuota de 75 µL del producto ultrafiltrado se prepara con el I.S. (Compuesto 25 deuterado) y se analiza utilizando CL-EM/EM. Los productos ultrafiltrados se analizan y se cuantifican utilizando patrones de productos ultrafiltrados humanos para la curva de calibración.

Ejemplo 43

Este Ejemplo demuestra la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer empleando un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de colon humano HT-29.

Se dejó que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), 7-8 semanas de edad, se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. Se obtuvo la línea celular de carcinoma de colon humano HT-29 de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 10%. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Se cosecharon las células HT-29 del cultivo y se inocularon a 3 x 10⁶ células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm³ (día 8), se administró a cada grupo de 10 ratones durante tres semanas, vehículo solo (solución salina y PEG (10 mL/kg cada uno), Grupo 1), Compuesto 36 solo (disuelto en ciclodextrina al 30% en PBS) a una dosis diaria de 20, 60, o 200 mg/kg (Grupos 2, 3 y 4, respectivamente), y Compuesto 36 a una dosis diaria de 20, 60, y 200 mg/kg suministrados 2-3 horas después de una dosis de 10 mg/kg de 5FU (en solución salina) (Grupos 5, 6 y 7, respectivamente) y en comparación con un grupo que recibió solamente 5FU a 10 mg/kg (Grupo 8) como se tabula más abajo.

Se registró el peso corporal de cada ratón dos veces por semana. Se controló el crecimiento de cada xenoinjerto midiendo externamente los tumores en dos dimensiones utilizando un calibre digital dos veces por semana. Se determinó el volumen del tumor (V) por medio de la siguiente ecuación: $V = (L \times W^2)/2$, donde L es la longitud y W es la anchura de un xenoinjerto. Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana.

La administración del Compuesto 36 a 20, 60, y 200 mg/kg/día cada uno redujo el crecimiento del tumor en comparación con la administración de vehículo solo. La administración de una combinación del Compuesto 36 y 5FU dio como resultado una inhibición mayor y dependiente de la dosis del crecimiento del tumor en comparación con el vehículo. Además las combinaciones de 60 y 200 mg/kg del Compuesto 36 redujeron el crecimiento del tumor en un grado mayor que el 5FU solo.

Grupo	Tratamiento (mg/kg)	% Inhibición vs	
		Grupo 1	Grupo 8
2	20	34,6	-
3	60	16,1	-
4	200	20,2	-
5	20 + 5FU	35,7	3,3
6	60 + 5FU	46,9	13,3
7	200 + 5FU	58,2	23
8	5FU	38,7	-

Hubo una cierta pérdida de peso asociada con estos efectos anti-tumorales y una mortalidad ocasional, particularmente en el grupo tratado con la dosis elevada del Compuesto 36 pero también en los otros grupos. En conjunto, el Compuesto 36 mostró tasas variables de inhibición del crecimiento del tumor.

Ejemplo 44

El Ejemplo 44 demuestra la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer empleando un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de colon humano NCI H460.

Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad, se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. Se obtuvo la

línea celular NCI H460 de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se cosecharon de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 47 y se inocularon a 1×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 (día 8), se administraron a cada grupo de ratones durante tres semanas, como se tabula en la tabla de más abajo: Compuesto 25 (2,5 mg/ml en PEG al 10%; ruta de administración - *i.p.*) y Taxol (1 mg/ml en EtOH del 5%, Cremofor al 5% y solución salina al 90%; administración - *i.v.* 2 h después de la administración del Compuesto 25). Se midieron el peso corporal y los volúmenes de los tumores como se describe en el Ejemplo 47 de más arriba.

Protocolo de Tratamiento

10

Grupo (n= 10)	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen
1a*	No Aplicable (NA)	NA	NA
1b*	Solución salina	NA	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
2	Vehículo	NA	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
3	Compuesto 25	25	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
4	Compuesto 25	50	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
5	Compuesto 25	100	(q7d x 1)/semana x 2 semanas
6	Taxol	NA	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
7	Compuesto 25	25	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
8	Compuesto 25	50	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
9	Compuesto 25	100	(q7d x 1)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
Grupos 1a y 1b, n = 5; q1d/qd = cada día; q2d = en días alternos; q7d = cada siete días.			

Los resultados se presentan en la Tabla X2 basándose en la medición del volumen tumoral el día 29 cuando los ratones tratados con vehículo han alcanzado un volumen de 946 mm^3 . Se añadieron grupos de 5 ratones que recibían solución salina o sin tratamiento con el fin de indicar cualquier efecto del vehículo pero no se utilizaron para comparaciones en este análisis.

15

Grupo	% Inhibición vs	
	Grupo 2	Grupo 6
3	50,1	-
4	52	-
5	46,7	-
7	65,9	38,8

Grupo	% Inhibición vs	
	Grupo 2	Grupo 6
8	63,1	31,7
9	52,6	12,5
6	46	-

Los resultados demuestran que los tres regímenes de dosificación del Compuesto 25 proporcionaban grados similares de inhibición del crecimiento tumoral y que la terapia combinada, particularmente con la dosificación de todos los días proporcionaba un beneficio adicional. Cada terapia combinada estaba asociada con cierto grado de pérdida de peso, pero no lo suficiente como para causar mortalidad. En conjunto los resultados indican que el Compuesto 25 es eficaz en este modelo de cáncer de pulmón y proporciona un beneficio adicional al proporcionado por el agente quimioterapéutico convencional taxol.

Utilizando el ratón para la conversión HED, se puede administrar el Compuesto 25 a una dosis terapéuticamente eficaz de alrededor de 2 a alrededor de 8 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de pulmón, solo o combinado con Taxol™, donde la dosis diaria se puede administrar con una frecuencia decreciente de dosificación para dosis más elevadas en comparación con dosis inferiores.

Ejemplo 45

El Ejemplo 45 describe la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer como se demuestra empleando un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células no pequeñas H460. Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad, se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. Se obtuvo la línea de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano NCI H460 de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se cosecharon como se describe en el Ejemplo 27 de más arriba, y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 (día 8), se administraron a cada grupo de ratones (diez por grupo) durante tres semanas, como se tabula en la tabla de más abajo: Compuesto 25 (2,5 mg/ml en PEG al 10%; ruta de administración - i.p.); Compuesto 24 (0,3, 0,1 mg/ml en PEG al 10%, ruta de administración - i.p.) y Taxol (1 mg/ml en EtOH del 5%, Cremofor al 5% y solución salina al 90%; administración - i. v. 2 h después de la administración del compuesto de ensayo).

Protocolo de tratamiento

Grupo	Núm. de Ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen
1	10	Vehículo*	NA	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
2	8	Taxol	10	(q2d x3)/semana x 2 semanas
3	8	Compuesto 24	3	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
4	9	Compuesto 24 Taxol	1	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
			10	(q2d x3)/semana x 2 semanas
5	8	Compuesto 24 Taxol	3	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
			10	(q2d x3)/semana x 2 semanas
6	8	Compuesto 25 Taxol	25	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
			10	(q2d x3)/semana x 2 semanas

Grupo	Núm. de Ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen
* - 50% PEG				

Se determinaron el peso corporal y el volumen de los tumores como se describe en el Ejemplo 43 anterior. Los resultados para la inhibición del crecimiento tumoral medida el día 27 se tabulan más abajo. Las comparaciones se realizaron el día 27 porque ese era el último día de mediciones para el grupo con vehículo y esos animales fueron sacrificados.

5

Grupo	% Inhibición vs	
	Grupo 1	Grupo 2
3	39,9	-
4	16	-32,7
5	51,5	23,3
6	56,8	31,7
2	36,7	-

Estos resultados demuestran que la dosis diaria de 3 mg/kg del Compuesto 24 y 25 mg/kg del Compuesto 25 inhibían el crecimiento del tumor y que el Compuesto 25 tenía un beneficio ligeramente mayor como monoterapia y combinado con taxol. Estos efectos estuvieron acompañados por leves reducciones de peso, particularmente en el grupo con Compuesto 25 + taxol.

10

Utilizando el ratón para la conversión HED, se puede administrar el Compuesto 25 a una dosis terapéuticamente eficaz de 2 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de pulmón, solo o combinado con Taxol™, y se puede administrar el Compuesto 24 a una dosis terapéuticamente eficaz de 0,25 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de pulmón, solo o combinado con Taxol™.

15

Ejemplo 46

Este Ejemplo describe la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer como se demuestra empleando un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de colon humano H460. Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad, se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. La línea celular de carcinoma de colon humano NCI H460 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se cosecharon como se describe en el Ejemplo 47 anterior, y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 (día 8), cada grupo de ratones recibió tratamiento durante tres semanas, como se tabula en la tabla de más abajo: Compuesto 24 (en PEG al 10%), ruta de administración - *i.p.*, administrado 2 h antes de 5-FU o cisplatino (CDDP; en solución salina) durante los días que estaba programada la terapia combinada; 5FU solo (en solución salina), o CDDP solo.

30

Protocolo de tratamiento

Grupo	Ratón Núm.	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Rutas, Regímenes
1*	8	Solución salina	10 ml/kg	iv, q3d × 4
2*	8	5-FU	50	iv, q3d × 4
3*	4	Sin tratamiento	N/A	N/A
4**	9	Vehículo (solución salina)	10 ml/kg	ip, (q1d × 5)/semana × 3 semanas
5**	9	5-FU	50	iv, q3d × 4
6**	9	CDDP	5	iv, once
7**	9	Compuesto 24	3	ip, (q1d × 5)/semana × 3 semanas

Grupo	Ratón Núm.	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Rutas, Regímenes
8**	9	Compuesto 24	6	ip, (q1d × 5)/semana × 3 semanas
9**	9	Compuesto 24 5-FU	6 50	ip, (q1d × 5)/semana × 2 semanas iv, q3d × 4
10**	9	Compuesto 24 CDDP	3 5	ip, (q1d × 5)/semana × 3 semanas iv, una vez
11**	9	Compuesto 24 CDDP	6 5	ip, (q1d × 5)/semana × 3 semanas iv, una vez
12**	8	Sin tratamiento	N/A	N/A

*- localización del tumor flanco; ** - localización del tumor peritoneo; Q3d = cada tres días

5 En los grupos de control, los tumores se implantaron en dos localizaciones como parte de un estudio separado del efecto de la localización sobre el crecimiento del tumor del grupo control. Estos resultados no tuvieron un impacto sobre la interpretación del estudio y todos los tratamientos se compararon con el grupo de vehículo con tumores en la misma zona del organismo. El peso corporal y el volumen del tumor se midieron como se describe en el Ejemplo 47. La inhibición del crecimiento del tumor medido el día 25, cuando los tumores del vehículo habían alcanzado el tamaño máximo y los animales en ese grupo fueron sacrificados se tabulan a continuación

Grupo	% de inhibición vs	
	Grupo 4	Grupo 6
7	44,1	-
8	42,1	-
9	71,1	28,9
10	53,2	24,8
11	50,7	20,9
5	59,3	-
6	37,4	-

10 Los resultados demuestran que el Compuesto 24 como monoterapia dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral de un poco más del 40%, mientras que la combinación de Compuesto 24 administrado combinado con CDDP o 5FU proporcionó una inhibición del crecimiento de alrededor del 50-70%. De acuerdo con este ejemplo, la combinación más terapéuticamente eficaz era la de Compuesto 24 y 5FU. Los efectos sobre el crecimiento del tumor se asociaron con reducciones menores en los pesos de los ratones durante el tratamiento; sin embargo los ratones recuperaron el peso perdido después del final del tratamiento.

15 Utilizando el ratón para la conversión HED, el Compuesto 24 se puede administrar a una dosis terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,50 mg / kg / día, para el tratamiento del cáncer, en particular 20 cáncer de colon, solo o combinado con 5FU o CDDP.

Ejemplo 47

25 Ejemplo 47 describe la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer como se ha demostrado mediante el empleo de un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células no pequeñas H460. Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. La línea celular de carcinoma de pulmón células no pequeñas humano NCI H460 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tupo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se recogieron como se describe en el Ejemplo 43 anterior, y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 , se inició el tratamiento en el que grupos de 10 ratones recibieron vehículo (Grupo 1), CDDP a 3 o 6 mg/kg (Grupos 2 y 3, respectivamente, IV una vez), el Compuesto 25 a 50 mg/kg en solución salina 5 veces por semana durante dos semanas (Grupo 4), el compuesto 25 a 100 mg/kg cada tres días 5 veces (Grupo 5) o la combinación de cada dosis del Compuesto 25, con 3 o 6 mg/kg de CDDP (Grupos 6 y 7, respectivamente). Los resultados para los grupos que recibieron 50 mg/kg del Compuesto 25 se ilustran en la Figura

1. La Figura 2 muestra resultados similares para 100 mg/kg del Compuesto 25.

Estos resultados realizados con una versión formulada con solución salina del Compuesto 25 demuestran disminución significativa relacionada con la dosis en el volumen del tumor y el aumento de retraso del crecimiento del tumor con una dosis diaria de 50 mg/kg, y 100 mg/kg con una dosificación menos frecuente en comparación con la empleada para la dosis diaria de 50 mg/kg. Estos datos también demuestran que ambos regímenes de dosificación se suman a los efectos de CDDP en este modelo.

Utilizando el ratón para la conversión HED, el Compuesto 25 se puede administrar a una dosis terapéuticamente eficaz de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 mg/kg/día, para el tratamiento de cáncer, en particular cáncer de pulmón, solo o combinado con 5FU o CDDP, en donde la dosis diaria se puede administrar con una frecuencia decreciente de dosificación para las dosis más altas en comparación con las dosis más bajas.

Ejemplo 48

El Ejemplo 48 describe la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer como se ha demostrado mediante el empleo de un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de colon de humano HT-29. Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. La línea celular de carcinoma de colon humano HT29 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se recogieron como se describe en el Ejemplo 47 y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 (Día 8), cada grupo de ratones (diez por grupo) recibió tratamiento durante tres semanas, tal como se indica en la siguiente tabla: Compuesto 25 en solución salina, ruta de administración - *i.p.*, administrado 2 h antes que CDDP los días que está programada la terapia combinada y CDDP (en solución salina, IV).

Protocolo de tratamiento

Grupo (n = 9)	Artículo de ensayo	Dosis (mg / kg)	regímenes de administración
1	Salina	10 ml / kg	(Qd x 5) / semana x 2 semanas
2	CDDP	5	Una vez
3	Compuesto 25	50	(Qd x 5) / semana x 2 semanas
4	Compuesto 25	100	(Q2d x 3) / semana x 2 semanas
5	Compuesto 25	100	Q3D x 5
6	Compuesto 25	100	Q7d x 2
7	Compuesto 25 CDDP	50 5	(Qd x 5) / semana x 2 semanas Una vez
8	Compuesto 25 CDDP	100 5	(Q2d x 3) / semana x 2 semanas Una vez
9	Compuesto 25 CDDP	100 5	Q3D x 5 Una vez
10	Compuesto 25 CDDP	100 5	q7d x 2 Una vez

Se determinaron el volumen del tumor y el peso corporal como se describe en el Ejemplo 43. Los datos se basan en los volúmenes de los tumores el día 25 cuando los tumores en el grupo de vehículo habían alcanzado un tamaño suficiente para requerir que los ratones fueran sacrificados. Los resultados de la inhibición del crecimiento del tumor se tabulan a continuación.

Grupo	% Inhibición vs	
	Grupo 1	Grupo 2
3	28,2	-
4	30,1	-
5	31,3	-
6	48,1	-
7	50,7	30,8
8	44,2	27,5

Grupo	% Inhibición vs	
	Grupo 1	Grupo 2
9	36,2	21,5
10	51,8	33,2
2	24,2	-

Los resultados demuestran que la monoterapia de administración del Compuesto 25, formulado en solución salina, a 50 mg/kg/día y 100 mg/kg/día con una variedad de regímenes de dosificación da como resultado la inhibición del crecimiento tumoral en este modelo de cáncer de colon, y que el tratamiento combinado del Compuesto 25 y CDDP intensificaba la eficacia del Compuesto 25 para el tratamiento del cáncer de colon en este modelo. Estos efectos estuvieron acompañados de una pérdida de peso corporal modesta, más si cabe en los grupos combinados; los ratones recuperaron las pérdidas de peso corporales una vez finalizado el tratamiento.

Utilizando el ratón para la conversión HED, se puede administrar el Compuesto 25 a una dosis terapéuticamente eficaz de alrededor de 4 a alrededor de 8 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de pulmón de células no pequeñas, solo o combinado con CDDP, donde la dosis diaria se puede administrar con una frecuencia de dosificación decreciente para dosis más elevadas en comparación con las dosis más bajas.

Ejemplo 49

Este ejemplo describe la utilidad de un compuesto de esta invención en el tratamiento del cáncer como se demuestra empleando un modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células no pequeñas H460. Se permitió que ratones CB17/SCID hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 7-8 semanas de edad, se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. La línea celular de carcinoma de colon humano NCI H460 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se cosecharon como se describe en el Ejemplo 43 y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 , se inició el tratamiento en el que grupos de 10 ratones recibieron vehículo (Grupo 1), CDDP a 6 mg/kg (IV una vez, Grupo 2), Compuesto 25 a 150 mg/kg en solución salina, una vez por semana durante dos semanas (i.p., Grupo 3), o la combinación de los dos agentes (Grupo 4).

Los resultados mostrados en la Figura 3 demuestran que 150 mg/kg por semana del Compuesto 25 proporcionaban una mayor reducción en el crecimiento del tumor que CDDP solo y que la combinación de los dos agentes daba como resultado un beneficio adicional. Estos resultados también indican que durante el período de dos semanas de dosificación el volumen medio del tumor no cambió indicando una inhibición completa del crecimiento del tumor. Esos datos indican que el Compuesto 25 administrado a 150 mg/kg/día como monoterapia, una vez a la semana, es el más eficaz de todos los regímenes de dosificación descritos en los ejemplos precedentes (Ejemplos 43-48). Se observó un pequeño cambio en el peso corporal que sugería toxicidad reducida con este régimen de dosificación.

Utilizando el ratón para la conversión HED, se puede administrar el Compuesto 25 a una dosis terapéuticamente eficaz de alrededor de 12 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, opcionalmente administrada a una frecuencia de una vez cada semana, particularmente del cáncer de pulmón de células no pequeñas, solo o combinado con CDDP.

Ejemplo 50

El Ejemplo 50 describe la eficacia del Compuesto 25 por medio de una inyección en embolada *ip* o infusión *ip* solo o combinado con Cisplatino en modelo de ratón con xenoinjertos de H460. Se permitió que ratones nu/nu homocigóticos Nu-Foxnl^{nu} hembra (adquiridos de Charles River, Cambridge, MA), de 6 semanas de edad se aclimataran durante al menos tres días, y se manipularon en condiciones libres de patógenos. La línea celular de carcinoma de colon humano HT29 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana. Las líneas celulares se cultivaron y se cosecharon como se describe en el Ejemplo 43 y se inocularon a 3×10^6 células/animal en el espacio subcutáneo peritoneal. Cuando los tumores crecieron hasta un volumen medio de 100 mm^3 (día 8), se administró a cada grupo de ratones (diez por grupo) durante tres semanas, como se tabula en la tabla de más abajo: Compuesto 25 (formulado en forma de una solución de 15 mg/ml en solución salina, ruta de administración - *i.p.*, administrado 2 h antes de CDDP los días que estaba programada la terapia combinada y CDDP en solución salina, IV.

Protocolo de Tratamiento

Grupo	Artículo de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Regímenes	Concentración de la dosis: Volumen de la Dosis
-------	--------------------	---------------	-----------	---------------------------------------------------

Grupo	Artículo de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Regímenes	Concentración de la dosis: Volumen de la Dosis
1	Solución salina	10	Q7dx2	0 mg/mL : 10 mL/kg
2	CDDP	6	Q7d x 2	0,6 mg/mL : 10 mL/kg
3	Compuesto 25	150	Q7d x 2	15 mg/mL : 10 mL/kg
4	Compuesto 25	150	q7dx2	15 mg/mL : 10 mL/kg
	CDDP	6	q7dx2	0,6 mg/mL : 10 mL/kg
5	Compuesto 25	150	Q7d x 2	10 mg/mL: 15 mL/kg
6	Solución salina	0,2 ml	200 µL - 1 semana x2*	0 mg/mL :1 µL/hr
7	Compuesto 25	15 mg/ml	200 µL - 1 semana x2*	15 mg/mL : 1 µL/hr

* - Bomba Alzet, 200 µL durante 1 semana x 2 (re-implantar nueva bomba al final de una semana).

Se determinaron el peso corporal y el volumen del tumor como se describe en el Ejemplo 32. Los resultados se indican en la Figura 4. Los datos indican que, si bien la aplicación continua del Compuesto 25 solo o combinado con CDDP es eficaz, la dosificación intermitente, por ejemplo una vez a la semana pueden proporcionar un mayor beneficio terapéutico en el tratamiento de ciertos cánceres tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Ejemplo 51

Terapia Combinada con Compuesto 25 y Gemcitabina

Se administró una combinación del Compuesto 25 y gemcitabina a ratones atímicos que tenían tumores derivados de células de cáncer pancreático humano de tipo MiaPaca2. El tumor MiaPaca-2 es un tumor altamente invasivo, de crecimiento rápido que produce la muerte en 20-30 días en animales no tratados. Las células tumorales habían sido transfectadas con el gen para la proteína fluorescente roja. Se administraron *i.p.* a los ratones dosis de control con vehículo, gemcitabina, Compuesto 25, Compuesto 24, o combinaciones de gemcitabina/Compuesto 25 o gemcitabina/Compuesto 24 *i.p.*, como se tabula más abajo (8 ratones/grupo). Los Compuestos 24 y 25 se formularon en solución salina y fueron proporcionados por Threshold Pharmaceuticals, Inc. en forma de polvo seco. La Gemcitabina se obtuvo comercialmente y se preparó de nuevo de acuerdo con instrucciones del fabricante.

Protocolo de Tratamiento

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Programa
1	Vehículo	10ml/kg	(qd* x 5)/semana durante 2 semanas
2	Gemcitabina	200	qw* x 3 semanas
3	Compuesto 25	30	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
4	Compuesto 24	6	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
5	Gemcitabina	200	qw x 3 semanas
	Compuesto 25	30	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
6	Gemcitabina	200	qw x 3 semanas
	Compuesto 24	6	(qd x 5)/semana durante 2 semanas

* qd = cada día; qw = cada semana.

Se tomaron imágenes de los tumores una vez a la semana hasta el final del estudio en cuyo momento se obtuvieron imágenes del cuerpo abierto para confirmar los efectos. En el Grupo 1, los tumores crecieron rápidamente (Figura 5) y produjeron una letalidad de 100% el día 30 (Figura 6).

Los Grupos 3 y 4 produjeron efectos menores sobre el volumen del tumor y tuvieron poco efecto sobre la supervivencia. El Grupo 2 redujo significativamente el volumen del tumor y prolongó la supervivencia. El Grupo 6 proporcionó una modesta reducción en el tamaño del tumor pero sin efectos adicionales sobre la supervivencia. En contraste, el Grupo 5 demostró un crecimiento tumoral significativamente reducido y una supervivencia

significativamente prolongada en comparación con el Grupo 2. Cinco de los 8 tumores del Grupo 5 disminuyeron rápidamente después del tratamiento y en un corto período de tiempo dejaron de emitir fluorescencia (Figura 7).

5 Cuatro de estos tumores permanecieron con fluorescencia cero hasta el final del experimento y se consideró que los tumores se habían curado. Ningún tumor del Grupo 2 se consideró curado. Estos resultados demuestran que el tratamiento combinado con Compuesto 25 y gemcitabina tiene mayores ventajas en este modelo de cáncer en comparación con la monoterapia con gemcitabina convencional. Estos resultados demuestran que la reducción de tumores en los animales a los que se había administrado una combinación del Compuesto 25 a 30 mg/mg/día y gemcitabina era significativamente mayor que en los animales tratados con gemcitabina como único agente.

10 Utilizando el ratón para la conversión HED, se puede administrar el Compuesto 25 a una dosis terapéuticamente eficaz de alrededor de 2,5 mg/kg/día, para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer pancreático, combinado con gemcitabina.

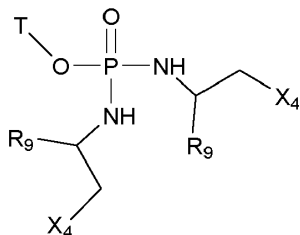
15 Ejemplo 35

Se reconoce que las moléculas eficaces para el tratamiento de enfermedades humanas incluyendo el cáncer pueden ser tóxicas a dosis próximas o a veces mucho mayores que las dosis necesarias para lograr efectos beneficiosos. Para determinar las dosis y la ruta de administración apropiadas de dicho compuesto, es necesario comprender su toxicidad. Rutinariamente, los enfoques iniciales para determinar la dosis tóxica implican el uso de roedores tales como ratones para proporcionar datos preliminares que podrían apoyar el diseño de estudios similares en animales más grandes y en seres humanos. Los compuestos de ensayo (Compuestos 24, 25 y 36) se sometieron a ensayo en ratones como experimentos preliminares para determinar las dosis a utilizar en animales más grandes. El Compuesto 25 se sometió a ensayo a dosis tan elevadas como 300 mg/kg en una sola dosis y se encontró que ocasionaba toxicidades renales tales como necrosis tubular y pérdida de proteínas por la orina. También se observaron reducciones transitorias en los glóbulos blancos. Sin embargo, se observó poca toxicidad a dosis más bajas (100 y 200 mg/kg). Estas dosis seleccionadas representan una aproximación a la dosis que se debería utilizar en animales más grandes tales como ratas y perros con el fin de confirmar que dichas toxicidades existen y de pronosticar si la función renal debe ser medida en seres humanos.

30

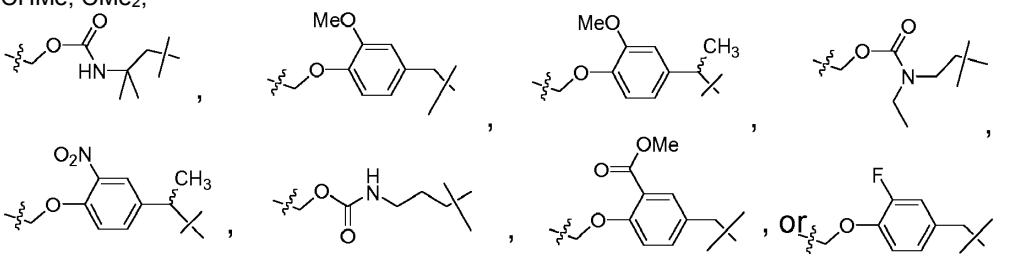
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



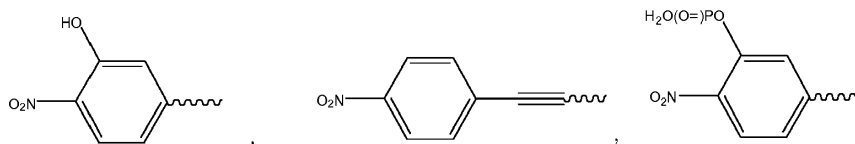
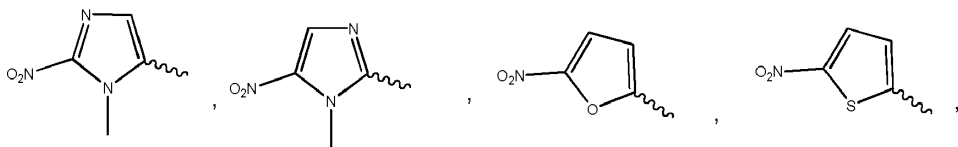
5 en donde
 cada R₉ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo y ciclopropilo;
 cada X₄ se selecciona independientemente del grupo que consiste en bromo, cloro, alquilsulfoniloxi, heteroalquilsulfoniloxi, arilsulfoniloxi y heteroarilsulfoniloxi;
 T es L-Z₃;
 L es CH₂, CHMe, CMe₂,

10

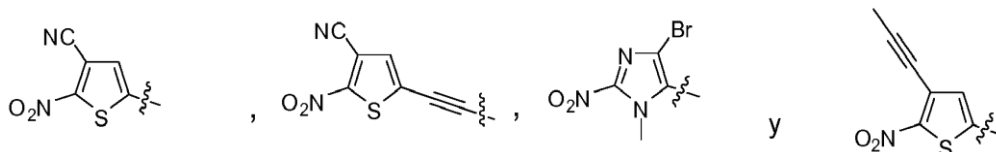
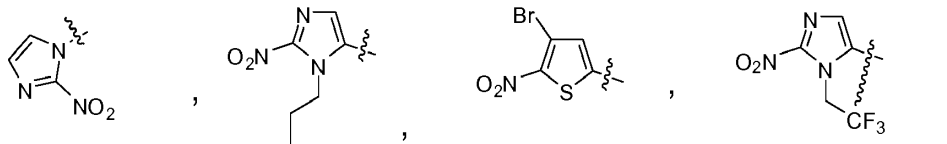
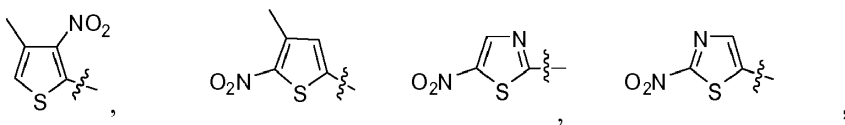


y Z₃ se selecciona del grupo que consiste en

15



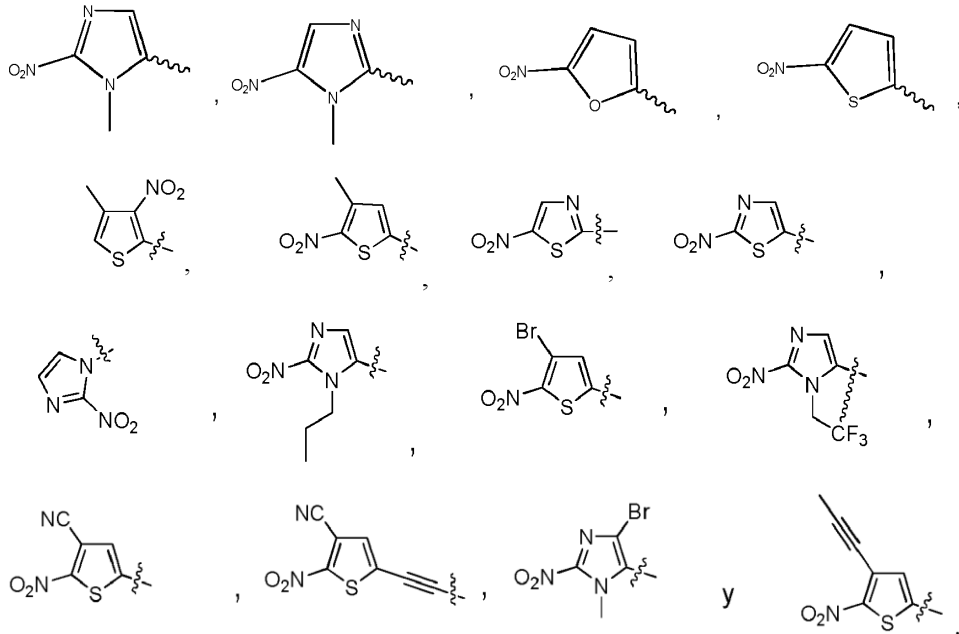
20



25

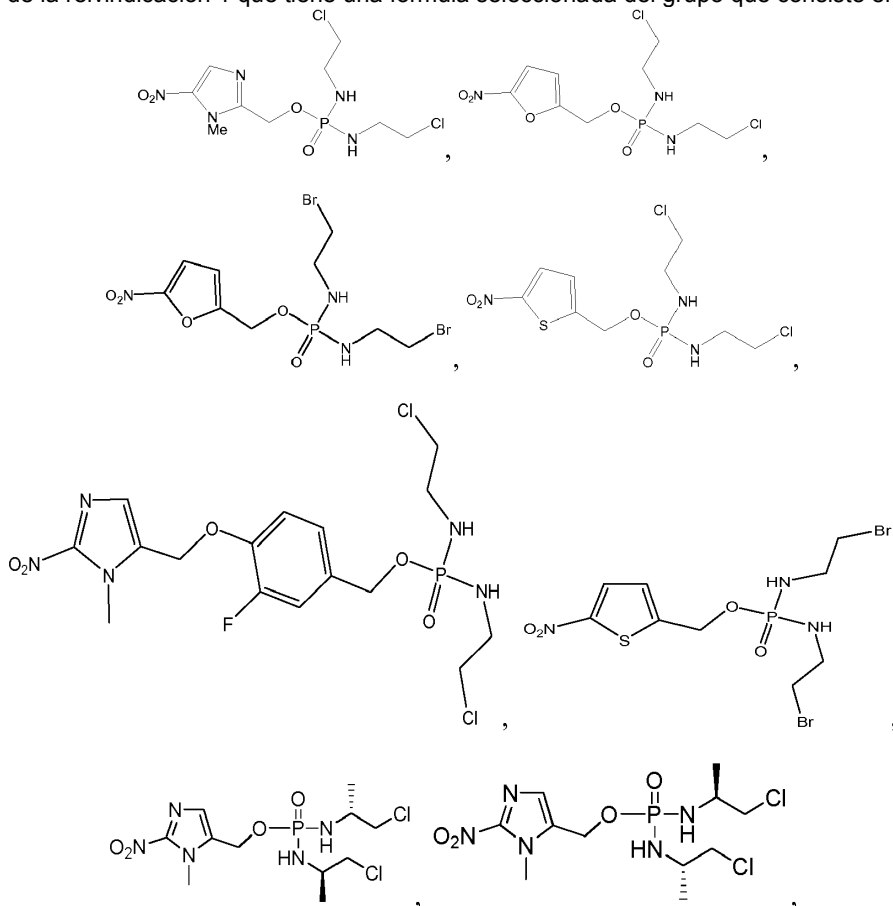
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z₃ se selecciona del grupo que consiste en:

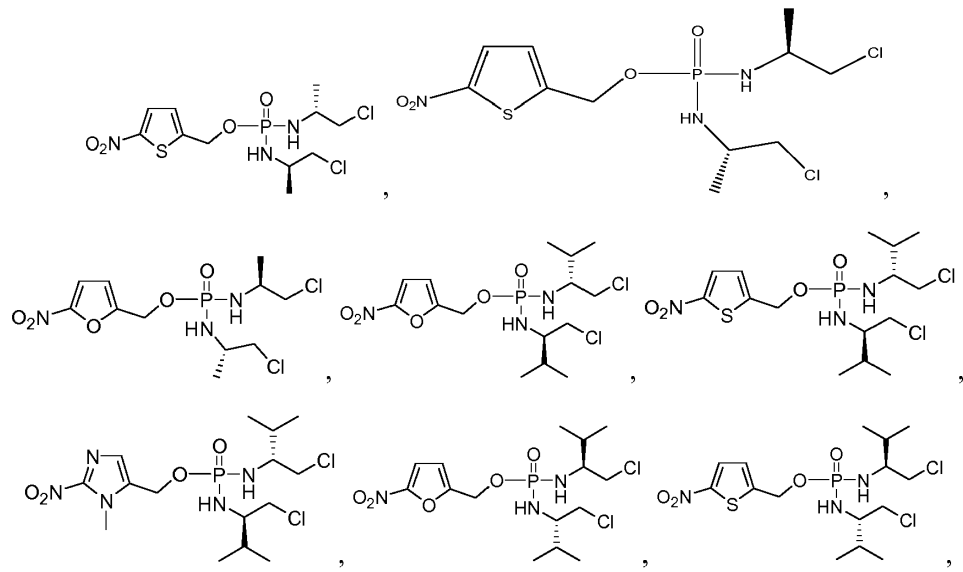


5

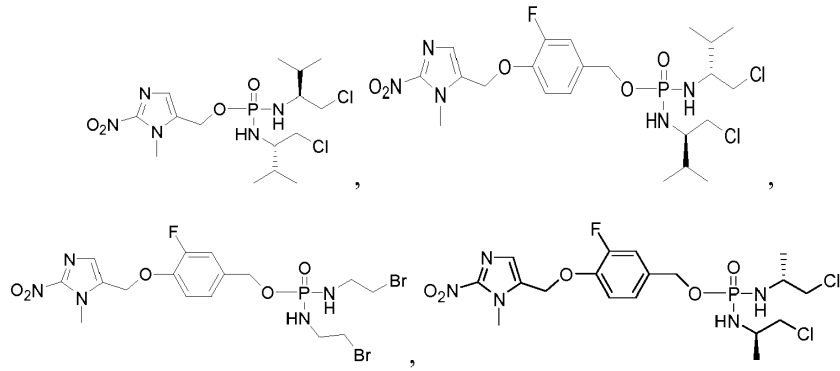
10 3. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



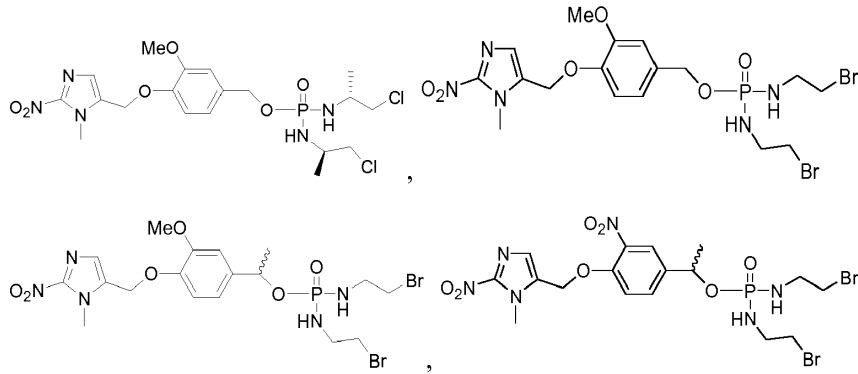
15



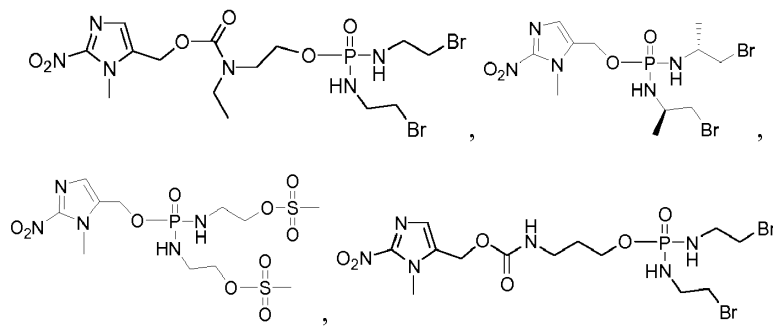
5

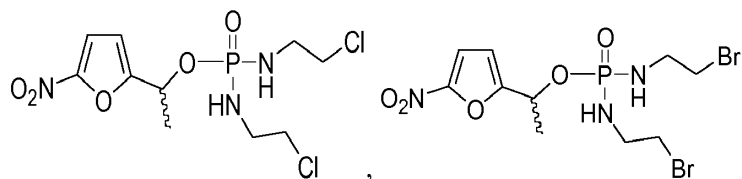
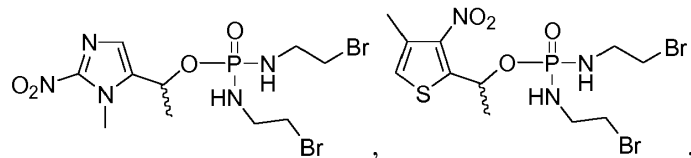
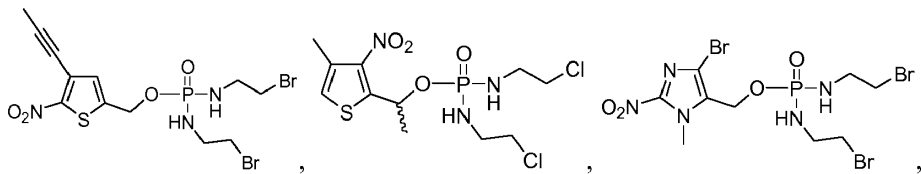
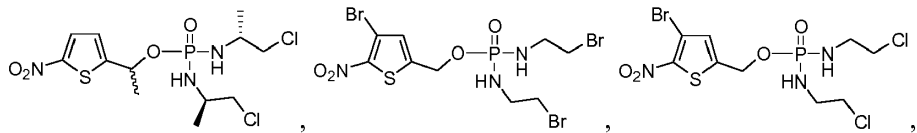
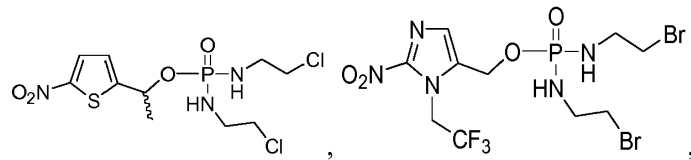
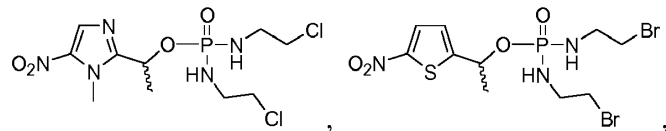
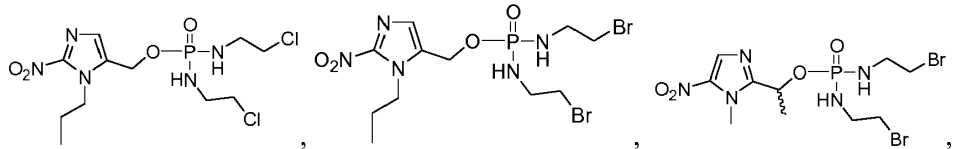
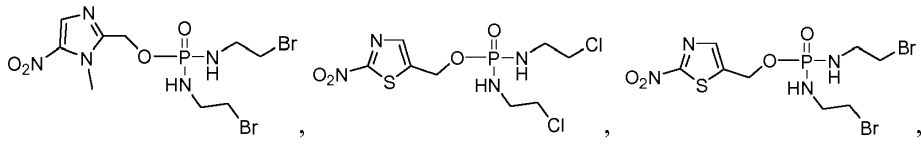
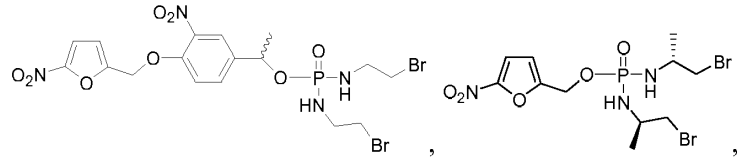
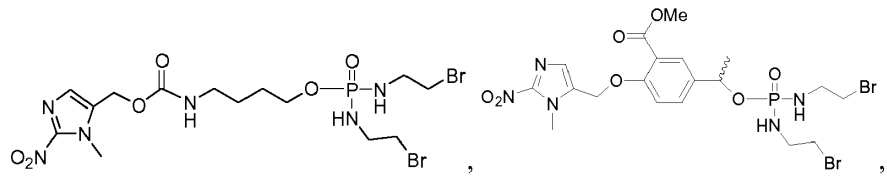


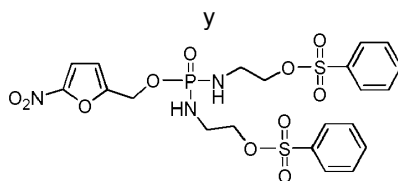
10



15







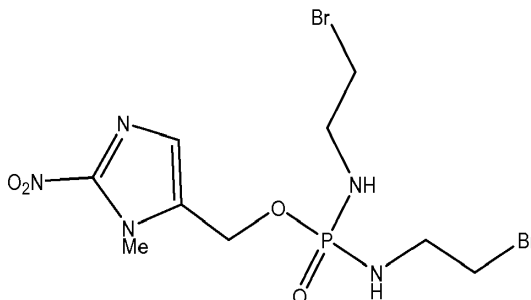
5 4. Una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o un de sus sales farmacéuticamente aceptables y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.

5. Una formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en donde el diluyente es agua o un disolvente orgánico.

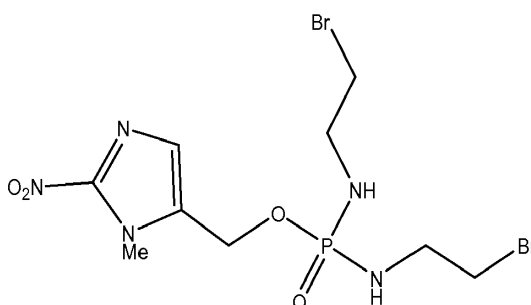
10 6. El compuesto de la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento del cáncer.

15 7. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de tumor sólido, un sarcoma de tejido blando, una leucemia, mieloma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de cerebro y un tumor de células renales.

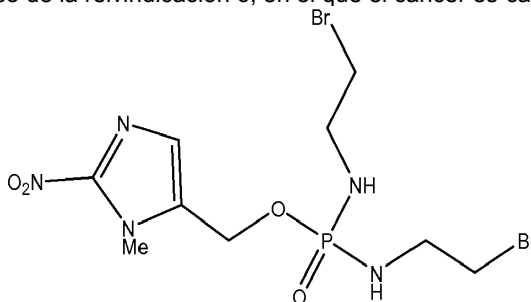
8. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es un cáncer de tumor sólido y el compuesto es



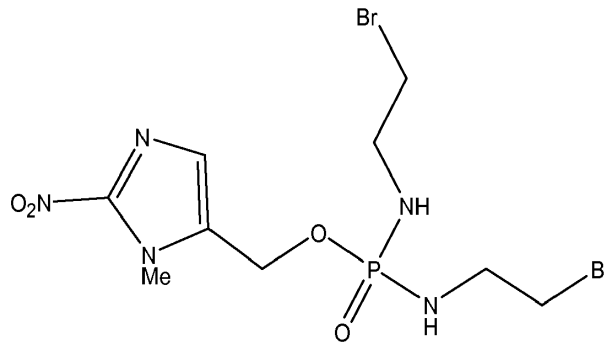
20 9. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de colon o cáncer de recto y el compuesto es



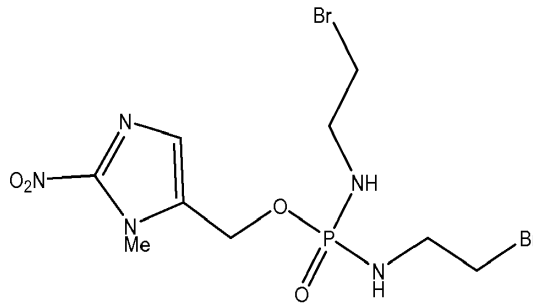
25 10. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de ovario y el compuesto es



11. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de pulmón y el compuesto es

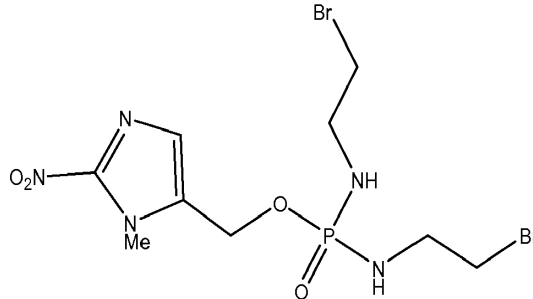


12. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de próstata y el compuesto es



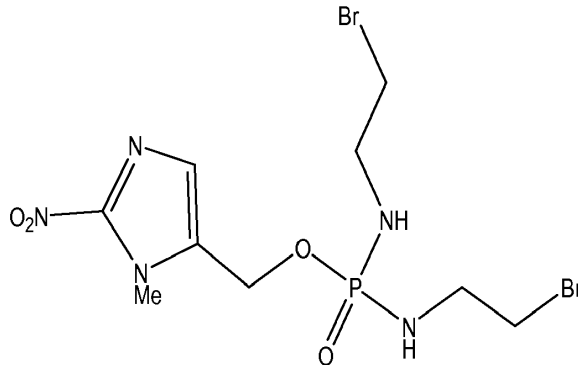
5

13. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de páncreas y el compuesto es



10

14. El compuesto o sal para el uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es un cáncer de células renales y el compuesto es



15. El compuesto o sal para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 combinado con otro agente anticanceroso.

16. El compuesto o sal para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 combinado con daunorrubicina, cisplatino, o paclitaxel.

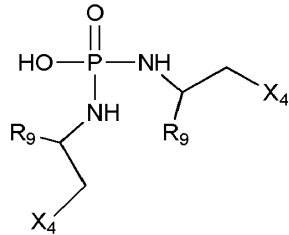
17. El compuesto o sal para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16 en una cantidad de 0,001 a 0,1 g por

día por kg de peso corporal en dosis únicas o divididas.

18. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento del cáncer en una cantidad de dosificación de 0,1 a 35 mg/kg/día en dosis únicas o divididas.

5 19. El compuesto o sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento del cáncer en una cantidad de dosificación de 0,5 a 15 mg/kg/día en dosis únicas o divididas.

10 20. Un método para sintetizar un compuesto de la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto que tiene la fórmula T-OH, una fosfina tri-sustituida, un compuesto de la fórmula



y un azodicarboxilato de dialquilo para proporcionar el compuesto de la reivindicación 1.

15

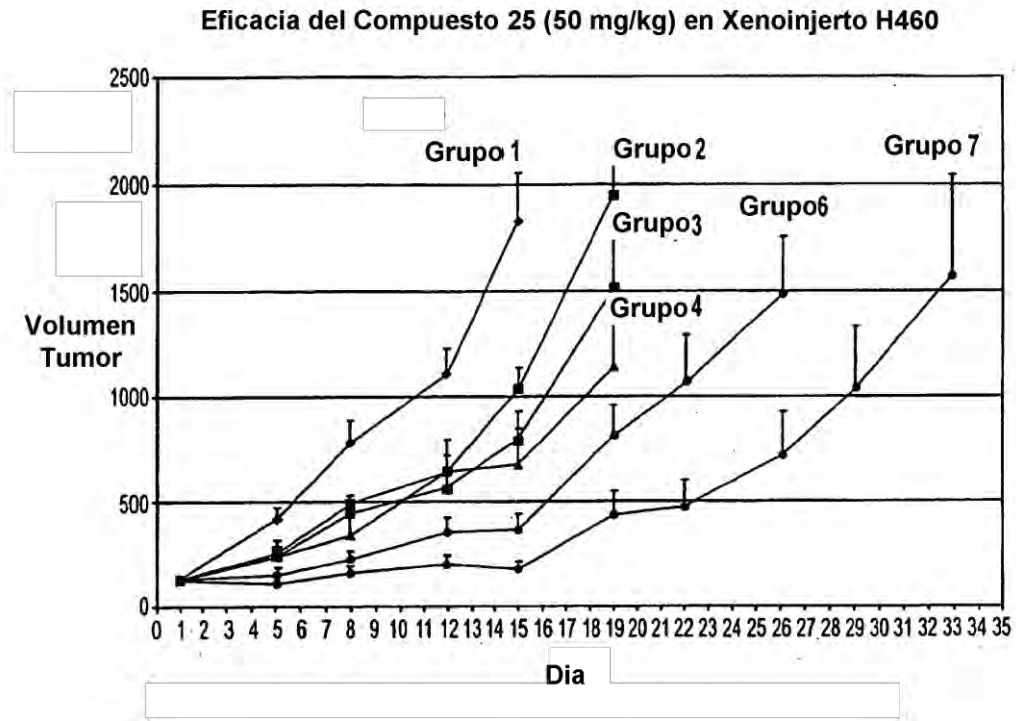
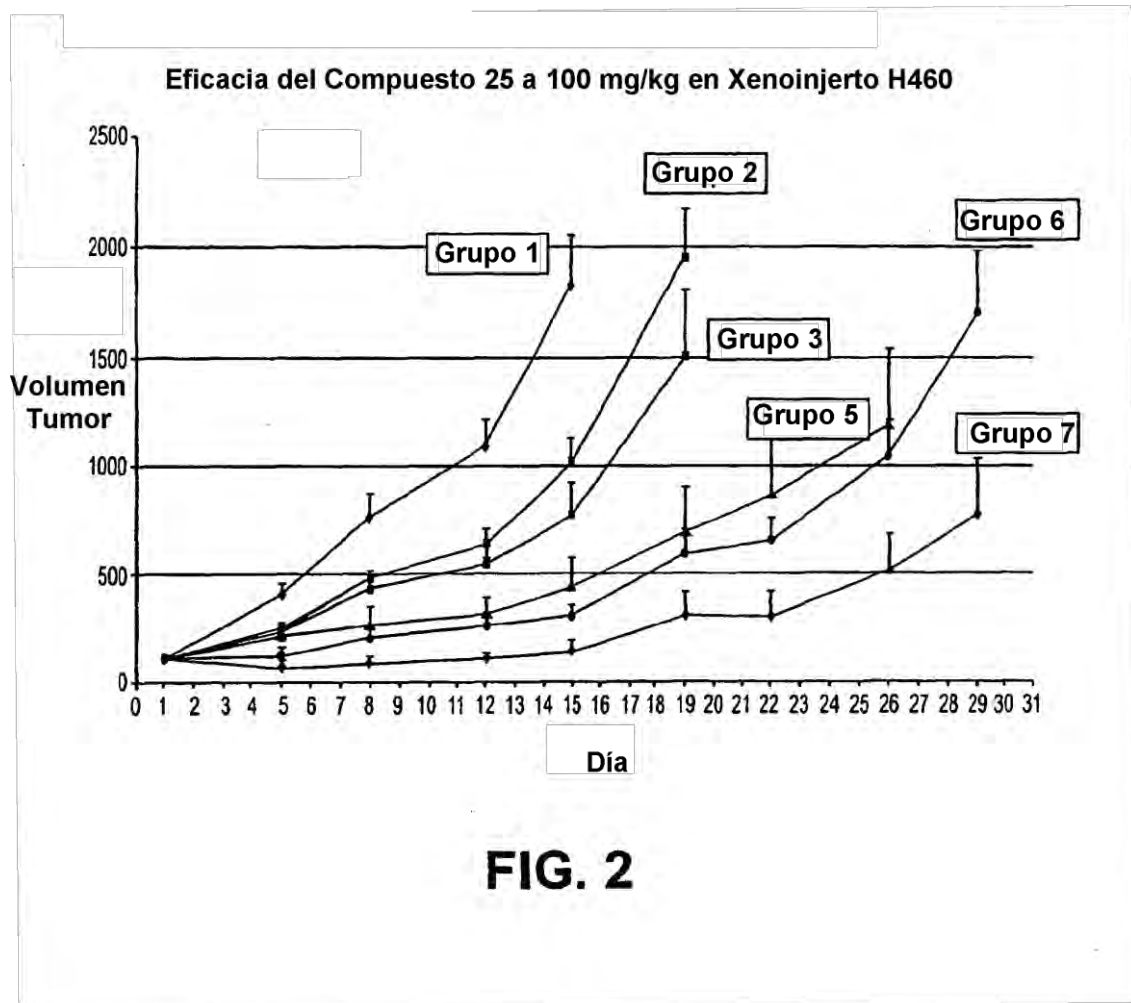


FIG. 1



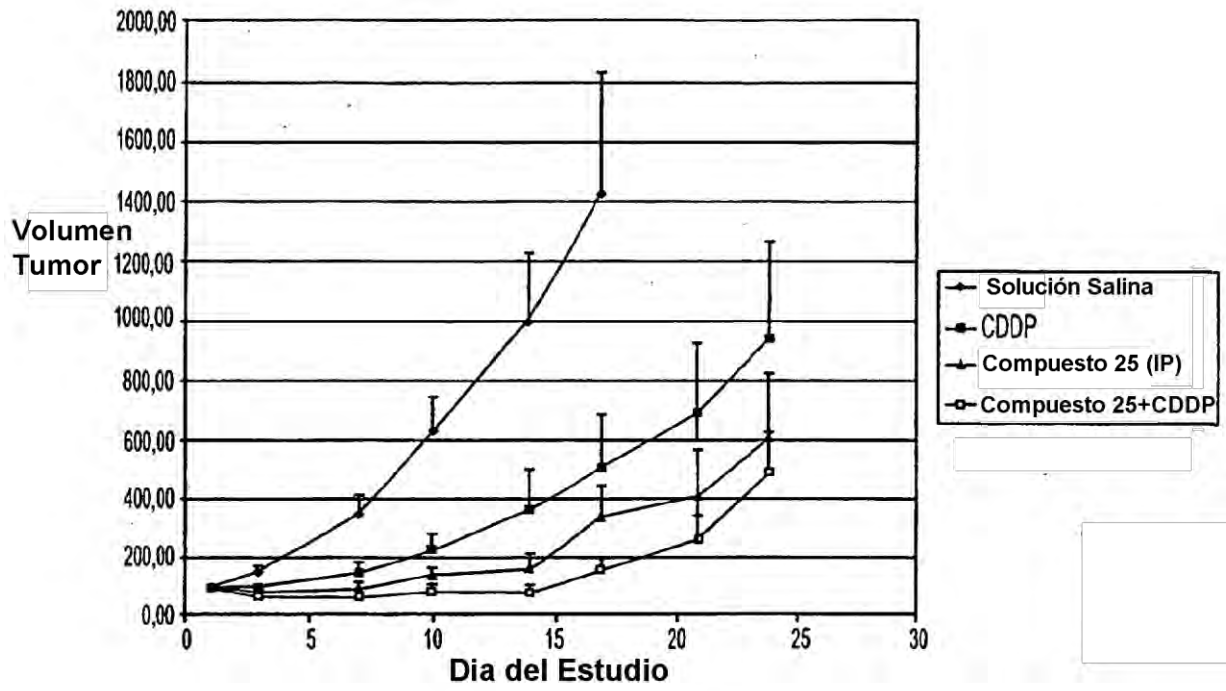


FIG. 3

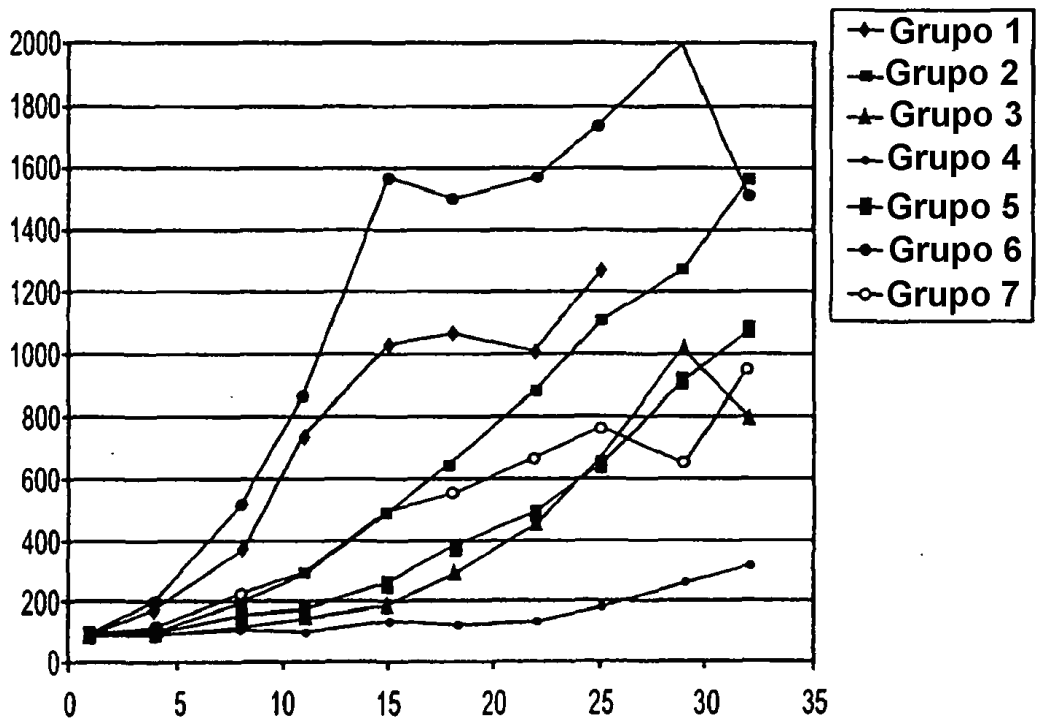


FIG. 4

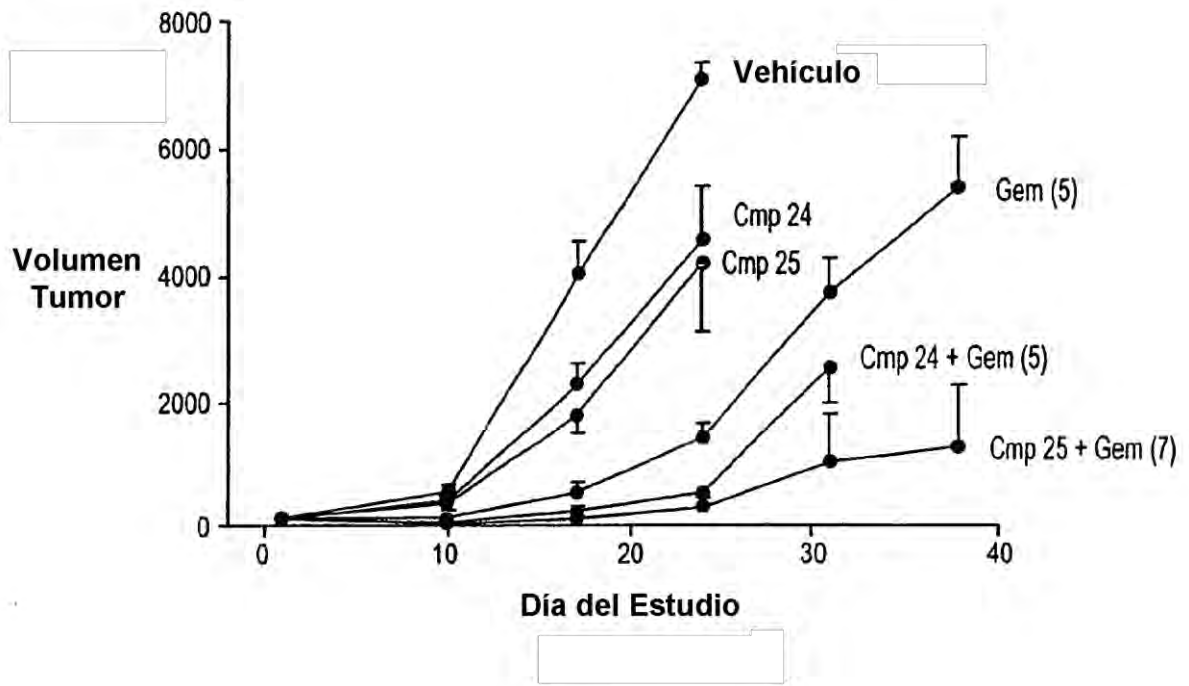


FIG. 5

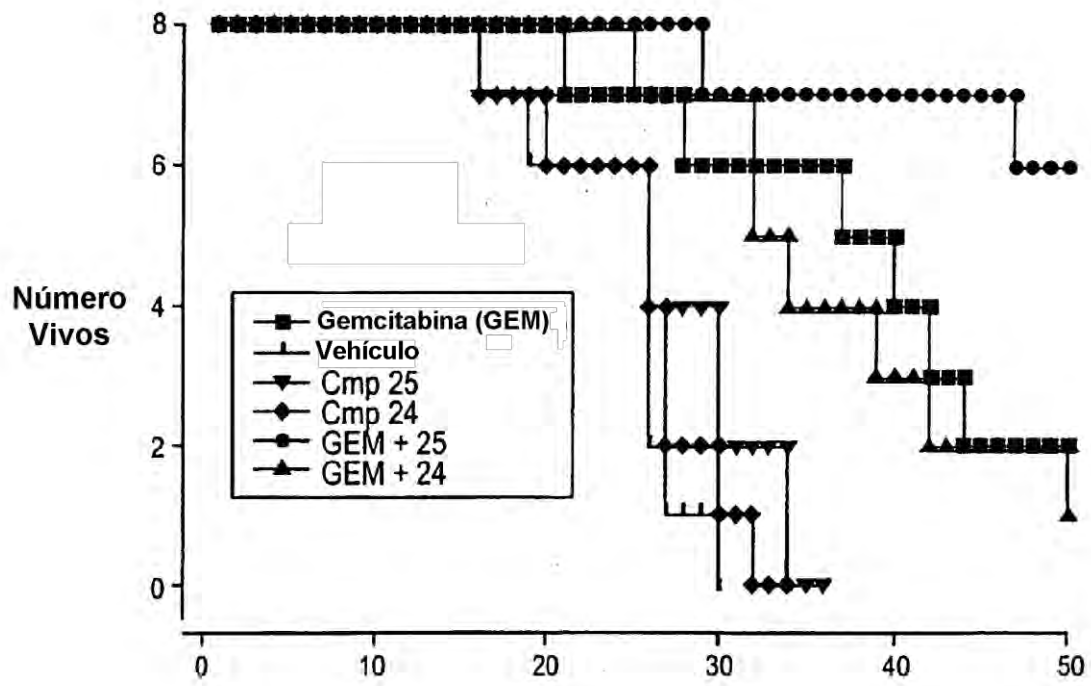


FIG. 6

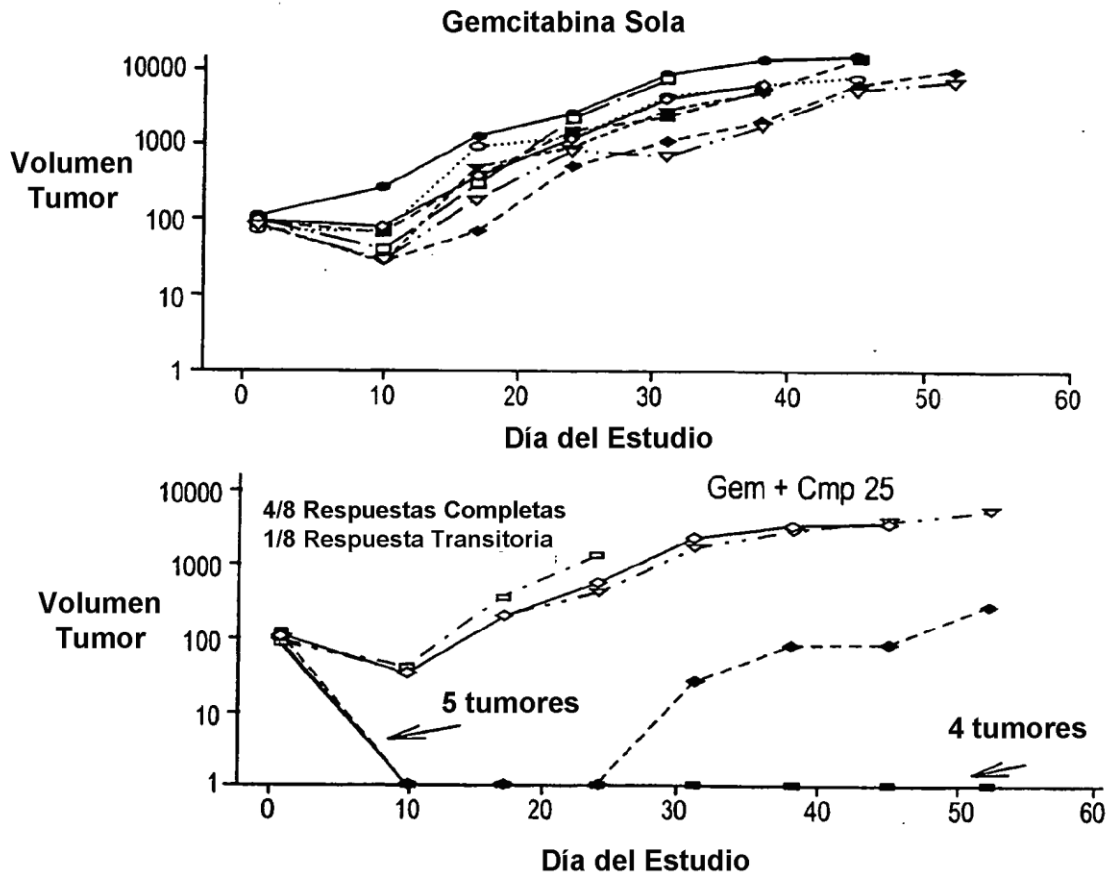


FIG. 7