

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 339**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013** **E 13742177 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2854864**

54 Título: **Composiciones que comprenden oligómeros de gemcitabina para su uso en terapia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2016

73 Titular/es:

ASTERIAPHARMA GMBH (100.0%)
Im Brückenfeld 30
68723 Oftersheim, DE

72 Inventor/es:

JUAREZ GUERRA, VICTORIA

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 582 339 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

Composiciones que comprenden oligómeros de gemcitabina para su uso en terapia

- 5 La presente invención se refiere a derivados homooligoméricos de la gemcitabina (dFdC), un antimetabolito de la citidina, para su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

- 10 La 2',2'-difluoro 2'-desoxicitidina (abreviada como dFdC), también conocida como gemcitabina, es un análogo sintético del nucleósido natural desoxicitidina. Después de su captación a través de la membrana celular por los transportadores de nucleósidos, la gemcitabina se convierte intracelularmente en primer lugar en monofosfato de difluorodesoxicitidina (dFdCMP) mediante la enzima cinasa de desoxicitidina, y posteriormente en sus metabolitos activos de difosfato (dFdCDP) y de trifosfato (dFdCTP). Durante la fase S, la dFdCTP es incorporada a la cadena de ADN naciente y esto da lugar a una terminación prematura de la cadena, después de la adición de uno o más nucleótidos, dado que las enzimas correctoras no son capaces de eliminar la dF-citosina y las polimerasas de ADN no pueden continuar con la síntesis. Adicionalmente la dFdCDP actúa como un inhibidor de la enzima reductasa de ribonucleótido (RR). La RR es la única enzima conocida que cataliza la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, y por lo tanto mantiene la reserva de trifosfato de desoxinucleótido (dNTP). Por lo tanto, la inhibición de la RR da como resultado una reducción en la reserva de dCTP, lo que favorece la incorporación de la dFdCDP en el ADN recién sintetizado. La RR humana tiene tres subunidades: un polipéptido mayor (RRMI) y dos menores (RRM2 y p53R2). La forma catalítica de la RR consiste en dos copias de la subunidad mayor y una copia de cada subunidad menor.

- 25 Se ha postulado que la dFdCDP se une irreversiblemente al RRMI y provoca su inactivación (Davidson et al., 2004). Además, se ha demostrado que el RRMI está regulado por aumento en las células de cáncer de páncreas resistentes a la dFdC cuando se comparan con las células parentales. Además, se ha demostrado una correlación significativa entre unos elevados niveles del RRMI y una baja supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas tratados con gemcitabina (Nakahira et al, 2007).

- 30 La inactivación de la dFdC también puede ser debida a la enzima desaminasa de citidina, que la convierte en 2,2'-difluorodesoxiuridina (dFdU). Además, la enzima 5'-nucleotidasa cataliza la conversión de nucleótidos en nucleótidos, contrarrestando así la acción de las cinasas de nucleósido.

- 35 Después de una administración intravenosa, la dFdC tiene una semivida corta en el plasma humano, de aproximadamente 8-17 minutos (Abbmzzese et al, 1991; Reid et al, J 2004), debido probablemente a su rápida degradación por la desaminasa en la sangre. En los tejidos, su semivida parece ser más larga. Se ha demostrado que, en ratones, la dFdC radiomarcada permanece hasta 3 horas en los tejidos normales y en tejido de sarcoma implantado subcutáneamente, aunque el índice de conversión en dFdU no se midió en estos estudios (Moog et al, 2002; Shipley et al, 1992). Es excretada en la orina principalmente en forma de su metabolito primario, la dFdU, y únicamente menos del 10 % se excreta sin procesar (Noble S, Goa KL, 1997; Moog et al, 2002). Por lo tanto, sólo una pequeña cantidad de dFdC puede alcanzar las células tumorales y puede ser convertida en su dFdCDP activa y en derivados de la dFdCTP. Ésta podría ser la razón por la cual, aunque la gemcitabina muestra una fuerte actividad citotóxica *in vitro* comparable a la de otros fármacos antineoplásicos, tales como la doxorubicina, para el tratamiento de pacientes oncológicos, tiene que ser administrada a la elevada dosis de 1.000 mg/m² de superficie corporal. Dicha dosis elevada aumenta el riesgo de efectos secundarios dependientes de la dosis, lo más notablemente una mielosupresión y toxicidad hepática. Por lo tanto, la rápida degradación de la dFdC en el suero, el hígado y el tejido tumoral por parte de la enzima desaminasa de citidina, que elimina el grupo amino en la posición 4 de la base, representa un importante obstáculo para la eficacia de la dFdC. Además, otra razón para la necesidad de administrar unas dosis elevadas es que únicamente una fracción de la dFdC administrada es activada mediante una fosforilación.

- Actualmente, la dFdC es el fármaco quimioterapéutico estándar usado en la terapia del cáncer de páncreas. Sin embargo, la tasa de supervivencia en cinco años de este cáncer sigue siendo menor del 5 % debido a recaídas y a la resistencia a la dFdC. Por lo tanto, son urgentemente necesarias unas mejoras en la quimioterapia basada en dFdC.

- 60 Hasta la fecha han fracasado los intentos de superar los problemas mencionados anteriormente. Recientemente, Sampath et al (2010) han descrito un método basado en compuestos heteropoliméricos que comprenden cadenas largas de análogos de nucleósidos o de un nucleósido, e incluyendo la dFdC, unidas por un grupo fosfodiéster. Los inconvenientes del método de Sampath son dobles. En primer lugar, la eficacia de las moléculas del profármaco heteropolimérico no se ha demostrado, siendo el principal problema que los compuestos activos (los análogos de nucleósidos o de un nucleósido) están unidos por fracciones resistentes a la nucleasa, de acuerdo con el método descrito por Sampath. El segundo lugar, actualmente no hay métodos eficaces para proporcionar dichas largas moléculas poliméricas a las células *in vivo*. Sampath et al no informan de que este método no funciona ni *in vitro* ni *in vivo*. En un informe anterior, Gmeiner et al describían homooligonucleótidos que consisten en monómeros de 5'-

monofosfato de 5-fluoruridina (5-FUMP) o de 5'-monofosfato de 5-fluodesoxiuridina (5-FdUMP) unidos covalentemente a través de enlaces fosfodiéster. Los problemas de este método son la rápida degradación de los polímeros, que puede ser debida a la inherente inestabilidad de los compuestos usados, y la toxicidad *in vivo*. Liu et al describen ensayos de la eficacia del tratamiento antineoplásico del 5-Fluorouracilo (5-FU). En particular, se presentan datos que indican que el 10mer FdUMP[IO] es más tóxico que el 5-FU frente a las células de tumor colorrectal humano (H63O), y también tiene una toxicidad reducida *in vivo* administrado a ratones balb-C en comparación con el 5-FU (Liu et al., 1999). El documento US 5.614.505 describe la síntesis de 5-Fluorouridina y de 5-Fluorodesoxiuridina homooligoméricas y los usos de las mismas como un sistema de administración de fármacos poliméricos para la producción de FdUMP.

Adicionalmente se han intentado diversas estrategias para superar la rápida degradación de la dFdC y mejorar su estabilidad, su biodisponibilidad y su actividad antitumoral. Se han usado liposomas para proteger a la gemcitabina frente a la degradación. La encapsulación de la dFdC en liposomas puede conseguirse fácilmente, ya que es una molécula pequeña que puede difundir a través de la capa liposomal (15). De hecho, la dFdC ha sido encapsulada en un gel de fosfolípido vesicular, que mostró un aumento en la concentración plasmática en comparación con la dFdC libre (Moog et al, 2002; Bommann et al, 2008). Sin embargo, a un pH fisiológico, la dFdC no tiene carga y difunde a través de la membrana liposomal. Además, parece que la dFdC induce la degradación de los fosfolípidos de la bicapa liposomal (Moog et al, 2000). Por lo tanto, la dFdC liposomal mostró un aumento en la toxicidad, debido probablemente a la liberación incontrolada del fármaco desde los liposomas.

El problema técnico subyacente en la presente solicitud podría ser contemplado en el sentido más amplio como enfrentarse a los inconvenientes de la técnica anterior. Específicamente, el problema técnico podría contemplarse como la superación de la baja eficacia y la resistencia de los sujetos mamíferos a la terapia con dFdC.

La presente invención resuelve el problema de la baja eficacia y de la resistencia a la terapia con dFdC proporcionando compuestos y formulaciones que aumentan la eficacia de la dFdC en el tratamiento de pacientes en necesidad de la misma con nuevos compuestos y formulaciones de dFdC homooligomérica, que se divulgan en esta invención.

30 Breve resumen de la invención

Aunque la dFdC tiene una fuerte actividad citotóxica *in vitro*, debe ser administrada a los pacientes oncológicos a unas elevadas dosis (superiores a 1.000 mg/m² por dosis), un hecho que aumenta el riesgo de efectos secundarios. Además, dichas dosis parecen favorecer la selección de clones muy resistentes en el tejido tumoral, que son muy difíciles, y a menudo imposibles de eliminar, dado que la dosis de la dFdC ya no puede aumentarse más.

Esta invención se refiere a un compuesto formado por 2-30 unidades de dFdC unidas con enlaces de fosfato 5'-3' para su uso en terapia. La invención también se refiere a una composición que comprende dicho compuesto para su uso en terapia.

Estos compuestos y composiciones ayudan a superar esos problemas mediante la combinación (es decir, la elaboración) de moléculas de dFdC en forma oligomérica. Dichas formas oligoméricas son preferiblemente homoméricas. El término "oligómero", cuando se usa en el presente documento, incluye 2-mers, 3-mers, 4-mers, 5-mers, 6-mers, 7-mers, 8-mers, 9-mers, 10-mers, 15-mers, 20-mers, 25-mers o 30-mers de la dFdC. Un 3-mer particularmente preferido es un trinucleótido FpFpFp. Dichas composiciones que comprenden los compuestos de la presente invención tienen unos efectos citotóxicos superiores, *in vitro* e *in vivo*, a unas dosis menores que la dFdC y son eficaces frente a las células tumorales resistentes a este fármaco. Por lo tanto, representan un nuevo agente antineoplásico y antivírico.

La presente invención proporciona compuestos y composiciones útiles para el tratamiento del cáncer, que incluyen los siguientes tipos de neoplasias: neoplasia del páncreas exocrino, del esófago, del estómago, de la vesícula biliar, del hígado, del intestino delgado, del apéndice vermiforme, del ano, del peritoneo, adenocarcinoma de colon y de recto; neoplasia de cuello de útero (desde una neoplasia intraepitelial cervical hasta un cáncer cervical invasivo), adenocarcinoma endometrial, cáncer de ovario, neoplasia de la vulva y de la vagina, sarcomas ginecológicos; neoplasias de la mama; leucemias mieloides agudas y crónicas, leucemias linfocíticas agudas y crónicas, tricoleucemia, leucemia de mastocitos, síndromes mielodisplásicos, leucemia/linfoma por HTLV-1 y de los linfocitos T, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin; carcinoma de las células renales, neoplasia de la pelvis renal, de uréter, de vejiga, de uretra, de próstata, de testículo, de pene; neoplasias de la pituitaria, de tiroides, de la corteza adrenal, del sistema neuroendocrino y endocrino enteropancreático; neoplasias neuronales, meduloblastoma, schwannoma, meningioma, sarcoma meningeal, glioblastoma multiforme, astrocitoma, pineal, oligodendrogial, ependimal y neoplasias del plexo coroideo; carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide, melanoma, dermatofibrosarcoma, tumor de las células de Merkel, rhabdomyosarcoma, retinoblastoma; cáncer de cabeza y cuello, tumores odontogénicos, neoplasias de la cavidad oral, de la faringe, de la laringe; carcinoma pulmonar macrocítico, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, neoplasias del tórax, mesotelioma maligno, timomas; sarcoma osteogénico, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, angiosarcoma y sarcoma de Kaposi.

Se prefieren los siguientes trastornos para el tratamiento con las composiciones de esta invención: cáncer de páncreas, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, lesiones cervicales precancerosas y cancerosas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal y linfoma, tal como el linfoma no Hodgkin. Las composiciones de la presente invención son especialmente útiles para el tratamiento del cáncer de páncreas.

La presente invención se refiere a compuestos que comprenden 2-30 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3' para su uso en terapia, en particular en el tratamiento de enfermedades infecciosas o de neoplasias.

La presente invención también se refiere a compuestos que comprenden 2-30 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3', en particular a homooligómeros de dFdC, y otro agente antineoplásico para su uso en terapia, en particular en el tratamiento de enfermedades infecciosas o de neoplasias que comprende una administración por separado o simultánea.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a compuestos que comprenden 2-30 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3', en particular a homooligómeros de dFdC, conjugados con un péptido de direccionamiento, un aptámero o un anticuerpo terapéutico para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa o de una neoplasia.

En otra realización más de los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención, el uso comprende la administración por separado o simultánea de los compuestos de acuerdo con la presente invención, en particular de homooligómeros de dFdC, conjugados con uno o más péptidos de direccionamiento o anticuerpos terapéuticos y un agente antineoplásico.

En otra realización, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos que comprenden 2-30 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3', en particular a homooligómeros de dFdC, con o sin péptidos de direccionamiento, aminoácidos o una encapsulación liposomal, y anticuerpos terapéuticos para su uso en terapia, para una administración simultánea o secuencial. Los homooligómeros de dFdC de acuerdo con la invención también pueden estar encapsulados en un liposoma.

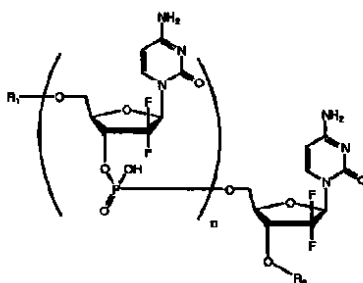
Las composiciones de la presente invención comprenden los compuestos según se describe en el presente documento. Estos compuestos están formados por 2-30 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3' para su uso en terapia. Preferiblemente, estos compuestos están formados por 2-10 unidades de dFdC unidas por puentes de fosfato 5'-3' para su uso en terapia. Más preferiblemente, el compuesto es FpFpF.

Descripción detallada de la invención

El objetivo preferido de esta invención es proporcionar composiciones, compuestos y composiciones farmacéuticas que contienen el trinucleótido FpFpF (denominado también en el presente documento trinucleótido de dFdC) como principio activo principal, así como especificar unas dosis terapéuticamente eficaces que resulten tan eficaces o más que la dFdC en terapia.

Compuestos activos:

En una realización se proporciona un compuesto de la Fórmula estructural (I):



o una sal, un hidrato, un N-óxido o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptable, en el que:

R₁ es hidrógeno, un lípido, un aminoácido, un péptido, un anticuerpo o un aptámero

R₂ es hidrógeno, un lípido, un aminoácido, un péptido, un anticuerpo o un aptámero

n = 1-30

TpF: timidinil 3'-5' fosfato 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina

FpF: 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidinil 3'-5' fosfato 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (C₁₈H₂₁O₁₀N₆F₄P)

FpFpF: 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidinil 3'-5'fosfato 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidinil 3'-5'fosfato-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (C₂₇H₃₀O₁₆N₉F₆P₂; pangemine™)

5'-FpFpF-3'-palmitoilo: 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidinil 3'-5' fosfato 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidinil 3'-5' fosfato-2'-desoxi-

2',2'-difluorocitidinil 3'-5' fosfato-1- α -(6-(palmitoilamino)hexil)-2-desoxi-D-ribosa

Por lo tanto, aparte del trinucleótido FpFpF preferido, la presente invención también proporciona composiciones, compuestos y composiciones farmacéuticas que contienen oligómeros de dFdC como se ha descrito y definido en el presente documento, como principio activo principal, así como específica dosis terapéuticamente eficaces que son tan eficaces o más que la dFdC en terapia.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de esta invención pueden aplicarse terapéuticamente en una composición farmacéutica aceptable. Pueden usarse junto con los vehículos acuosos y no acuosos habituales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo agua estéril, solución salina, las sales obtenidas mediante la adición de ácidos inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico y ácido láctico, y mediante la adición de bases inorgánicas u orgánicas como hidróxido de sodio y etanolamina sustituida, soluciones tamponadas a pH fisiológico, dextrosa de Ringer, regeneradores de electrolitos, espesantes, portadores, tensioactivos, disolventes no acuosos tales como polietilenglicol, oleato de etilo, soluciones alcohólicas, conservantes y otros aditivos tales como agentes quelantes, antioxidantes y antimicrobianos.

Dosis

La dosis debería decidirse de acuerdo con la enfermedad que se va a tratar y los antecedentes clínicos del paciente. Por lo tanto, normalmente la dosis variará con la edad, el género y el estado clínico del paciente, y debería ser ajustada por el médico experto. La dosis recomendada estará en el intervalo de entre 0,01 mg/Kg y 100 mg/Kg, preferiblemente en el intervalo de 500-1.000 mg/m², en una o más administraciones en periodos de uno o más días, preferiblemente mediante el uso de una tasa de dosis fija mediante una infusión intravenosa. Sin embargo, puede ser necesario ajustar las dosis usadas de acuerdo con los parámetros toxicológicos y farmacocinéticos de cada paciente y compuesto en particular, y de si el compuesto se administra solo o junto con otros fármacos o de si se usa un sistema de administración de fármacos.

Sujetos

Los compuestos y las composiciones de la presente invención se aplican para el tratamiento o la mejora de las enfermedades según se describe en el presente documento en mamíferos, preferiblemente en seres humanos.

Usos

Los compuestos y las composiciones para su uso en terapia según se describe en el presente documento, pueden usarse para el tratamiento de enfermedades de mamíferos, preferiblemente de seres humanos. De acuerdo con una realización de los compuestos y las composiciones para el uso, el uso comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o de un compuesto de la presente invención a un mamífero, preferiblemente un ser humano en necesidad de los mismos.

Figuras

Figura 1. Inhibición de la proliferación de células humanas cancerosas tratadas con dFdC o con homooligómeros y heterooligómeros que contienen dFdC. Las células HeLa que crecen en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) se trataron con: 1) TpF; 2) FpF; 3) TpFpF; 4) FpFpF; 5) dFdC. La concentración del fármaco en el medio de cultivo era de 20 mM. La proliferación celular se midió 5 días después de iniciar el tratamiento mediante el uso del ensayo del WST-1. El valor medio obtenido con las células no tratadas se estableció en 1.

Figura 2. Proliferación de células MIA PaCa-2 no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 3. Proliferación de células ASPC no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 4. Proliferación de células BXPC-3 no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 5. Proliferación de células HeLa no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 6. Proliferación de células CaSki no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 7. Proliferación de células C33A no tratadas (0) o tratadas con dFdC o el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 8. Proliferación de células Huh-7 no tratadas (0) o tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 9. Proliferación relativa de células MIA PaCa-2 tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF, que fueron preincubadas con suero humano en los periodos de tiempo indicados. Los valores de los porcentajes son relativos a las células no tratadas.

Figura 10. Inhibición de la proliferación de células MIA PaCa-2 tratadas con dFdC y con el trinucleótido FpFpF, que fueron preincubadas con suero humano en los periodos de tiempo indicados. Los valores de los porcentajes son relativos a las células no tratadas.

Figura 11. Proliferación relativa de células HeLa tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF, que fueron preincubadas con suero humano en los periodos de tiempo indicados. Los valores de los porcentajes son relativos a las células no tratadas.

Figura 12. Inhibición de la proliferación de células HeLa tratadas con dFdC o con el trinucleótido FpFpF, que fueron preincubadas con suero humano en los periodos de tiempo indicados. Los valores de los porcentajes son relativos a las células no tratadas.

Figura 13. Proliferación de células HeLa naturales después del tratamiento con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 14. Proliferación de células HeLa resistentes a la dFdC después del tratamiento con dFdC o con el trinucleótido FpFpF a las concentraciones indicadas.

Figura 15. Inhibición de la proliferación de células Bxpc-3 (A) y MIA PaCa-2 (B) tratadas con P-dFdC o con P-FpFpF, ambos conjugados con un péptido de unión tumoral HBP-1, a las concentraciones indicadas. Los valores de la proliferación se refieren a las células no tratadas.

Figura 16. Inhibición de la proliferación de células Panc-1 tratadas con dFdC (A), con FpFpF (B) o con FpFpF-Pal (C) a las concentraciones indicadas. Valores de proliferación de las células no tratadas.

Ejemplos

La presente invención se describe con más detalle mediante los siguientes ejemplos, los ejemplos de referencia y los ejemplos de ensayo.

Ejemplo 1: síntesis de los reactivos necesarios para la preparación de los oligonucleótidos.

Métodos y resultados: la síntesis de los diversos compuestos necesarios para la producción de los oligonucleótidos ensayados en esta invención se llevó a cabo como sigue:

N⁴-benzoil-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (2). A una suspensión de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (Gemcitabina, F) (1, C₁₆H₁₅F₂N₂O₅, Carbosynth Limited) (1,5 g, 6,35 mmol) coevaporada en piridina anhidra y disuelta en dimetilformamida, se añadieron 3,3 ml (15,8 mmol) de hexametildisilazano. Después de agitar durante 1 hora a la temperatura ambiente, la solución se concentró y el residuo se secó sobre tolueno. (Rf: 0,6 20 % de MeOH/DCM). El residuo se disolvió en piridina anhidra y se añadieron 1,1 ml de cloruro de benzoílo (9,52 mmol). Después de 30 minutos de agitación magnética, la solución se concentró a sequedad y después se disolvió en tolueno y se coevaporó. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con bicarbonato de sodio 1 M y se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró a sequedad (Rf. 0,93 7 % de MeOH). La eliminación del grupo protector de trimetilsililo se llevó a cabo mediante el tratamiento del residuo con una mezcla que contiene 10 ml de dioxano, 10 ml de metanol y 5 ml de NH₃ (32 %) durante 15 min a la temperatura ambiente. La solución se concentró, se disolvió en diclorometano (DCM) y se lavó con un 5 % de NaHCO₃ y una solución saturada de NaCl. Después la fase orgánica se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante una cromatografía en columna en gel de sílice mediante el uso de un gradiente desde el 1 % hasta el 4 % de metanol (MeOH) en DCM. Después de la concentración de las fracciones portadoras del compuesto deseado, se obtuvieron 1,34 g de la N⁴-benzoil-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (2). Rendimiento del 62 %. C₁₆H₁₅F₂N₃O₅. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,3 (m, 2H, H-5'), 3,8 (dd, 1H, H-4'), 3,9 (m, 2H, H-5'), 4,3 (m, 1H, H-3'), 6,6 (t, 1H, H-1'), 7,6-7,5 (m, 5H, arom-H), 7,9 (m, 1H, H-5), 8,4 (d, 1H, H-6). EM, masa esperada M = 367,1; encontrada 368,1 (M + H)⁺.

5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-N⁴-benzoil-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (3). A una solución de 2 (1 g, 2,93 mmol) en piridina anhidra se añadieron 24,4 g (0,2 mmol) de 4-dimetilaminopiridina y 1,09 g (3,2 mmol) de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo. Después de agitar durante una noche a la temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de MeOH y la solución resultante se concentró. Después el residuo se disolvió en DCM y la capa orgánica se lavó con una solución acuosa el 5 % de NaCO₃ y una solución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con DCM

al 2 % de MeOH/DCM, obteniendo 0,94 g de **3**. Rendimiento del 86 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3,5 (m, 2H, H-5'), 3,8 (s, 3H, OCH₃), 4,1 (dd, 1H, H-4'), 4,5 (m, 1H, H-3'), 6,5 (m, 1H, H-1'), 6,8-7,8 (m, 18H, arom-H), 8,2 (d, 1H, H-5), 8,6 (m, 1H, H-6). EM esperado para C₃₇H₃₃F₂N₃O₇: 669,23. Encontrado: 670,23 (M + H)⁺.

5 **5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidito)-N⁴-benzoil-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (4)**. A una solución de **3** (0,5 g, 0,8 mmol) en DCM anhidro se añadieron 0,418 ml (2,4 mmol) de diisopropietilamina junto con 0,269 ml (1,2 mmol) de 2-cianoetil-N,N'-diisopropilclorofosforamidito (1,2 mmol, 268 μl) a 0 °C en una atmósfera de argón. Después de 15 min se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La reacción se inactivó con lavados de NaHCO₃ al 5 % y NaCl saturado, y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna en gel de sílice (hexanos/EtOAc 1:1 + 2 % de Et₃N) para dar 0,67 g. Rendimiento: 57 % de **4** en forma de una mezcla de diastereoisómeros. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,0-1,3 (m, 12H, 4 CH₃), 2,3 (t, 2H, CH₂CN), 2,6 (t, 2H, CH₂O), 3,5 (m, 2H, H-5'), 3,6 (m, 1H, CH isp), 3,8 (s, 3H, OCH₃), 4,1 (dd, 1H, H-4'), 4,6 (m, 1H, H-3'), 6,5 (m, 1H, H-1'), 6,8-7,8 (m, 18H, arom-H), 8,2 (d, 1H, H-5), 8,63 (m, 1H, H-6), 8,8 (s, 1H, NH). EM esperado para C₄₆H₃₀F₂N₅O₈P: 869,34. Encontrado: 870,3 (M + H)⁺.

Funcionalización del soporte sólido (CPG).

20 En primer lugar, se convierte el compuesto **3** en el derivado de hemisuccinato que está cargado en el vidrio de poro de control de amino. El compuesto **3** (20 mg, 0,031 mmol) se disolvió en DCM y se trató con N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 5,75 mg, 0,047 mmol) y anhídrido succínico (4,71 mg, 0,047 mmol). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. A continuación, la fase orgánica se lavó con NaH₂PO₄ 0,1 M y se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó a vacío para dar el compuesto **5** que se usó sin purificación adicional.

25 Se mezcló 2,2'-ditio-bis-(5-nitropiridina) (0,03 mmol, 9,3 mg) disuelta en acetonitrilo/dicloroetano (1:1) con una solución del derivado de succinato **5** (20 mg, 0,031 mmol) y DMAP (0,03 mmol, 3,66 mg) disuelto en 500 μl de acetonitrilo. A la solución clara obtenida se añadieron 7,8 mg (0,03 mmol) de trifenilfosfina disuelta en 0,1 ml de acetonitrilo. La mezcla se agitó vorticialmente y se añadió a un vial que contenía resina LCA CPG (CPG, Inc.) (200 mg, 71 μmol/g). El soporte sólido se recogió mediante filtración y se lavó con CH₂Cl₂, CH₃CN, y posteriormente se secó a vacío. Después, el soporte sólido se suspendió en 1 ml de anhídrido acético/piridina/tetrahidrofurano (1:1:8) y 1 ml de una solución (10 % de N-metilimidazol en tetrahidrofurano) durante 30 minutos. El soporte sólido resultante (**6**) se recogió mediante filtración y se lavó con MeOH y Et₂O, y se secó a vacío. La cantidad de carga se calculó mediante un ensayo de catión tritilo con un 70 % de HClO₄-EtOH para dar 38,4 μmol/g.

35 **Ejemplo 2:** síntesis de hetero y homooligómeros de nucleótidos que contienen dFdC.

Métodos y resultados: los oligonucleótidos se sintetizaron mediante el uso de la metodología del fosforamidito en fase sólida. Las síntesis se llevaron a cabo a una escala de 1 μmol en un sintetizador Applied Biosystems 3400 mediante el uso de 5'-O-DMT-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidito)-2'-desoxiimidina y del fosforamidito **4**. Como soporte sólido se usó el vidrio de poro controlado y (CPG) funcionalizado con 5'-O-DMT-N⁴-benzoil-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina preparado anteriormente. Se usaron las siguientes soluciones: 1H-tetrazol 0,4 M en ACN (activación); ácido tricloroacético al 3 % en DCM (destritilación), anhídrido acético/piridina/tetrahidrofurano (1:1:8) (protección A), N-metilimidazol al 10 % en tetrahidrofurano (protección B), yodo 0,01 M en tetrahidrofurano/piridina/agua (7:2:1) (oxidación de fosfato a fosfato). El tiempo de acoplamiento fue de 15 min para el fosforamidito **4**. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en modo DMT-ON. Después de la síntesis en fase sólida, el soporte sólido se transfirió a un vial de vidrio con tapón de rosca y se incubó a 55 °C durante 1 h con 1,5 ml de una solución de NH₃ (33 %). Después el vial se enfrió en hielo y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml y se evaporó a sequedad mediante el uso de una centrífuga de evaporación. El residuo que se obtuvo se desalinizó en una columna NAP-5 mediante el uso de agua como eluyente y se evaporó a sequedad. El oligonucleótido se purificó mediante una HPLC (DMT-ON). Columna: Nucleosil 120-10 C₁₈ (de 250 x 4 mm); 20 min de un gradiente lineal del 15 % al 80 % de B y 5 min de un 80 % de B, caudal 3 ml/min; la solución A era un 5 % de ACN en trietilacetato de amonio acuoso 0,1 M (TEAA) y B un 70 % de ACN en TEAA acuoso 0,1 M. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo que se obtuvo se trató con 1 ml de una solución de AcOH al 80 % y se incubó a la temperatura ambiente durante 30 min. El oligonucleótido desprotegido se desalinizó en una columna NAP-10 mediante el uso de agua como eluyente. Los oligonucleótidos AU se cuantificaron mediante una absorción a 260 nm y se confirmaron mediante una espectrometría de masas MALDI. Los espectros de MALDI-TOF se realizaron mediante el uso de un espectrómetro de masas Perseptive Voyager DETMRP, equipado con un láser de nitrógeno a 337 nm mediante el uso de un pulso de 3 ns. La matriz usada contenía 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, 10 mg/ml en ACN/agua 1:1) y citrato de amonio (50 mg/ml en agua) o ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (ACH 10 mg/ml en ACN/agua 1:1). Dinucleótido TpF: EM esperado para C₁₉H₂₃F₂N₅O₁₁P: 566. Encontrado: 566 (M). Dinucleótido FpF: EM esperado para C₁₈H₂₉F₄N₆O₁₀P: 587. Encontrado: 587 (M). Trinucleótido FpFpF: EM esperado para C₂₇H₃₀F₆N₉O₁₆P₂: 913. Encontrado: 913 (M).

Ejemplo 3: síntesis del derivado de palmitoilo del trinucleótido.

El derivado de palmitoilo del trinucleótido se sintetizó mediante el uso de la metodología del fosforamidito en fase sólida como se ha descrito anteriormente. Las síntesis se llevaron a cabo a una escala de 1 μ mol en un sintetizador Applied Biosystems 3400 mediante el uso del fosforamidito **4** y la CPG disponible comercialmente funcionalizada con palmitoilamino hexil 2-desoxirribosa (5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1- α -(6-(palmitoilamino)hexil)-2-desoxi-D-ribosa en un vidrio de poro controlado de 3'-O-succinilo, Link Technologies) como soporte sólido. Después de la síntesis en fase sólida, el soporte sólido se transfirió a un vial de vidrio con tapón de rosca y se incubó a la temperatura ambiente durante 4 h con 1,5 ml de una solución de NH₃ (33 %)/dioxano (1:1). Después de la filtración del soporte sólido, el sobrenadante se evaporó a sequedad. El residuo se purificó como se ha descrito anteriormente. Palmitoil-trinucleótido (5'-FpFpF-3'-palmitoil): EM esperado: 1.444. Encontrado: 1.444 (M).

Ejemplo 4: actividad citotóxica de los hetero y homooligómeros de la dFdC

Objetivo: cuantificar la actividad citotóxica de los hetero y homooligómeros de la dFdC en líneas celulares cancerosas en comparación con la dFdC.

Métodos: se incubaron líneas celulares cancerosas cervicales (HeLa, SiHa, CaSki y C-33) a 37 °C/5 % de CO₂ en medio que contiene DMEM con Glutamax™, piruvato de sodio 1 mM, penicilina/estreptomicina (PS) y un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen/LifeTechnologies). Las líneas celulares de cáncer de páncreas se mantuvieron en RPMI 1640 complementado con Glutamax™, PS y un 10 % de FBS. Para el ensayo de citotoxicidad, se colocaron en placas de 96 pocillos 1 x 10⁴ células/pocillo. El volumen final del medio de cultivo en cada pocillo era de 100 μ l. Las células se trataron con diferentes concentraciones del fármaco, según se indica. Las células del control sin tratar se establecieron en paralelo. Las células se incubaron durante 72 horas, tras lo cual se llevó a cabo el ensayo WST-1 (Roche). Este ensayo utiliza la sal de tetrazolio WST-1 [2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(disulfofenil)-2H-tetrazolio], que es escindido a un formazán soluble en un proceso que se produce principalmente en la superficie celular. Debido a que la reducción del WST-1 depende en su mayor parte de la producción glucolítica de NAD(P)H en las células viables, la cantidad de pigmento de formazán formado se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. Las células se incubaron con WST-1 durante 1 hora a 37 °C/5 % de CO₂, después se cuantificó la cantidad de pigmento de formazán producido mediante el uso de un espectrofotómetro de barrido (lector de placas ELKA). La absorbancia se midió a una longitud de onda de ensayo de 450 nm y a longitud de onda de referencia de 630 nm. Después se restó la absorbancia de fondo a 630 nm de la medición a 450 nm. También se restó el valor medio de una serie de pocillos vacíos, que contienen medio pero no células.

Resultados: 1) el análisis de los efectos citotóxicos de una serie de diferentes hetero y homooligómeros de la dFdC que se ensayaron en la línea celular tumoral HeLa se ilustra en la Figura 1. El tri-homooligómero de dFdC (trinucleótido de FpFpF) mostró una tasa significativamente mayor de inhibición de la proliferación celular (-77 %) en comparación con la dFdC (-63 %) ($p < 0,05$) y el di-homooligómero de FpF (-56 % de inhibición) ($p < 0,03$). Además de la inhibición de la proliferación celular, las células tratadas con estos compuestos mostraron unos efectos citopáticos (cambios en la morfología a una forma redondeada, vacuolización y otros). En las mismas condiciones, los heterooligómeros, tales como el dinucleótido TpF y el trinucleótido TpFpF, eran menos activos en la inhibición del crecimiento celular (19 % y 11 % de inhibición, respectivamente).

2) Se ensayó el trinucleótido FpFpF en comparación con la dFdC para comprobar su capacidad de inhibir el crecimiento celular de células tumorales de diferente origen: cáncer de páncreas (MIA PaCa-2, ASPC) cánceres cervical (HeLa, CaSki, C33A) y hepático (Huh-7). En todos los casos, las células se colocaron en placas el día anterior al tratamiento a una densidad de 5.000 células/pocillos en placas multipocillo de 96. Las células (6 pocillos por condición) se trataron a las concentraciones indicadas y se incubaron durante 72 horas adicionales. En ese momento se cuantificó la proliferación celular mediante el uso del ensayo del WST-1 como se ha descrito anteriormente. Los pocillos de control con células sin tratar y sin células se analizaron en paralelo. Los valores obtenidos con el último con se sustrajeron del resto. Los valores medios correspondientes a los pocillos que no se trataron se establecieron en el 100 % de proliferación, y los valores medios obtenidos con las células tratadas se refirieron a los mismos. Según se ilustra en la figuras C hasta I, en estas condiciones en todos los casos, el trinucleótido de FpFpF inhibió la proliferación celular con una eficacia significativamente mayor que el monómero de dFdC.

Ejemplo 5: estabilidad del trinucleótido de FpFpF en suero humano.

Objetivo: demostrar una mayor estabilidad del trinucleótido FpFpF en suero humano en comparación con la dFdC.

Métodos: las células se sembraron en placas de 96 pocillos un día antes del tratamiento a una densidad de 5.000 células/pocillo en 100 μ l/pocillo de medio DMEM/Glutamax™/piruvato de 1 sodio mM/PS/10 %/FBS y se cultivaron a 37 °C/5 % de CO₂. Se prepararon diluciones en suero individuales de la dFdC y del trinucleótido FpFpF a partir de soluciones madre 1 mM a una concentración final de 20 μ mol/l. Las alícuotas de los sueros que contenían los fármacos se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante los tiempos indicados antes de que fueran añadidas a las células a las concentraciones finales indicadas. Las células se cultivaron durante 72 horas adicionales, tras lo cual

se cuantificó la proliferación celular mediante el uso del ensayo del WST-1. En paralelo se analizaron dos controles: células sin tratar y células tratadas con dFdC o con trinucleótidos FpFpF que no fueron incubadas con suero.

5 Resultados: los datos obtenidos con las líneas celulares MIA PaCa-2 y HeLa se muestran en las figuras J-K y L-M, respectivamente. Estos resultados obtenidos con ambas líneas celulares demuestran que el FpFpF es estable en suero humano durante al menos 2 horas. La inhibición de la proliferación con FpFpF en este periodo permaneció en aproximadamente el 40 %, mientras que la inhibición con dFdC decayó hasta un 5 % (HeLa) y hasta un 10 % (MIA PaCa-2) en el mismo periodo de tiempo.

10 **Ejemplo 6:** actividad citotóxica del trinucleótido FpFpF en células cancerosas resistentes a la dFdC

Objetivo: demostrar la actividad antiproliferativa del trinucleótido FpFpF en células tumorales con resistencia a la dFdC.

15 Métodos: se trataron secuencialmente células HeLa naturales (parentales) con cuatro rondas de concentraciones crecientes (desde 5 hasta 40 nM) de dFdC hasta que se volvieron resistentes al fármaco y fueron capaces de proliferar después del tratamiento con dFdC a la mayor concentración. Las células parentales y las resistentes se colocaron en placas un día antes del tratamiento a una densidad de 5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de medio DMEM/Glutamax™/piruvato de sodio 1 mM/PS/FBS al 10 % y se cultivaron a 37 °C/5 %
20 de CO₂. Los tratamientos (6 pocillos por condición) con dFdC o con FpFpF se llevaron a cabo a las concentraciones especificadas en las figuras N y O, y las células se incubaron durante 72 horas, tras lo cual se midió la proliferación mediante el uso del ensayo del WST-1. Las células sin tratar se usaron como referencia para establecer el 100 % de los valores de proliferación.

25 Resultados. Las células HeLa resistentes a la dFdC eran significativamente sensibles a los efectos antiproliferativos del FpFpF (compárense las Figuras N y O).

Ejemplo 7: actividad citotóxica del trinucleótido FpFpF unido a un péptido

30 Objetivo: para probar y cuantificar la inhibición de la proliferación celular causada por el trinucleótido FpFpF conjugado con un péptido que se une específicamente a las células tumorales.

Métodos: las terapias objetivo pretenden mejorar la acumulación de los fármacos quimioterapéuticos en las células tumorales, provocando así un efecto citotóxico más potente. Una forma de conseguir esto es mediante el uso de péptidos que se unen a las proteínas de la superficie de las células tumorales con una elevada afinidad. Previamente se ha demostrado que uno de dichos péptidos, H₂N-SPRGDLAVLGHKY-COOH (HBP-1) (SEQ ID No: 1) (Nothelfer et al, 2009), se une a las células tumorales a través del motivo intrínseco RGD. Este péptido se sintetizó, se purificó y se conjugó con FpFpF o con dFdC mediante el uso del reticulador de carbodiimida soluble en agua EDC (Thermo Scientific Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. El exceso de reactivos y los subproductos de la reticulación se eliminaron mediante pases sucesivos a través de dos columnas Sephadex G-25. La concentración de péptido en el producto reticulado se determinó mediante el método del BCA (Thermo Scientific Pierce) y la concentración de dFdC o de FpFpF unido al péptido en los conjugados purificados (abreviados como P-dFdC y P-FpFpF, respectivamente) se midió espectrofotométricamente (A 260 nm) frente a las curvas patrón.

45 Resultados. Los efectos del P-dFdC y del P-FpFpF sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de páncreas BxPC-3 y MLA PaCa-2 se muestran en la figura 15. El tratamiento con P-FpFpF provocó una mayor inhibición de la proliferación celular en comparación con el tratamiento con P-dFdC. Es probable que los dos productos entren en las células interactuando con las integrinas, tales como la integrina αβ6, a través del motivo RGD. La línea celular de cáncer de páncreas BxPC-3 expresa unos elevados niveles de αβ6, mientras que las células MIA PaCa-2 no expresan la αβ6 (Hausner et al, 2009). El ensayo del WST-1 demostró que en las células BxPC-3 la CI50 para el P-dFdC era de 0,17 µM y para el P-FpFpF era de 0,05 µM. Por su parte, con las células MIA PaCa-2, la inhibición por parte del P-FpFpF era menor que por parte del P-dFdC: la CI50 para el P-dFdC era de 0,078 µM y para el P-FpFpF era de 0,105 µM. Los datos muestran que la conjugación del FpFpF con un péptido de unión a la αβ6 mejora sus propiedades inhibitorias del crecimiento celular en células de cáncer de páncreas que expresan la integrina αβ6.

Ejemplo 8: actividad citotóxica del trinucleótido FpFpF acoplado a un lípido

Objetivo: mejorar la permeabilidad celular y la actividad del FpFpF en las células tumorales

60 Métodos: el trinucleótido FpFpF se acopló a un lípido según se ha descrito en el Ejemplo 3 para el palmitoil-trinucleótido (5'-FpFpF-3'-Pal). Se colocaron en placas células Panc-1 un día antes del tratamiento a una densidad de 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de medio RPMI/Glutamax™/piruvato de sodio 1 mM/PS/FBS al 10 % y se cultivaron a 37 °C/5 % de CO₂. Los tratamientos (6 pocillos por condición) con dFdC, con FpFpF y con FpFpF-Pal se llevaron a cabo a las concentraciones indicadas.

Resultados: el derivado FpFpF-Pal mostró el mayor poder inhibidor, con una DI50 de 0,28 μM en comparación con 12,17 y con 5,52 μM para la dFdC y el FpFpF, respectivamente.

Ejemplo 9: encapsulación del trinucleótido FpFpF en liposomas

Objetivo: mejorar la administración del trinucleótido FpFpF a través de una encapsulación en liposomas.

Métodos. Los liposomas desnudos o dirigidos a anticuerpos (LP) portadores de compuestos antineoplásicos pueden aumentar la eficacia terapéutica de estos agentes. Los lípidos se hidrataron en solución salina durante dos horas a la temperatura ambiente (LP). Después, los LP reconstituidos se diluyeron con 1 ml de solución salina y se aplicaron a filtros de centrifuga Amicon Ultra-4 NMWL 00 kDa (Millipore) y se lavaron tres veces con 1 ml de solución salina. Los fosfolípidos activados con maleimida son adecuados para su reacción con los grupos sulfhidrilo de los anticuerpos. Para la conjugación de los anticuerpos anti-Muc1 con los liposomas, el anticuerpo se añadió a una concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$ (Ab-LP). La mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante dos horas. Se incubaron células MCF-7 (10^6 células/ml) en medio RPMI con 1) gemcitabina, 2) homooligómeros de dFdC o 3) 1 mg (LP)/ml de Ab-LPs. Después de 30 minutos, se centrifugaron alícuotas iguales de las células y se lavaron dos veces con medio RPMI.

Resultados: en comparación con el FpFpF no encapsulado, el trinucleótido FpFpF mostró una mayor actividad inhibidora de la proliferación de las líneas celulares Panc-1 y BxPc-3.

Ejemplo 10: actividad antiproliferativa del trinucleótido FpFpF *in vivo*

Objetivo: comparar las actividades antitumorales del trinucleótido FpFpF y de la dFdC *in vivo* en un modelo de xenoinjerto. En este ensayo se usaron células HeLa y ratones inmunodeficientes, como se describe a continuación.

Métodos. Los ratones inmunodeficientes CAnN.Cg-Foxn^m/Crl (BALB/c) (The Jackson Laboratories) son adecuados para el xenotrasplante de tumores humanos. Se mezclaron células HeLa (5×10^6) a 1:1 con matrigel en un volumen final de 0,1 ml y después se inyectaron subcutáneamente en el costado derecho de cada ratón. Los tratamientos se iniciaron en el momento en el que el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 200 mm³. Los fármacos (trinucleótido FpFpF o dFdC) se administraron intraperitonealmente a 10 mg/kg cada cuatro días durante un total de cuatro dosis. Los volúmenes de los tumores se calcularon con la fórmula del volumen elipsoidal ($L \times W \times H \times \pi/6$) (Tomayko y Reynolds, 1989). Los valores de los volúmenes de los tumores se transformaron a una escala logarítmica. Se usó un análisis de la varianza bifactorial por tiempo y por tratamiento. Los datos se expresaron finalmente como las medias y los errores estándar para cada grupo de tratamiento frente al tiempo. Se asumió una distribución de Weibull para calcular los tiempos medios y los errores estándares para cada grupo de tratamiento. El retraso en el crecimiento tumoral se definió como la diferencia en el tiempo medio entre cada grupo tratado y el grupo de control.

Resultados. Los datos de la Tabla 1 muestran los efectos del trinucleótido FpFpF en comparación con la dFdC. El tratamiento con el trinucleótido FpFpF provocó un retraso estadísticamente significativo ($p < 0,01$) en el crecimiento tumoral en comparación con la dFdC.

Tabla 1. Retraso en el crecimiento tumoral con diferentes tamaños de tumor

Grupo de tratamiento	500 mm ³	700 mm ³	900 mm ³
	Media \pm EEM, (días)	Media \pm EEM, (días)	Media \pm EEM, (días)
Suero salino	0,0 \pm 0,8	0,0 \pm 0,7	0,0 \pm 0,7
dFdC	2,8 \pm 0,3	4,9 \pm 0,6	7,7 \pm 0,5
Trinucleótido FpFpF	14,8 \pm 0,7	17,7 \pm 0,5	27,3 \pm 0,8

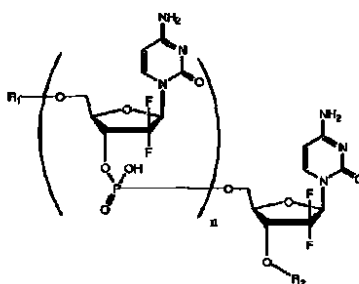
Referencias

- Abbruzzese et al 1991, J Clin Oncol 9: 491-498
 Bommann et al 2008, Cancer Chemother Pharmacol 61: 395-405
 Davidson et al 2004, Cancer Res 64: 3761-3766
 Gmeiner et al (1995) Patente de EE.UU. número 5.457.187
 Hausner et al 2009, Cancer Res 69: 5843-5850
 Uu et al 1999, Nucleosides & Nucleotides, 18 (8): 1789-1802
 Moog et al 2000, Int J Pharm 206: 43-53
 Moog et al 2002, Cancer Chemother Pharmacol 49: 356-66
 Nakahira et al 2007, Int J Cancer 120: 1355-1363
 Noble y Goa 1997. Drugs 54: 447-72
 Nothelfer et al 2009, J Nuclear Medicine 50: 426-434
 Reid et al 2004, J Clin Oncol 22: 2445-2451

Sampatii et al (2010), Solicitud de Patente de EE.UU. US 2010/0081627
Shibley et al 1992, Drug Metab Dispos 20: 849-855
Tomayko y Reynolds 1989, Cancer Chemother Pharmacol 24: 148-154

REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuesto formado por 2-30 unidades de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (dFdC) unidas con enlaces de fosfato 5'-3' para su uso en terapia.
2. Compuesto formado por 2-30 unidades de dFdC unidas con enlaces de fosfato 5'-3' para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa o de un cáncer.
- 10 3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o 2, que está formado por 2-10 unidades de dFdC unidas con enlaces de fosfato 5'-3'.
4. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es FpFpF (trinucleótido de dFdC) unidas con enlaces de fosfato 5'-3'.
- 15 5. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 con una molécula unida covalentemente de cualquiera de los grupos que consisten en un lípido, un aminoácido, un péptido, un anticuerpo o un aptámero en el terminal 5' o en el terminal 3', o en ambos terminales.
- 20 6. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que está encapsulado en un liposoma.
7. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho compuesto está modificado para aumentar su estabilidad en el suero y la permeabilidad celular, por ejemplo, mediante su conjugación con un lípido.
- 25 8. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho uso comprende una administración de dicho compuesto simultáneamente con dFdC.
9. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho uso comprende una administración de dicho compuesto y de clorhidrato de dFdC por separado, en cualquier orden, en un intervalo terapéuticamente eficaz.
- 30 10. El compuesto para el uso de la reivindicación 8 o 9, en el que dicha administración es a través de la vía parenteral.
- 35 11. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en el que dicho cáncer es cáncer de páncreas, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, precáncer cervical y lesiones cancerosas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal o linfoma, tal como linfoma no Hodgkin.
- 40 12. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho compuesto es homomérico.
13. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que tiene la Fórmula estructural (I)



- 45 o una sal, un hidrato, un N-óxido o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:
 R_1 es hidrógeno, un lípido, un aminoácido, un péptido, un anticuerpo o un aptámero
 R_2 es hidrógeno, un lípido, un aminoácido, un péptido, un anticuerpo o un aptámero
 $n = 1-30$
- 50 14. Una composición que comprende el compuesto para su uso según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 55 15. La composición de la reivindicación 14 que es una composición farmacéutica.

Figura 1

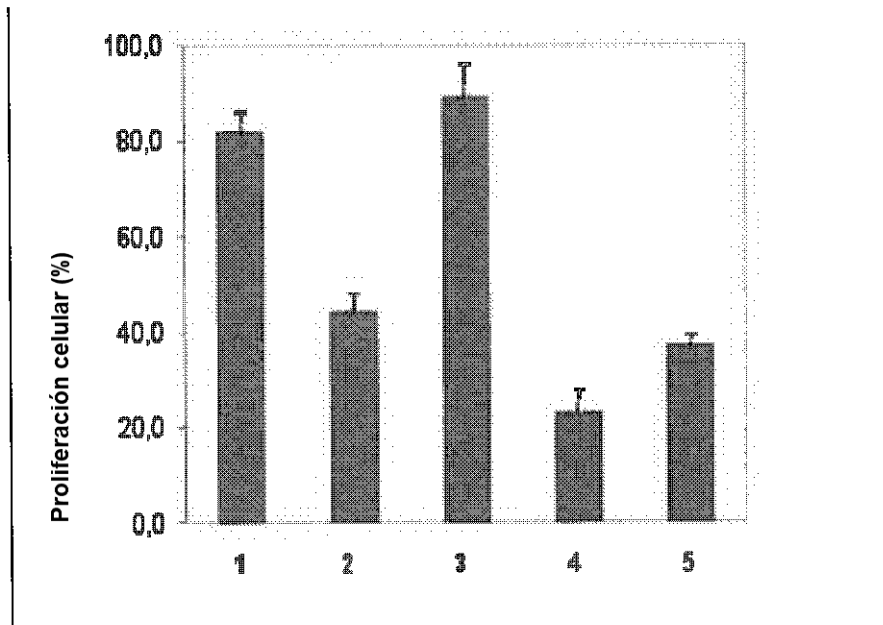


Figura 2

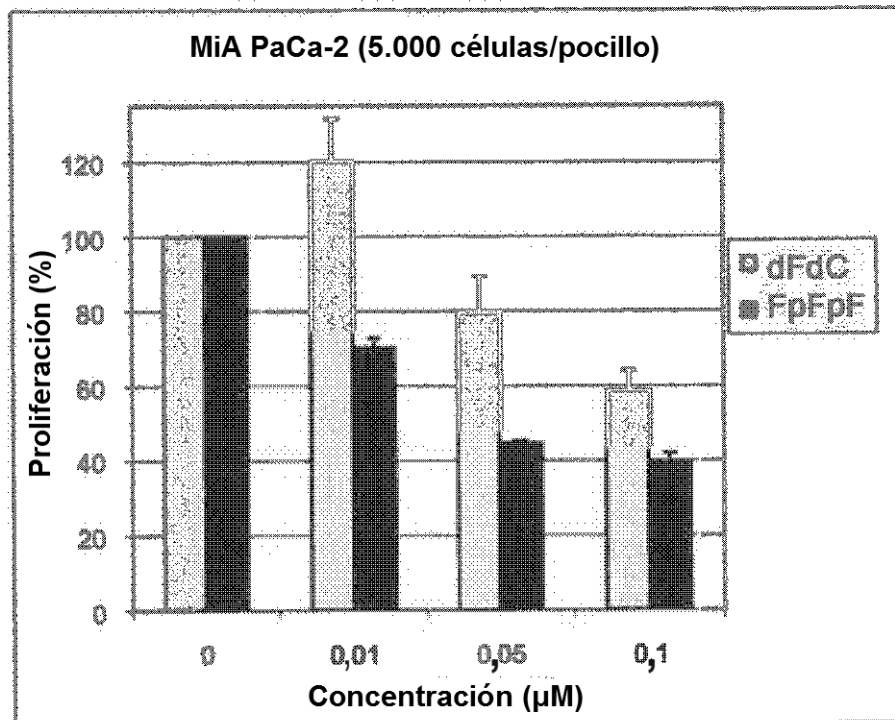


Figura 3

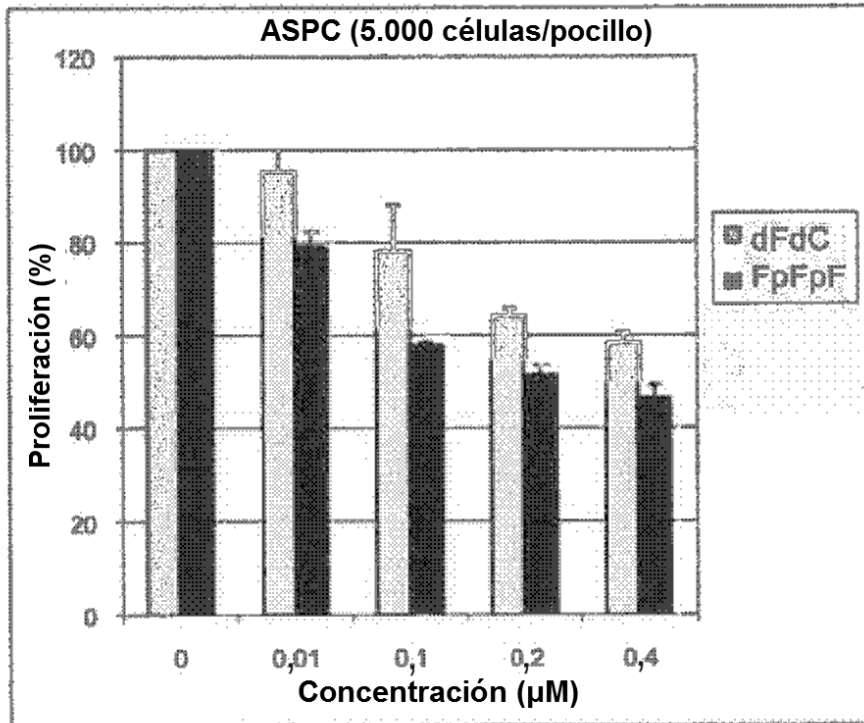


Figura 4

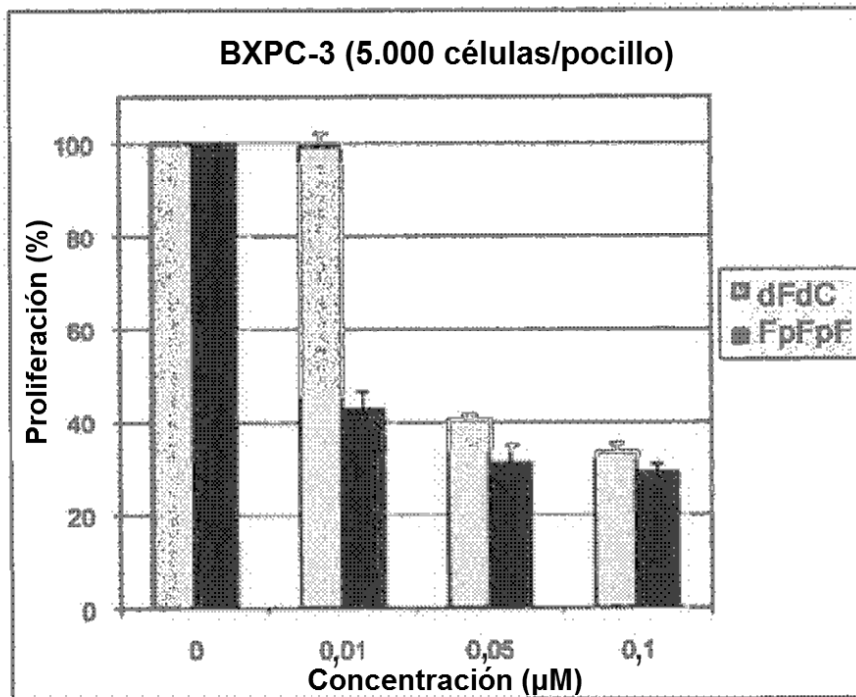


Figura 5

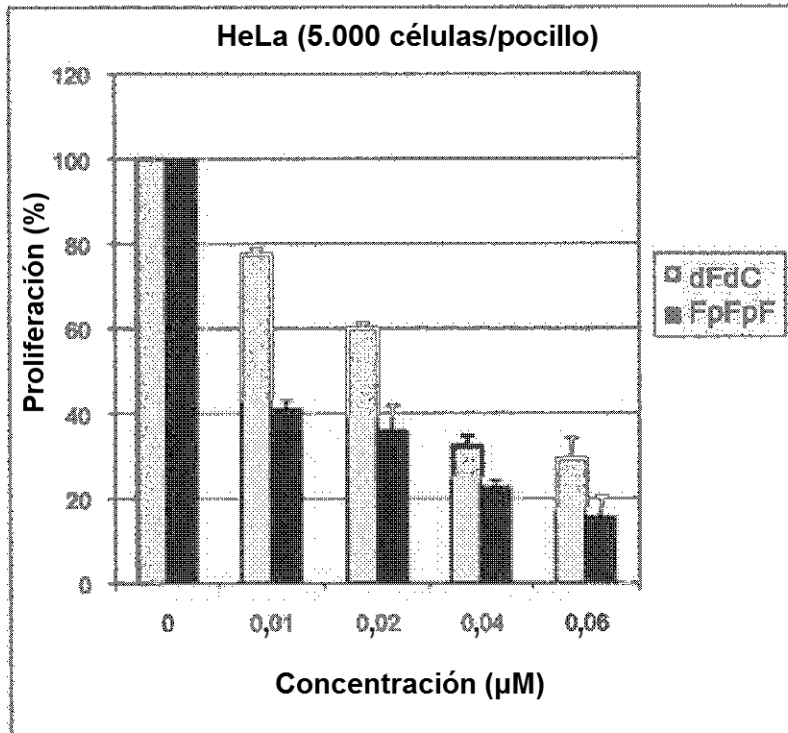


Figura 6

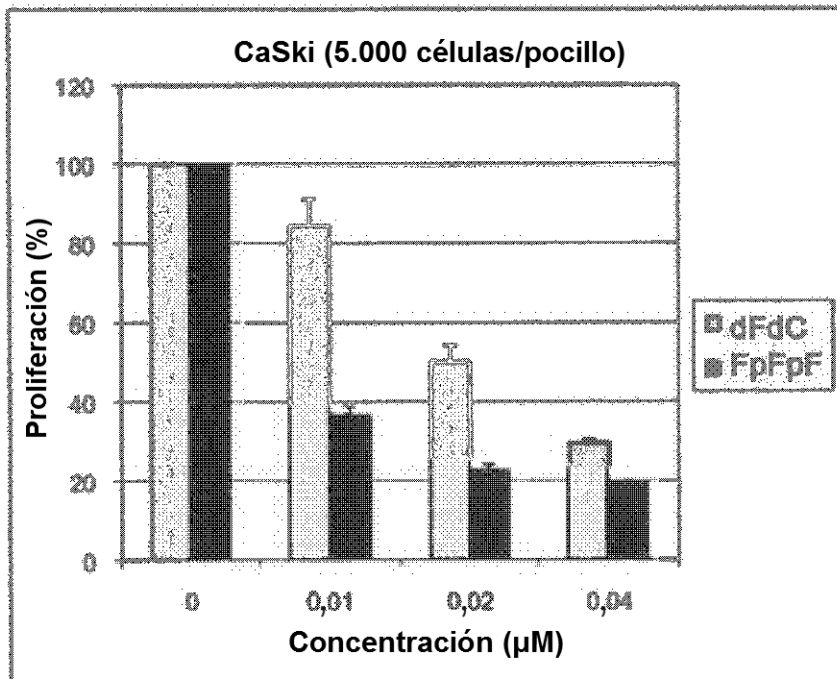


Figura 7

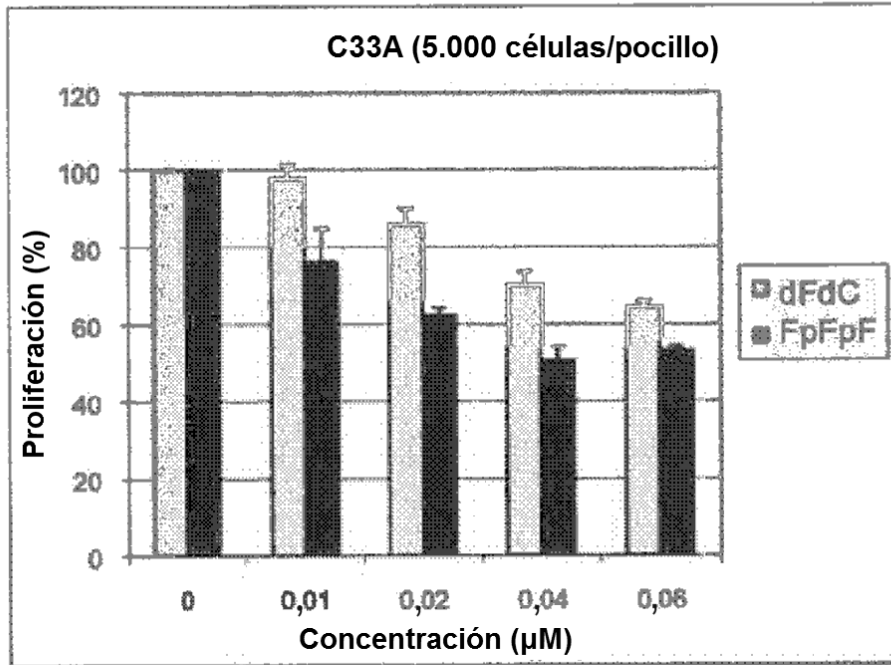


Figura 8

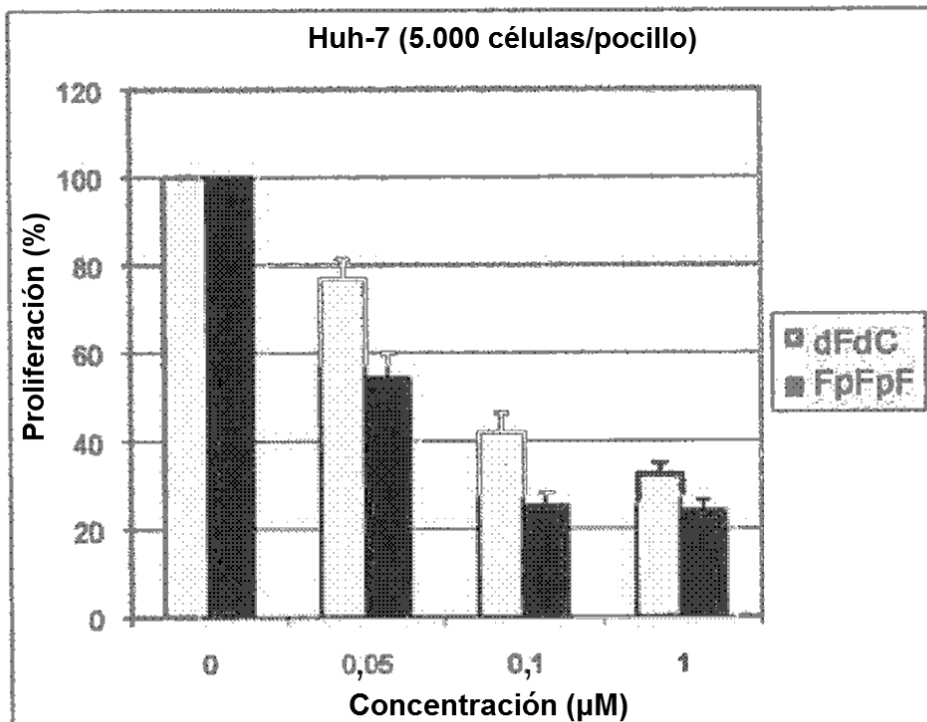


Figura 9

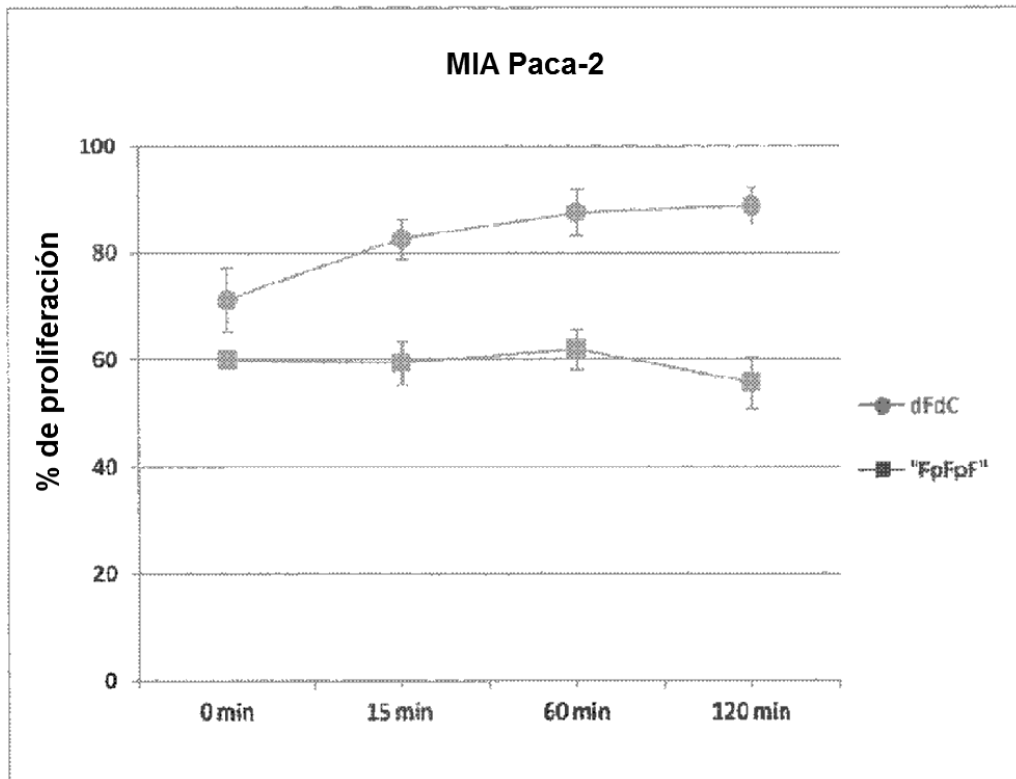


Figura 10

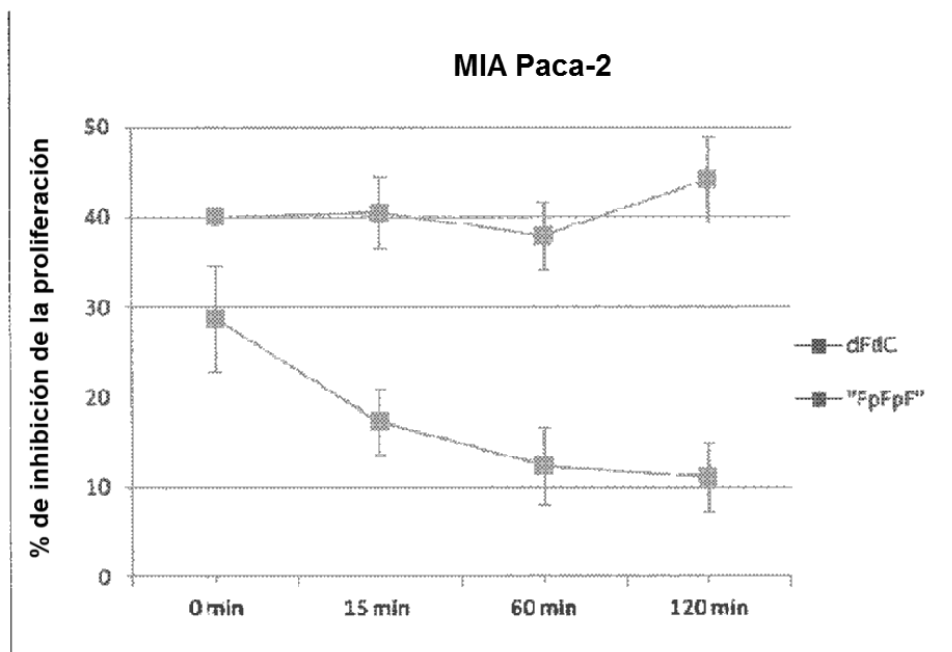


Figura 11

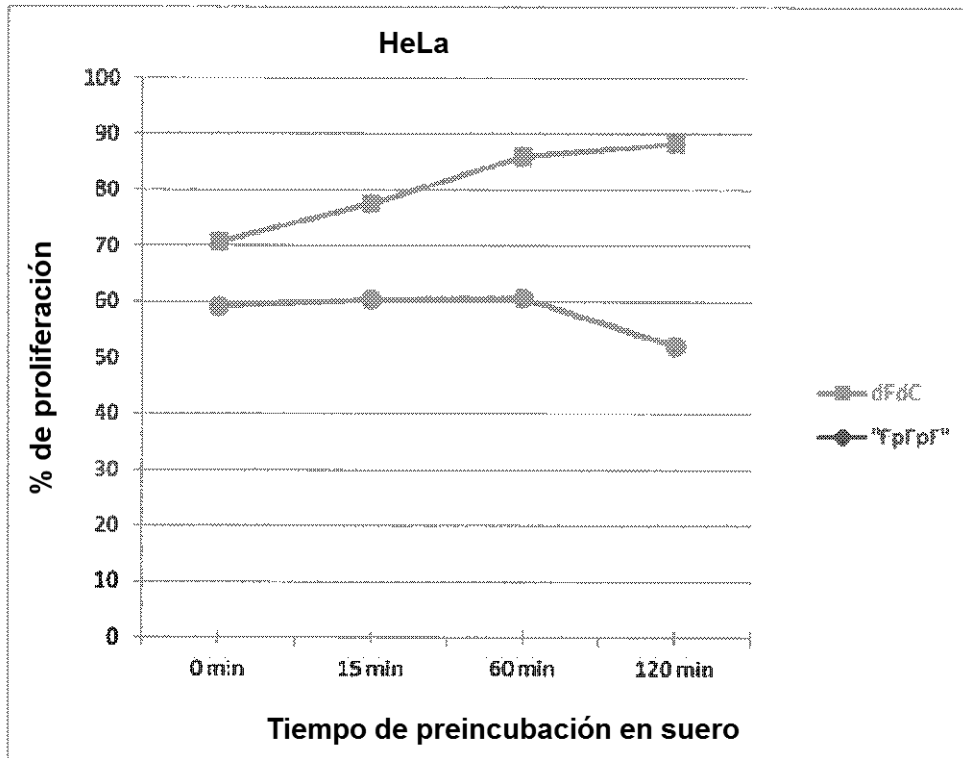


Figura 12

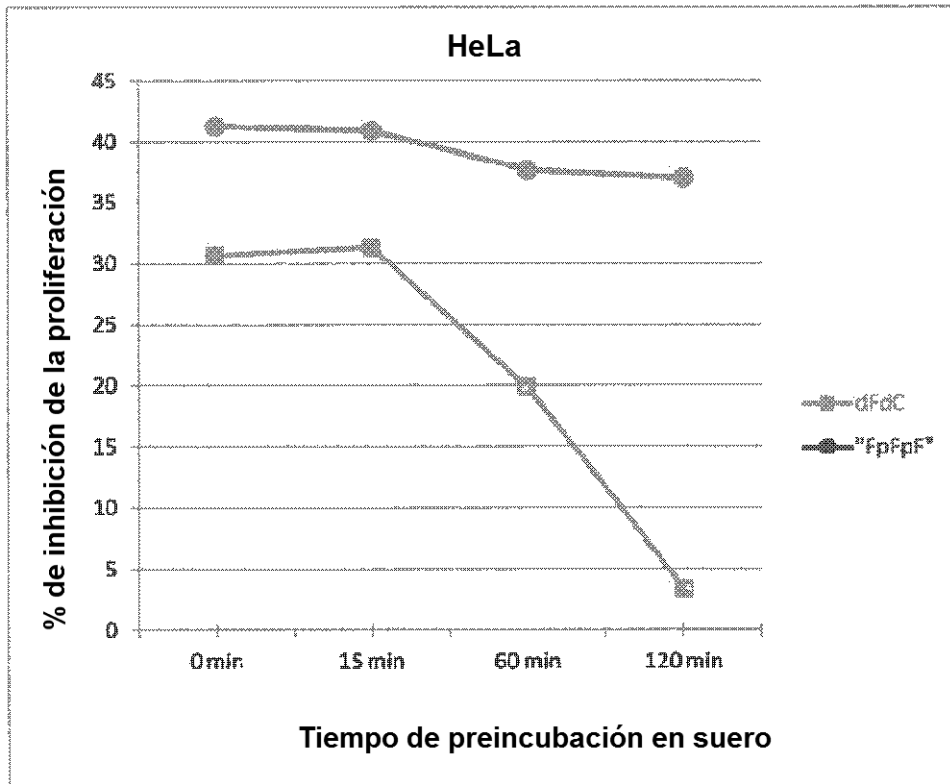


Figura 13

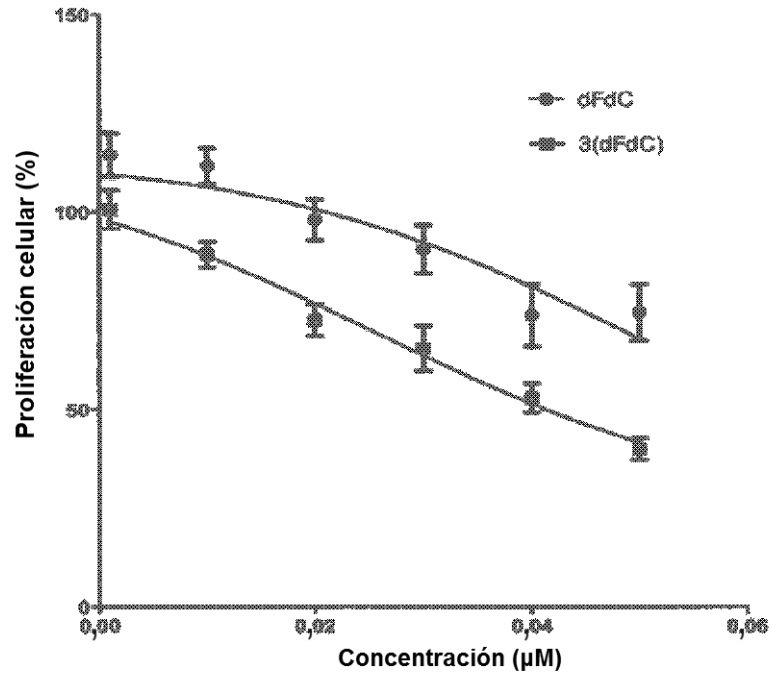


Figura 14

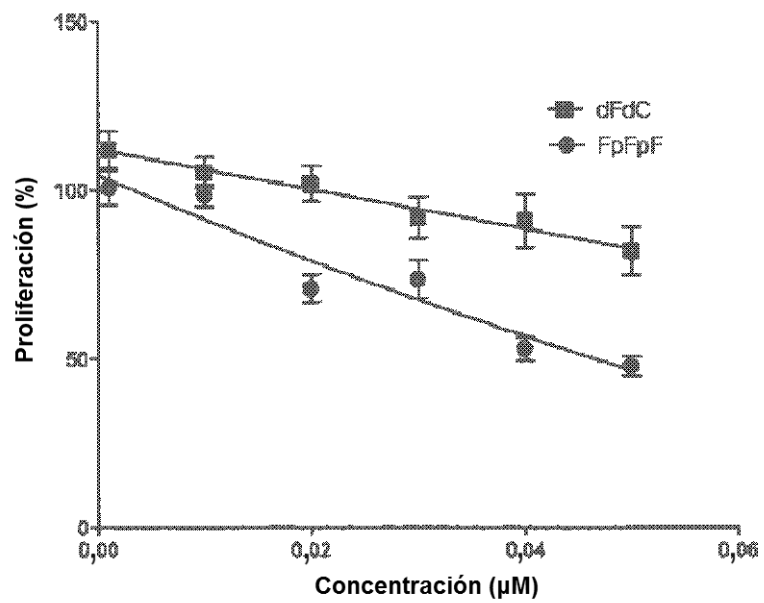
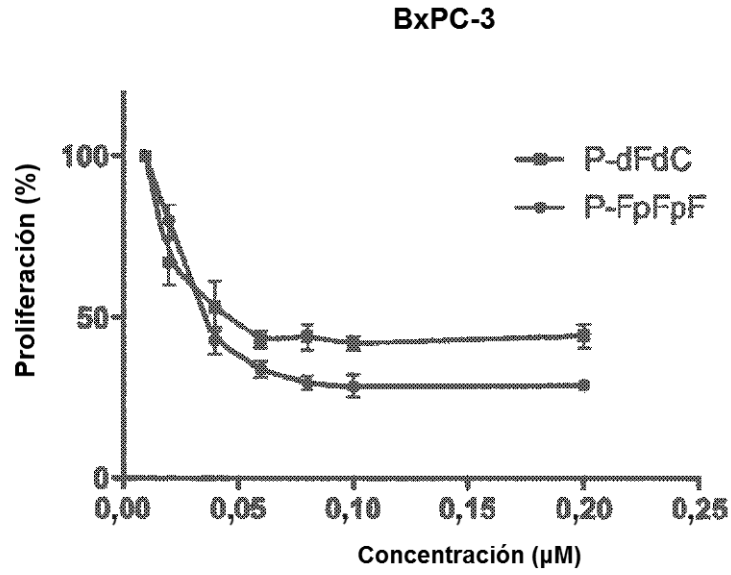


Figura 15

A)



B)

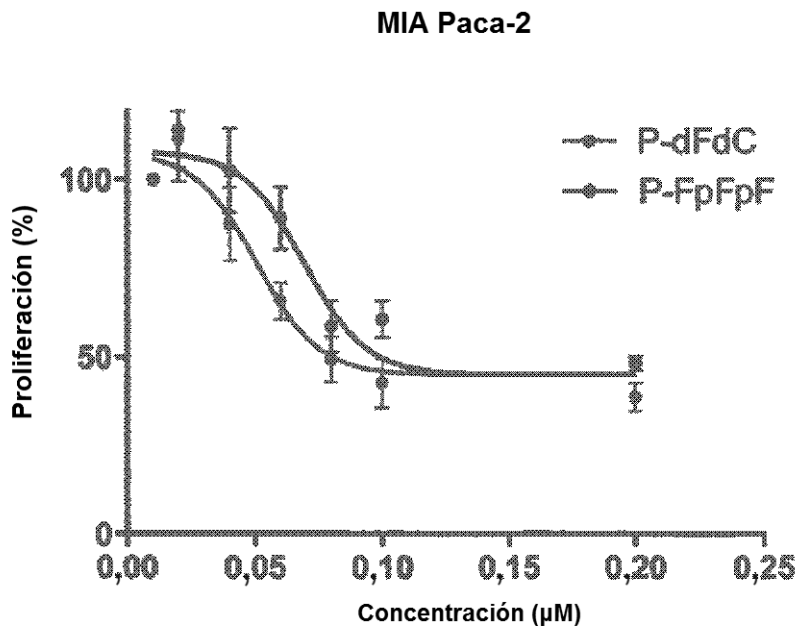


Figura 16

