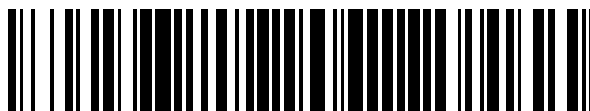


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 857**

51 Int. Cl.:

A61M 15/00 (2006.01)

A61M 11/00 (2006.01)

A61K 31/396 (2006.01)

B05B 11/00 (2006.01)

A61K 31/04 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

C07B 31/00 (2006.01)

C07D 203/14 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006** **E 10075381 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2258430**

54 Título: **5-(Aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y su uso en medicina**

30 Prioridad:

29.12.2005 GB 0526552

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2017

73 Titular/es:

MORVUS TECHNOLOGY LTD (100.0%)
Ty Myddfai Llanarthne
Carmarthen SA32 8HZ, GB

72 Inventor/es:

KNOX, RICHARD JOHN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 857 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

5-(Aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y su uso en medicina

5 La relación o discusión de un documento publicado anteriormente en esta memoria no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o que es un conocimiento general común.

10 La solicitud de patente europea n.º 0330432 se titula "Improvements relating to the control of neoplastic tissue growth" y divulga la de 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida.

15 Tretazicar (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamida es un ejemplo de un agente que se puede utilizar para combatir trastornos proliferativos. Existen muchos trastornos en los que es deseable evitar o reducir el crecimiento o la proliferación celular. Algunas de estas enfermedades, tales como el cáncer, son potencialmente fatales y otras, aunque no potencialmente fatales, son debilitantes (tales como la psoriasis) o irritantes y desagradables (tales como las verrugas). Una estrategia para combatir estas enfermedades, de forma notable el cáncer, es hacer uso de agentes químicos, es hacer uso de agentes químicos que sean capaces de efectuar la reticulación del ADN y que eviten o reduzcan el crecimiento o la proliferación celular. Tretazicar consigue esta reticulación, pero solo después que se ha reducido (en el grupo nitro) a la correspondiente hidroxilamina (que a continuación se activa adicionalmente tal como se describe a continuación).

25 Tretazicar ha sido objeto de un interés continuado durante 35 años. Fue sintetizado en primer lugar a finales de la década de los 60 del siglo XX como parte de una serie de potenciales compuestos anticancerosos que se habían estudiado desde principio de la década de los 50. Cuando se sintetizó y probó, tretazicar pareció representar la visión de la quimioterapia del cáncer – un compuesto pequeño de bajo peso molecular que podría curar tumores con mínimos efectos secundarios tóxicos. Como agente anticanceroso, representa uno de los escasos ejemplos de un compuesto que muestra una selectividad antitumoral real. Desafortunadamente para el tratamiento del cáncer humano, esta selectividad antitumoral se observó solo en algunos tumores de rata. La base de la selectividad antitumoral de tretazicar es que se trata de un profármaco que se activa enzimáticamente para generar un agente difuncional, que puede formar reticulaciones intercatenarias ADN-ADN. La bioactivación de tretazicar en células de rata implica la reducción aerobia de su grupo 4-nitro a una 4-hidroxilamina mediante la enzima NQO1 (DT-diaforasa) (Figura 2). La forma humana de NQO1 metaboliza tretazicar de forma mucho menos eficaz que la NQO1 de rata. por tanto, estas células y tumores humanos son insensibles a tretazicar.

35 Existe una enzima endógena reductora de tretazicar endógena adicional en las células de tumores humanos, y su actividad es mucho mayor que la atribuible a NQO1 (Knox y col, 2000) (Wu y col, 1997). Sin embargo, esta actividad es latente y solo detectable en presencia de la dihidronicotinamida ribósido (NRH) (Knox y col, 2000) y no en presencia de cualquiera de NADH o NADPH. La enzima responsable de esta actividad es la NAD(P)H quinona oxidoreductasa 2 humana (NQO2) (Knox y col, 2000) (Wu y col, 1997). En presencia de NRH, NQO2 puede catalizar la reducción de dos electrones de las quinonas y la nitrorreducción de cuatro electrones de tretazicar (Wu y col., 1997). Se puede considerar NQO2 como una nitrorreductasa humana dependiente de NRH.

45 5-(Aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida es muy citotóxica, incluso para aquellas células resistentes a tretazicar y puede formar reticulaciones intercatenarias en su ADN. Es la formación de este compuesto la que tiene importancia para la sensibilidad de las células cuando son capaces de activar tretazicar. Independientemente de la capacidad de activar biológicamente tretazicar, todos los tipos de células parecen tener una sensibilidad comparable hacia el derivado 4-hidroxilamino reducido (Boland y col, 1991). Aunque la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida puede producir reticulaciones intercatenarias de ADN-ADN en las células, no puede formar estas lesiones en ADN inactivado genéticamente (Knox y col, 1991 a). Existe una etapa de activación adicional que convierte la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida en la especie citotóxica proximal que reticula el ADN. Se propuso una esterificación y activación enzimáticas de la hidroxilamina, análoga a la formada por el metabolismo de la 4-nitroquinolina-N-óxido y del N-acetilaminofluoreno, (Knox y col, 1991a). De hecho, se puede activar la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida de forma no enzimática, hasta una forma capaz de reaccionar con el ADN inactivado genéticamente para producir reticulaciones intercatenarias, mediante una reacción química directa con acetil-coenzima A y otros tioésteres (Knox y col, 1991a) (Figura 2). El derivado de ADN reactivo fundamental de tretazicar es probablemente la 4-(N-acetoxi)-5-(aziridin-1-il)-2-nitrobenzamida.

60 La activación biológica de tretazicar da como resultado un gran aumento en su citotoxicidad y la modificación de la dosis resultante puede ser de hasta 100.000 veces. Esto es más de lo que sería previsible incluso mediante la conversión de un agente monofuncional a un agente difuncional. Cuando están disponibles congéneres monofuncionales de agentes difuncionales, como con las semimostazas y los compuestos de platino monofuncionales, la modificación de la dosis por equitoxicidad se ve que es solo de alrededor de 50-200 veces (Knox y col, 1991b; Knox y col, 1987). Sin embargo, observaciones con respecto a la formación de reticulaciones intercatenarias de ADN y sus propiedades explican por qué existe dicho gran aumento en la citotoxicidad de tretazicar tras su activación.

(i) El tretazicar indujo la formación de reticulación intercatenaria con una frecuencia muy elevada y puede contribuir hasta en un 70 % de las lesiones totales (Friedlos y *col*, 1992). Esta frecuencia es mucho mayor que la notificada para la mayoría de los diferentes agentes. Por ejemplo, las reticulaciones intercatenarias representan el 2 % o menos de las reacciones del ADN total de cisplatino o carboplatino (Knox y *col*, 1986). La reticulación intercatenaria es, en términos de eficacia molar, una lesión más intrínsecamente tóxica que los diaductos monocatenarios y las lesiones monofuncionales. Un agente que haya producido una proporción muy elevada de reticulaciones podría esperarse que sea más tóxico que uno que haya producido solo una frecuencia baja.

(ii) Las reticulaciones que se han reparado mal pueden provocar que sean incluso más intrínsecamente citotóxicas que las inducidas por otros agentes difuncionales (Friedlos y *col*, 1992).

(iii) Como consecuencia de la activación biológica del tretazicar, existe un aumento de 10 veces en la cantidad de fármaco unido a ADN en las células de Walker, en comparación con las células que no pueden reducir el tretazicar (Friedlos y *col*, 1992).

Estas propiedades poco usuales de la reticulación inducida por tretazicar sugieren que no son iguales a las formadas por otros agentes. La(s) lesión(es) de reticulaciones intercatenarias inducidas por tretazicar no se han identificado aun completamente. Sin embargo, la 4-hidroxilamina, (tras activación como se ha detallado anteriormente) reacciona de forma predominante con la posición C8 de la desoxiguanosina. En el ADN, esto podría conducir a que la función aziridina esté lista para reaccionar con la hebra opuesta y formar las reticulaciones observadas. Los estudios de modelización molecular indican que esta segunda reacción en grupo será preferentemente en la posición O6 de la desoxiguanosina situada en la hebra opuesta del ADN (Knox y *col*, 2003; Knox y *col*, 1991a). Dicha reticulación intercatenaria de ADN C8-O6 sería única ya que no se ha producido por otros tipos de agentes de alquilación o platinación, y puede ser importante debido a las propiedades únicas de tretazicar.

Estas propiedades, vinculadas a la selectividad de la etapa de activación biológica, explican por qué tretazicar ha sido tan excepcionalmente eficaz como agente antitumoral en la rata y facilita los fundamentos para su uso en G(V)DEPT y la activación por NQO2 en seres humanos (Knox y *col*, 2003) (Burke y Knox, 1998).

Tretazicar se puede usar también para extirpación celular selectiva en animales transgénicos. La extirpación dirigida condicional de poblaciones celulares específicas en animales transgénicos vivos es una estrategia muy poderosa para determinar las funciones celulares *in vivo*. La extirpación dirigida se consigue construyendo un transgén que incorpora una nitrorreductasa bacteriana que puede activar tretazicar aeróbicamente (NTR) (Anlezark y *col*, 1992; Knox y *col*, 1992) y promotores adecuados específicos de tejido e inyectando este en los huevos fertilizados de los animales bajo estudio – normalmente ratones. Tras el nacimiento, se confirmó la integración genómica del transgén y los ratones antecesores para establecer las líneas transgénicas. Los animales se trataron con tretazicar en diversas etapas de su desarrollo para acceder a la afectación de la extirpación específica de la población celular que se estaba estudiando. La extirpación celular se produce muy rápidamente, comenzando desde tan pronto como 7 h después de la administración del profármaco y parece ser independiente de un p53 funcional (Cui y *col*, 1999). Los ejemplos del uso de este sistema incluyen las células de la luz de las glándulas mamarias de ratones transgénicos. El tratamiento de los animales que expresaban NTR dio como resultado una rápida y selectiva muerte de esta población de células mientras que las células mioepiteliales estrechamente asociadas no se vieron afectadas. Se han observado otros ejemplos de extirpación selectiva que utiliza este sistema en adipocitos (Felmer y *col*, 2002), astrocitos (Cui y *col*, 2001) y neuronas (Isles y *col*, 2001; Ma y *col*, 2002).

La ausencia de efectos en las poblaciones de células adyacentes es significativa. Se sabe que la hidroxilamina es capaz de migrar distancias cortas y se podría esperar de esta manera que tenga un efecto sobre las células adyacentes (Bridgewater y *col*, 1997; Friedlos y *col*, 1998). En los anteriores experimentos, la diferencia fundamental es que la población de células diana está en división mientras que el tejido adyacente probablemente no. Se sabe que la activación de tretazicar es eficaz contra células que no están en división (sin ciclación) (Bridgewater y *col*, 1995). Sin embargo, este efecto puede solo medirse permitiendo que estas células entren en división. De esta manera, lo que parece suceder es que el tretazicar que indujo el daño del ADN (es decir, las reticulaciones intercatenarias de ADN) está induciéndose en poblaciones de células en división y que no están en división, pero esto solo da como resultado citotoxicidad celular cuando una célula intenta experimentar la división mientras que su ADN sigue estando dañado. En contraste, los agentes específicos de la fase S, tales como antifolatos, afectan solo a las células que están experimentando la división mientras que el agente está presente.

En los experimentos de extirpación, el tejido que se va a extirpar se divide, pero los tejidos adyacentes probablemente no tendrán un resultado muy limpio. El daño del ADN no es permanente y se repara lentamente (Friedlos y *col*, 1992). El resultado es una ventana en la que los tejidos que no están en división pueden reparar el daño, pero cualquier célula que entre en división morirá. La longitud de esta ventana dependerá de la cantidad de daño inicial del ADN inducido. En las líneas celulares, la reticulación inducida por tretazicar se reparó con una semivida de aproximadamente 55 horas (Friedlos y *col*, 1992). Esto es muy largo a diferencia otros agentes de reticulación del ADN (Friedlos y *col*, 1992) y, extrapolando esto a la situación *in vivo*, proporciona una ventana (10x semividas) de aproximadamente 3 semanas.

En el tratamiento del cáncer, existirá una situación similar y un tejido sin proliferación deberá ser resistente a los efectos de tretazicar activado a no ser que entre en división celular en el intervalo de tiempo comprendido dentro de la ventana.

5 Se pueden hacer similares argumentos de otros agentes alquilantes difuncionales y agentes de platinación. Sin embargo, se administran sistémicamente y tienen como resultado un efecto tóxico sobre los tejidos hospedadores normales que se dividen más rápidamente tales como la médula ósea, la mucosa del intestino y el sistema linfático. Puesto que tretazicar es un profármaco, esto se evita por la favorable distribución de la enzima de activación (NQO2) o la ruta de administración del virus (G(V)DEPT). El derivado de 4-hidroxilamina activo tiene una semivida
10 muy corta y no puede migrar muy lejos desde el sitio de activación, de tal manera que no existe efecto depósito. Además, la mayoría de cánceres sólidos no humanos no tienen una elevada proporción de células que son proliferantes en cualquier momento y la más amplia ventana de muerte, resultante de la reparación relativamente mala de la reticulación inducida por tretazicar, puede ser una ventaja.

15 Se han completado anteriormente un estudio en fase I y un estudio de farmacocinética (Chung-Faye y col, 2001) a partir de los cuales se puede concluir que tretazicar se puede administrar con seguridad en seres humanos hasta 24 mg/m² sin ninguna toxicidad significativa (se encontró que la MTD era de 37,5 mg/m²).

20 El uso de tretazicar en seres humanos está limitado tanto por la tecnología de practicabilidad de G(V)DEPT como por la distribución de NQO2. Sin embargo, tretazicar podría ser terapéuticamente beneficioso para tratar otros cánceres (u otras enfermedades de crecimiento o proliferación celular indeseable), si pudiera activarse en su proximidad. De esta manera, un sistema para activar tretazicar en, por ejemplo, el cuello del útero, vejiga, cerebro, tórax o por vía tópica podría aislar el sistema de activación de la circulación sistémica y permitiría que esto ocurriera. En teoría, esto se podría llevar a cabo utilizando una enzima y un cosustrato, aunque con dificultades prácticas. Sin
25 embargo, existen procedimientos alternativos para reducir los grupos nitro. La reducción electrolítica no es realista *in vivo*, pero los grupos nitro se pueden reducir químicamente.

30 Se ha notificado que la reducción química de tretazicar a 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida utiliza tanto polvo de cinc como citrato de amonio en acetona con un rendimiento del 13 % (Knox y col, 1988) o bien que utiliza hidrato de hidrazina/Pd-C en tetrahidrofurano con un rendimiento del 28 % (Knox y col, 1993). Ninguna de estas rutas sintéticas podría considerarse para el uso *in vivo*.

La invención incluye una composición como se define en la Reivindicación 1 adjunta.

35 La naturaleza de las composiciones farmacéuticas dependerá de la manera en la que se usan en el tratamiento de un paciente y, en particular, dependerá de la ruta de administración al paciente.

40 Para el tratamiento de los trastornos de la piel o de las membranas accesibles mediante digitación (tales como las membranas de la boca, vagina, cuello del útero, ano y recto), la composición, o la composición farmacéutica de la invención, es una que es adecuada para la administración tópica. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones y geles.

45 Normalmente, para el tratamiento de los trastornos en el interior del cuerpo (y, en particular en el interior de las cavidades del cuerpo), la composición farmacéutica está en la forma de una solución o una suspensión acuosa exentas de pirógenos. Normalmente, el compuesto de fórmula I puede estar en solución.

50 Los procedimientos para producir composiciones farmacéuticas tales como cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones y soluciones o suspensiones acuosas estériles exentas de pirógenos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden formular pomadas suspendiendo o disolviendo los componentes de la composición, o el sistema terapéutico en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes. Aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol. Compuesto de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. También, para las lociones o cremas, los componentes de la composición, el kit de partes o el sistema terapéutico se pueden suspender o disolver en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, lanolina, parafina líquida, parafina blanda blanca, polisorbato 60,
55 ceras de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

60 Aunque se sabe que 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida es el producto de la nitrorreducción de tretazicar, hasta donde el inventor es consciente, nadie ha propuesto que una composición, tal como una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente, que lo contiene, podría usarse en medicina. De esta manera, se divulga también 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida para su uso en medicina.

65 La composición que contiene 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida para su uso en un procedimiento para combatir el crecimiento o la proliferación indeseables de células en un sitio en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar o proporcionar una composición que contenga 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida en el mencionado sitio del individuo.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida en la fabricación de un medicamento para combatir el crecimiento o la proliferación indeseables de células en un individuo.

5 Los aspectos correspondientes de la invención se refieren a 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida para usar en un procedimiento de tratamiento del crecimiento o la proliferación de células indeseables, dicho procedimiento comprende administrar a un paciente que necesita de dicho tratamiento, una cantidad eficaz de 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida.

10 En el tratamiento del crecimiento o la proliferación de células indeseables, el producto de combinación (composición combinada o kit de partes) o la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida se puede administrar como un único sistema o agente terapéutico o, de forma alternativa, se puede administrar junto con (es decir, tanto simultánea como secuencialmente) uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, agentes activos conocidos para tratar el trastorno particular en cuestión).

15 El crecimiento o la proliferación de células indeseables que se van a combatir puede ser cualquiera de dicho crecimiento o proliferación indeseables, particularmente aquellos que son susceptibles de reticulación de su ADN.

20 El crecimiento o la proliferación de células indeseables puede ser benigno tal como es el caso con verrugas o psoriasis comunes u otras dolencias de la piel que implican el crecimiento o la proliferación de células indeseables, o puede ser neoplásico, tal como en un tumor o su metástasis.

25 De esta manera, los procedimientos y medicamentos de la invención (es decir, los que incluyen una 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida, o su uso), se pueden usar en el tratamiento de verrugas y otras enfermedades de la piel tales como psoriasis. Otros crecimientos benignos, dolencias precancerosas y cáncer, incluyendo cáncer del cuello del útero, vejiga, cerebro, tórax y útero.

Se prefiere particularmente si los procedimientos y medicamentos se utilizan tópicamente para combatir la enfermedad.

30 Se prefiere también particularmente que los procedimientos y medicamentos se utilicen para combatir la enfermedad mediante la administración en las cavidades corporales tales como la vejiga o el peritoneo o el tórax. Con respecto a tretazicar, su derivado de 4-hidroxilamina activo tiene una semivida muy corta tras la aplicación o la administración y no puede migrar muy lejos desde el sitio de activación, de tal manera que no existe efecto depósito y el fármaco activo no penetra en la circulación y produce efectos sistémicos.

35 La composición anteriormente descrita que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida también puede tomar forma farmacéuticas especiales, tales como:

40 (i) una composición tópica (por ejemplo, crema, loción o pomada) que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo tópicamente aceptable (por ejemplo, una loción, crema o base de pomada); y

45 (ii) una solución o una suspensión que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un sistema solvente estéril, tal como un sistema solvente acuoso estéril).

50 La composición tópica (o la crema, loción o pomada) de (a) anterior se puede emplear, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de piel, sin melanomas en la piel, cáncer de próstata, dolencias precancerosas (por ejemplo, lentigo maligno o, particularmente, queratosis actínica), verrugas o psoriasis. Dicha composición puede emplearse también como crema rectal en el tratamiento de dolencias tales como el cáncer de intestino.

55 La solución o la suspensión de (ii) anterior, se puede aplicar mediante inyección, transcateterización u otro procedimiento de infusión en el interior de una cavidad o espacio corporal en la que existe un crecimiento o proliferación de células indeseables. Por ejemplo, la solución se puede introducir en la vejiga para tratar dolencias tales como cáncer de vejiga, poniéndose en contacto con el cuello del útero para tratar el cáncer cervical, inyectarse en el peritoneo para tratar, por ejemplo, el cáncer de ovario, o se puede inyectar en el cerebro para tratar el cáncer de cerebro.

60 Una solución o suspensión que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida se puede administrar mediante infusión intravesical a través de catéter urinario con el fin de tratar el cáncer de vejiga.

65 De esta manera, los inventores también divulgan una solución o una suspensión que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida para uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de vejiga, comprendiendo dicho procedimiento administrar, mediante infusión intravesical a través de catéter urinario, una cantidad eficaz de una solución o suspensión que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida.

De forma alternativa, la solución o la suspensión de (ii) anterior se pueden administrar por medio de un pulverizador a la boca, cavidad nasal, garganta, faringe, laringe, tráquea o pulmones con el fin de tratar una proliferación indeseable de células (por ejemplo, un cáncer) en una cualquiera de aquellas localizaciones. De esta manera, se describe también un aspecto de la invención relativo a una solución o suspensión pulverizable que comprende 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración, por medio de un pulverizador, de 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida (o una mezcla que proporciona este compuesto) directamente a la boca, cavidad nasal, garganta, faringe, laringe, tráquea o pulmones soslaya la desactivación de la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida por las proteínas del suero. Además, el mismo mecanismo de desactivación asegurará que la 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida no tendrá un efecto sistémico.

De esta manera, un aspecto adicional de la invención se refiere a una solución o una suspensión que comprenden 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de la boca, cavidad nasal, garganta, faringe, laringe, tráquea o pulmones, comprendiendo dicho procedimiento administrar una solución o suspensión por medio de un pulverizador, comprendiendo 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los dispositivos adecuados para administrar una solución o una suspensión en la forma de un pulverizador son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los dispositivos adecuados (que incluyen: pulverizadores mecánicos que bombean la solución o la suspensión desde un depósito, y los dispositivos en aerosol que utilizan gases propelentes comprimidos para generar una pulverización a través de una boquilla) incluyen los descritos en, por ejemplo, el documento WO 2006/005845.

De esta manera, los aspectos adicionales de la invención se refieren a:

(a) un pulverizador mecánico que tiene un depósito cargado con una solución o una suspensión que comprenden 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y

(b) un dispositivo de tipo aerosol que comprende una solución o una suspensión que comprenden uno o más gases propelentes y 5-(Aziridinil-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable

El dispositivo descrito en (b) anterior puede ser, en una realización, un dispositivo inhalador de dosis medida.

Como alternativa a un pulverizador líquido, se puede aerosolizar un polvo seco con el fin de administrar una composición farmacéutica a sitios tales como los pulmones. De esta manera, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición para aerosol de polvo seco que comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida.

Por la expresión "*composición para aerosol de polvo seco*", los inventores incluyen las referencias a las formulaciones en polvo seco que son capaces de administrarse mediante un dispositivo de inhalación a la boca, cavidad nasal, garganta, faringe, laringe, tráquea o pulmones. Como tal, el término incluye referencias a polvos secos que tienen un tamaño de partículas promedio de 100 µm (por ejemplo, 50 o 10 µm) o menos. A este respecto, se puede determinar el tamaño de partículas mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, técnicas de dispersión de luz láser, tales como las que utilizan un dispositivo de análisis del tamaño de partículas tal como Mastersizer™).

Los dispositivos para la administración de aerosoles de polvo seco (por ejemplo, inhaladores de polvo seco) son bien conocidos de los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/110536. De esta manera, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un sistema terapéutico que comprende:

(i) un dispositivo de inhalación de polvo seco, que contiene opcionalmente una fuente de gas propelente; y

(ii) una o más dosis discretas de una composición para aerosol de polvo seco que comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida.

El sistema terapéutico puede comprender el dispositivo y la(s) dosis de la composición como entidades físicamente separadas (es decir, eficazmente como un kit de partes). De forma alternativa, el dispositivo de inhalación puede estar precargado con la una o más dosis de la composición.

En el tratamiento del crecimiento o la proliferación de células indeseables, las composiciones anteriormente mencionadas (que incluyen composiciones tópicas, vehículos de administración sólida, soluciones o suspensiones, aerosoles de polvo seco, etc.) se pueden utilizar solas para el tratamiento de una dolencia concreta (un crecimiento o proliferación de células indeseables, tales como un cáncer de la vejiga, cuello del útero, peritoneo o cerebro, o un cáncer de la boca, cavidad nasal, garganta, faringe, laringe, tráquea o pulmones), es decir, administrarse como el

único sistema o agente terapéutico. De forma alternativa, sin embargo, las composiciones pueden administrarse junto con (es decir, tanto simultánea como secuencialmente) uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, agentes activos conocidos para tratar el trastorno particular en cuestión).

- 5 A este respecto, los agentes activos conocidos para uso en el tratamiento del cáncer de vejiga incluyen cisplatino, doxorubicina y mitomicina C.

Las dosis adecuadas del profármaco activado mediante reducción (por ejemplo, tretazicar) para uso humano incluyen 10 a 30 mg/m², normalmente 15 a 25 mg/m², por ejemplo 24 mg/m²

- 10 Los procedimientos y medicamentos de la presente invención se pueden usar para tratar animales (tales como mamíferos no humanos, en particular caballos, vacas, ovejas y similares, y gatos y perros) y seres humanos. Se prefiere si se utilizan para tratar seres humanos.

- 15 La presente invención se describirá ahora con más detalle por referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos en los que

La Figura 1 muestra la estructura de tretazicar (5-(aziridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida).

La Figura 2 muestra la activación biológica de tretazicar.

- 20 La Figura 3 muestra la estructura de la dihidroxiacetona (DHA; N° de CAS: 62147-49-3, Beil. 8, 266, Índice Merck 13, 3166). La forma normal es el dímero, pero este revierte rápidamente al monómero en solución.

La Figura 4 muestra la reducción de tretazicar por DHA.

La Figura 5 muestra la reducción de tretazicar por DHA en una crema basada en E45 (tal como se describe en el siguiente Ejemplo 2). En cada uno de A, B y C de la Figura 5, la parte superior de las dos trazas es la medida a 325 nm, mientras que la parte inferior es la medida a 260 nm.

- 25 La Figura 6 muestra la correspondencia espectral del pico observado con un tiempo de retención de 5,0 minutos en la Figura 5B, con la obtenida con un patrón sintético de 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida. La línea continua es el patrón y la línea punteada es la muestra. Los espectros se normalizaron para la absorbancia a 260 nm.

- 30 La Figura 7 muestra el porcentaje de supervivencia de las células V79 de hámster chino durante el curso de 2 horas a pH 7,5 y 37 °C en un tampón fosfato 10 mM que contenía NaCl 140 mM y lo siguiente:

- A: control (es decir, sustancias no adicionales);
 B: DHA 10 mM;
 C: E09 10 µM;
 35 B+C: una combinación de DHA mM y E09 10 µM;
 D: E09 100 µM; y
 B+D: una combinación de DHA 10 mM y E09 100 µM.

Se determinó la supervivencia de las células V79 utilizando el siguiente procedimiento:

- 40 Se incubaron volúmenes (1 ml, 2 x 10⁵ células/ml) de células V79 en tampón fosfato 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 140 mM a 37 °C y se añadieron a continuación los reactivos (tal como se ha indicado anteriormente, a las concentraciones estipuladas) (excepto para el experimento del control). Después de 2 horas de incubación, se cosecharon las células mediante centrifugación, se diluyeron en serie (4 x 10 veces) y las
 45 células se plaquearon en medio de crecimiento y se evaluaron para su capacidad de formar colonias tras el crecimiento durante 1 semana en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada.

Como demuestra el diagrama de la Figura 7, el efecto citotóxico de E09 está muy potenciado por la adición de DHA, que promueve la formación de la forma activa de E09.

- 50 En relación con los siguientes ejemplos, tretazicar está comercialmente disponible para fines de investigación de Morvus Technology Limited y Sigma Chemical Company.

Ejemplo de preferencia 1: Activación química de Tretazicar

- 55 Los procedimientos químicos notificados para producir el derivado de 4-hidroxilamino activo a partir de tretazicar utilizan condiciones de reducción rigurosas en solventes orgánicos con rendimientos menores del 30 % (Knox y col, 1993; Knox y col, 1988). El inventor ha descubierto que dihidroxiacetona (DHA) puede reducir tretazicar a la hidroxilamina requerida en solución acuosa en condiciones ligeramente alcalinas. A pH 9, el rendimiento es > del
 60 85 % y el único producto diferente de la reducción del tretazicar detectado es 5-(aziridin-1-il)-2-hidroxilamino-4-nitrobenzamida.

Dihidroxiacetona (DHA; 1,3-dihidroxi-2-propanona; N° de CAS: 62147-49-3, Beil. 8, 266, Índice de Merck 13, 3166; Figura 3) es el principio activo en lociones de bronceado sin sol y autobronceado y ha obtenido la homologación de la FDA. DHA es un azúcar incoloro que oscurece la piel mediante tinción. Interactúa con las células superficiales muertas que se encuentran en la epidermis produciendo un cambio de color. A medida que las células muertas de la

piel se desprenden, el color pierde gradualmente intensidad, normalmente, a los 5 a 7 días de la aplicación. Los productos de bronceado sin sol contienen concentraciones de dihidroxiacetona de hasta un 5 %. Cuanto mayor es la concentración, más oscuro será el bronceado posterior. Puesto que un agente de bronceado es estable en condiciones de pH de entre 4 y 6, demasiado álcali o demasiado ácido da como resultado la formación de compuestos marrones, reduciendo la eficacia de las soluciones como bronceador. La eritrolosa (1,3,4-trihidroxi-2-butanona) tiene una acción similar a DHA, pero no produce un bronceado tan intenso o rápido. DHA se preparó a través de la fermentación de la glicerina y es un azúcar sencillo de tres carbonos, no tóxico en la naturaleza y que se encuentra en la forma de un polvo de color blanco. La forma normal es el dímero ($C_6H_{12}O_6$) pero este revierte rápidamente al monómero en solución. La FDA ha homologado DHA solo para uso externo, y recomienda a los usuarios tomar medidas protectoras para evitar el contacto con los ojos, nariz y membranas de las mucosas.

El único efecto adverso notificado es la dermatitis alérgica de contacto. Esta se ha notificado raramente y las mayores causas de sensibilidad en las cremas de bronceado son debidas a otros ingredientes tales como conservantes en la preparación. Véase el código de Regulaciones Federales, página 376:

TÍTULO 21 - ALIMENTOS Y FÁRMACOS

CAPÍTULO I – ADMINISTRACIÓN DE ALIMENTOS Y FÁRMACOS, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

PARTE 73 – LISTADO DE ADITIVOS DE COLOR EXENTOS DE CERTIFICACIÓN – Tabla de Contenidos

Subparte C – Cosméticos

Sec. 73.2150 Dihidroxiacetona

No se ha notificado nunca DHA como agente reductor. Se conocen los azúcares reductores, pero estos son aldosas y tienen un aldehído en un extremo. El aldehído se comporta como un agente reductor en presencia de un agente oxidante suave, tal como Cu^{2+} o Fe^{3+} , existe oxidación del aldehído a un ácido carboxílico. Tal como un cetol, no es posible una reacción equivalente con DHA. Sin embargo, dihidroxiacetona ha demostrado promover la formación de radicales hidroxilo en presencia de quelatos de hierro (III) (Malisz y Hasinoff, 1995). Este tipo de reacción puede estar relacionada con su capacidad reductora y su inestabilidad al álcali que da como resultado la formación de compuestos de color marrón.

En condiciones alcalinas y utilizando un exceso de ADN existe una velocidad lineal de reducción de tretazicar relacionada con el tiempo (Figura 4).

Se inició el ensayo mediante la adición de 100 μ l de DHA 100 mm en agua a una mezcla de tretazicar (100 μ M en tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9 a pH 10, para dar un volumen final de 1 ml. La mezcla se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas (10 μ l) cada 6 min y se valoraron mediante HPLC [Partisil 10 SCX (4,2 x 150 mm) (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido) eluyendo isocráticamente con fosfato de sodio 0,13 M (pH 5) en 1,5 ml/min). Se determinó la concentración de tretazicar en cada muestra por referencia del área del pico correspondiente respecto de un patrón externo, cuantificado mediante absorbancia a 325 nm. Se calcularon las tasas iniciales ajustando la curva (FigP, Biosoft, Cambridge, Reino Unido). Se identificaron los productos de la reducción mediante el tiempo de retención con respecto a un patrón auténtico.

Solo se observaron dos productos de la reducción de tretazicar, los derivados 2-hidroxilamino y 4-hidroxilamino. La tasa de reducción de tretazicar y la proporción de los productos de hidroxilamina fueron dependientes del pH. La reducción a pH 10 (0,69 nmol/min) fue más lenta que a pH 9 (0,92 nmol/min). Después de 30 min, la relación de las 4 a las 2-hidroxilaminas fue de 2,7:1 a pH 10 y de 9,7:1 a pH 9. De esta manera, a pH 9, la reducción es más rápida y proporciona el producto de las 4-hidroxilaminas preferidas en mayor grado con un rendimiento muy elevado (Figura 4)

DHA o los productos asociados a DHA procedentes de la reacción no se detectaron con el anterior procedimiento de HPLC.

Ejemplo 2: Activación de Tretazicar en una crema formulada para la aplicación tópica

Se han preparado dos cremas designadas A y B. Para uso, estas se mezclan en cantidades iguales. La crema A consiste en una base de E45 (parafina blanda blanca BP 14,5 % p/p, parafina líquida ligera Ph Eur 12,6 % p/p, lanolina anhidra hipoalérgica (Medilan 1,0 % p/p, Crookes Healthcare Ltd, Nottingham, Reino Unido) que contiene 10 mg de tretazicar, 10 mg de $NaHCO_3$ y 90 mg de Na_2CO_3 por g. La crema B contiene E45 con 100 mg del dímero DHA por g. la mezcla de los dos componentes, A y B, produjo una crema de color amarillo pálido. Esta volvió a ser de color marrón durante unas pocas horas y continuó oscureciéndose durante aproximadamente 24 horas. La suspensión de 200 μ g de crema en 1 ml de agua con agitación vigorosa dio lugar a una solución con un pH de aproximadamente 10 tal como muestran los papeles indicadores de pH. Los experimentos preliminares con cremas

que contenían un 10 % de las cantidades anteriores de sales de tampón proporcionaron una solución con el mismo pH inicial. Sin embargo, tras cuatro horas, una solución, preparada como anteriormente, y la crema no oscureció durante demasiado tiempo. Esto podría sugerir que variando las concentraciones iniciales de tampón se pueden controlar la duración y la extensión de la reacción.

Tras mezclar, y en diversos momentos, se extrajeron 200 µg de crema en 1 ml de DMSO. A continuación, se diluyó el extracto 1/100 con tampón bicarbonato de amonio 50 mM (pH 10) y se analizó mediante HPLC en fase inversa. En el momento de inicio, el análisis del extracto a 325 nm mostró solo un único pico mayor y este correspondió a tretazicar tal como se muestra mediante el mismo tiempo de retención y la correspondencia espectral del espectro de absorbancia de UV con respecto a un patrón auténtico. Después de 4 horas, el análisis del extracto mostró muchos más picos en las trazas de los 260 nm y de los 325 nm (Figura 5).

La crema A (que consistía en una base de E45 (parafina blanda blanca BP 14,5 % p/p, parafina líquida ligera Ph Eur 12,6 % p/p, lanolina anhidra hipoalergénica (Medilan) 1,0 p/p, Crookes Healthcare Ltd, Nottingham, Reino Unido) que contenía 10 mg de tretazicar, 10 mg NaHCO₃ y 90 mg de Na₂CO₃ por g y la crema B (que contenía E45 con 100 mg del dímero DHA por g) se mezclaron en diversos momentos, se extrajeron 200 µg con 1 ml de DMSO con agitación vigorosa. El extracto se clarificó mediante centrifugación y a continuación se diluyó 1/100 con tampón bicarbonato de amonio 50 mM (pH 10) y se analizó mediante HPLC. Se inyectó una muestra (10 µl) en una columna Symmetry Shield RP18 de Waters (150 x 3,9 mm) y se eluyó con un gradiente lineal (1-40 % durante 30 minutos) de acetonitrilo en formiato de amonio 10 mM (pH 4,5). El eluato se controló de forma continua para la absorbancia UV entre 230 y 400 nm utilizando un detector de barrido UV3000 de TSP. A.) Un extracto preparado inmediatamente después de la mezcla de la crema. B.) un extracto preparado a partir de la crema 4 horas después de haberse mezclado. C.) Un patrón sintético de 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida. La línea azul (la línea inferior en cada par de trazas) es la traza obtenida a 260 nm y la línea roja (la línea superior en cada par de trazas), la traza obtenida a 325 nm. El pico a ~ 13 minutos es CB 1954 y el pico grande a 260 nm a ~ 19 minutos procede de E45. No es posible medir la eficacia del procedimiento de extracción.

Se detectó más tretazicar y se identificó un pico con un tiempo de retención de ~ 5,0 minutos como la 4-hidroxilamina de tretazicar tal como se indicó por el mismo tiempo de retención y la correspondencia espectral del espectro de absorbancia UV con respecto a un patrón auténtico (Figura 6). Los otros picos no corresponden a productos de reducción de tretazicar conocidos y pueden haber surgido de la oxidación de DHA o de la reacción de los productos de tretazicar reducidos tanto con crema como con DHA.

La forma activa de tretazicar, (5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida), se formó en la crema basada en E45.

Ejemplo 3: Aplicación tópica de una crema de Tretazicar

Se mezcló una crema formulada como anteriormente y se aplicaron aproximadamente 0,1 g a una verruga (en crecimiento, domo de 1,5 mm de altura) localizada en el dedo de un voluntario humano sano y se cubrió con una tirita. Se notificó un calor moderado inicial procedente de la crema aplicada. Después de aproximadamente 4 horas se retiró la tirita y se encontró que la verruga se había desprendido y dejado un hoyito de ~ 1 mm de profundidad. El tejido próximo circundante tenía una coloración amarilla. Esta se fue volviendo gradualmente blanca al cabo de unos pocos días y no se notificó un recrecimiento de la verruga durante 6 semanas. No hubo efectos adversos aparentes o notificados.

La crema A (que consistía en una base de E45 (parafina blanda blanca BP 14,5 % p/p, parafina líquida ligera Ph Eur 12,6 % p/p, lanolina anhidra hipoalergénica (Medilan) 1,0 p/p, Crookes Healthcare Ltd, Nottingham, Reino Unido) que contenía 10 mg de tretazicar, 10 mg NaHCO₃ y 90 mg de Na₂CO₃ por g y la crema B (que contenía E45 con 100 mg del dímero DHA por g) se mezclaron y se aplicaron aproximadamente 0,1 g a una verruga (en crecimiento, domo de 1,5 mm de altura) localizada en el dedo de un voluntario humano sano y se cubrió con una tirita. Después de aproximadamente 4 horas se retiró la tirita y se encontró que la verruga se había desprendido y dejado un hoyito de ~ 1 mm de profundidad. El tejido próximo circundante tenía una coloración amarilla. Esta se fue volviendo gradualmente blanca al cabo de unos pocos días y no se notificó un recrecimiento de la verruga durante 6 semanas. No hubo efectos adversos aparentes o notificados. La fotografía se tomó después de 1 semana.

La activación de tretazicar en una aplicación tópica tiene un marcado efecto sobre la verruga con efectos mínimos sobre el tejido normal que la rodea.

Ejemplo 4: Tratamiento del cáncer de vejiga

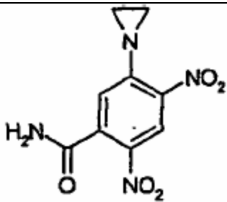
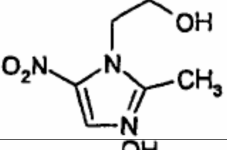
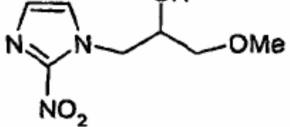
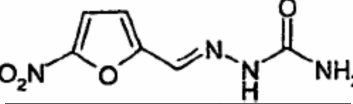
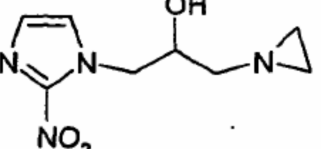
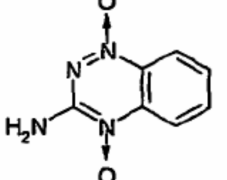
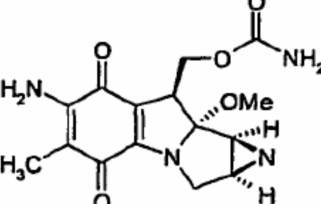
Se proporcionaron instilaciones de quimioterapia para la vejiga, o quimioterapia intravesical, a las personas que tienen cáncer superficial de vejiga rellenando la vejiga con medicación para luchar contra las células cancerosas. Aunque los cánceres superficiales de vejiga son una forma inicial de cáncer, muchos serán recurrentes tras una eliminación inicial. Sin embargo, utilizando el tratamiento que sitúa la medicación directamente en contacto con la pared de la vejiga, será posible evitar la recurrencia o alargar el tiempo hasta la recurrencia. La quimioterapia

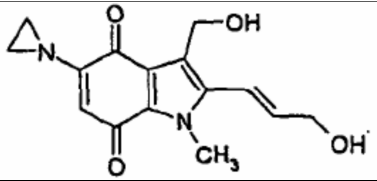
intravesical es un procedimiento breve. Se coloca un catéter en la vejiga a través de la uretra. Se instila tretazicar en tampón bicarbonato (pH 9) durante 2 a 3 minutos, seguido por una infusión de DHA en agua durante un tiempo similar. Se retiró el catéter y después de 2 horas se eliminó la medicación a través de la orina.

5 **Ejemplo de referencia 5: Reducción de DHA de profármacos a un pH próximo a neutro.**

Ensayo: HPLC

10 La mezcla de ensayo contenía el compuesto en ensayo (100 μ M) y DHA (10 mM) en un volumen final de reacción de 1 ml de tampón fosfato de sodio (del pH requerido). Se inició la reacción mediante la adición de DHA y se incubó la mezcla a 37 °C. Se tomaron alícuotas (10 μ l) cada 20 min y se evaluaron inmediatamente mediante HPLC en una columna Partisphere 5 C18 (4,2 x 150 mm) (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido), eluida con un gradiente de acetonitrilo en agua (1-95 % durante 10 minutos) a 2,0 ml por minuto. El eluato se controló continuamente para la absorbancia utilizando un detector UV-VIS de matriz de fotodiodos. Se determinó la concentración del fármaco en cada muestra por referencia del área del pico correspondiente con un patrón externo y se cuantificó mediante la absorbancia a una longitud de onda adecuada determinada a partir del barrido de PDA. Se calcularon las tasas iniciales mediante el ajuste de la curva (software FigP).

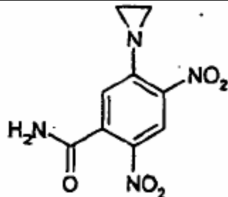
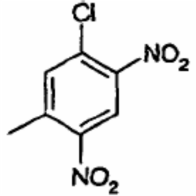
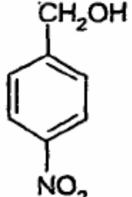
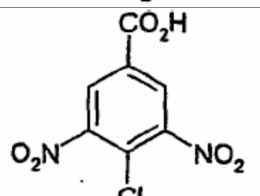
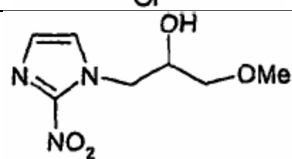
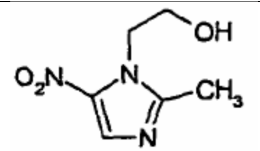
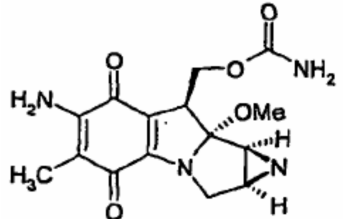
Compuesto	Estructura	TASA INICIAL (nmoles/min/ml)	
		PO ₄ 0,1 M, pH 7,5	PO ₄ 0,1 M, pH 8
Tretazicar		< 0,01	0,158
Metronidazol		0,131	0,369
Misonidazol		0,221	1,922
Nitrofurazona		0,177	0,203
RSU-1069/RB-1645		< 0,01	2,57
Tirapazamina		0,523	0,512
Mitomicina C		1,524 (PBS)	0,052 ^a

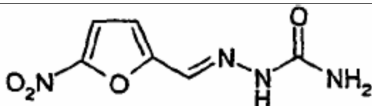
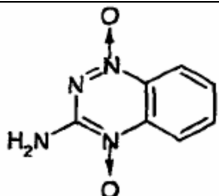
E09		0,272	0,605
Notas ^a DHA 1 mM empleado (en vez de DHA 10 mM)			

Ejemplo de referencia 6: Reducción de DHA de compuestos nitro y profármacos a diversos valores de pH

Las muestras se analizaron como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 5.

5

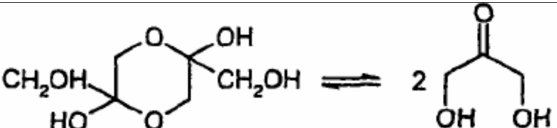
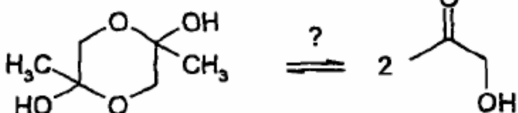
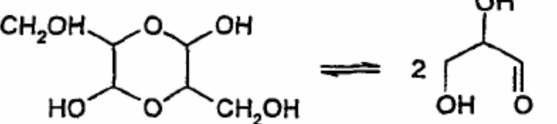
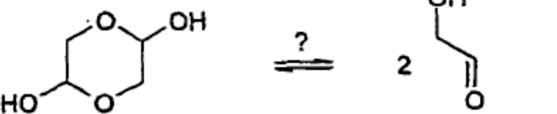
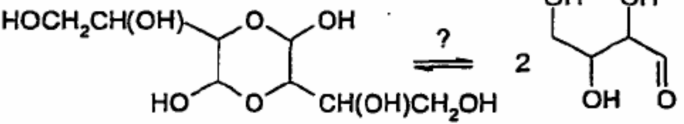
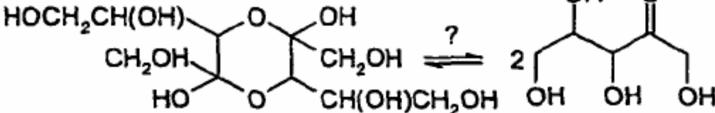
Nombre	Estructura	pH	Tasa Inicial (nmoles/min/ml)
Tretazicar		8	0,158
		9	0,933
		10	1,248
		10,6	5,801
5-cloro-2,4-dinitrotolueno		8	0,132
		9	0,499
		10	0,690
		10,6	1,703
Alcohol 4-nitrobencílico		8	< 0,01
		9	< 0,01
		10	0,105
		10,6	0,087
Ácido 4-cloro-3,5-dinitrobenzoico		8	0,195
		9	1,293
		10	1,727
		10,6	2,442
Misonidazol		8	1,922
		9	1,851
		10	3,180
		10,6	-
Metronidazol		8	0,369
		9	0,890
		10	1,239
		10,6	0,807
Mitomicina C		7	1,019
		8	0,052 ^a
		8,5	0,103 ^a
		9	Demasiado rápido para medir

Nitrofurazona		7,5	0,177
		8	0,203
		8,5	0,260
		9	2,390
		10	3,789
Tirapazamina		7,5	0,523
		8	0,512
		8,5	0,639
		9	3,503
		10	4,209
Notas ^a DHA 1 mM empleado (en vez de DHA 10 mM)			

Ejemplo de preferencia 7: Reducción de NADP^+ por compuestos de α -hidroxicarbonilo

- 5 Se añadió una alícuota de 10 μl del compuesto de ensayo (a una concentración de 100 mM en agua) a una solución acuosa de NADP^+ 200 μM (aproximadamente 990 μl), tamponada a pH 10 (tampón de NaHCO_3 1 mM). La concentración final del compuesto de ensayo en la solución de ensayo fue de 1 mM. A continuación se controló la reducción del NADP^+ midiendo el aumento, durante el curso de 2 minutos, de absorción a 350 nm en un espectrofotómetro. Se registraron las tasas iniciales como el cambio en A350 por minuto.

10

Compuesto	Estructura	Tasa
Dihidroxiacetona (dímero) ¹		0,063
Hidroxiacetona (acetol) ¹		0,003
D,L-Gliceraldehído ³		0,015
Glicolaldehído dímero ⁴		0,029
D(-)-Eritrosa ⁵		0,004
L-Xilulosa		0,003

Notas 1. Se supone que forma monómero en solución.

2. Calidad técnica (> 90 %) utilizada. Demora de aproximadamente 60 s antes de cualquier aumento observado en la absorción a 350 nm.

3. Concentración calculada para el monómero.

4. Mezcla de estereoisómeros. No hay efecto sobre la tasa observada tras la adición de EDTA 1 mM a la mezcla de reacción

5. Solo ~ un 50 % puro. Demora de aproximadamente 90 s antes de cualquier aumento observado en la absorción a 350 nm.

Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, se cree que los compuestos que muestran actividad reductora en el

anterior ensayo son compuestos de α -hidroxicarbonilo que son capaces de formar dímeros cíclicos del tipo representado gráficamente en la Fórmula Ia.

En contraste, los compuestos para los cuales se determinó que la tasa en el anterior ensayo estaba por debajo de 0,001 (es decir, para los cuales no se detectó actividad reductora) incluyen los siguientes:

glicerol;
glioxal;
D-glucosa;
anhídrido diglicólico ;
alcohol ($\pm$)-tetrahidrofurfurílico;
1,4-dioxano-2,3-diol; y
2-(hidroximetil)tetrahidropirano.

Ejemplo de referencia 8: Reducción de Tretazicar por los compuestos de α -hidroxicarbonilo

Se inició el ensayo mediante la adición de 100 μ l del compuesto de ensayo 100 mM (compuesto de fórmula I) en agua a una mezcla de tretazicar (100 μ M) en tampón bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9 o pH 10, para dar un volumen final de 1 ml. Se incubó la mezcla a 37 °C y se tomaron alícuotas (10 μ l) cada 6 min y se evaluaron inmediatamente mediante HPLC [Partisil 10 SCX (4,2 x 150 mm) (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido) eluyendo isocráticamente con fosfato de sodio 0,13 M (pH 5) a 1,5 ml/min). Se determinó la concentración de tretazicar en cada muestra por referencia del área del pico correspondiente con un patrón externo, se cuantificó mediante la absorbancia a 325 nm. Se calcularon las tasas iniciales mediante el ajuste de la curva (FigP, Biosoft, Cambridge, Reino Unido). Se identificaron los productos de la reducción mediante el tiempo de retención con respecto a un patrón auténtico.

Compuesto	Estructura	pH	Tasa Inicial (nmoles/min/ml)
Dihidroxiacetona (utilizada en forma dimérica)		9	0,92
		10	0,69
D,L-Gliceraldehído ³		9	0,53
		10	0,62
Glicolaldehído (utilizado en forma dimérica) ⁴		9	0,18
		10	0,14
D(-)-Eritrosa ⁵		9	< 0,01
		10	0,28
L-Xilulosa		9	< 0,01
		10	0,28
3-hidroxi-2-butanona		9	0,034
		10	0,184

En contraste, los compuestos para los cuales se determinó que la tasa en el anterior ensayo estaba por debajo de 0,001 (es decir, para los cuales no se detectó actividad reductora) incluyen los siguientes:

glicerol;
glioxal;
D-glucosa;
anhídrido diglicólico;
alcohol ($\pm$)-tetrahidrofurfurílico;
2-(hidroximetil)tetrahidropirano;
4-hidroxi-2-butanona;
dicloroacetona;
1,4-dioxano-2,3-diol; y
cloruro de dicloroacetilo.

Ejemplo de referencia 9: Reducción a gran escala de Tretazicar a la correspondiente hidroxilamina

Una solución de 5-(aziridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida ("CB 1954", 1,00 g, 3,97 mmol) en metanol (calidad 'AnalaR', 40 ml) se trató con un exceso de K₂CO₃ anhidro en polvo (10,0 g, 72 mmol, aprox., 18 equiv) y la mezcla se calentó a 60 °C con agitación. La suspensión se agitó por debajo de 60 °C en atmósfera bajo una corriente circulante de N₂. Se añadió una solución de 1,3-dihidroxiacetona (1.50 g como un dímero de DHA, 8,33 mmol; 2,1 equiv mol) en metanol (calidad 'AnalaR', 40 ml), desaireada anteriormente mediante lavado con gas N₂, a continuación a la mezcla de reacción durante 15 min con agitación rápida, manteniendo a la vez la temperatura a 60 °C. Se observó una reacción rápida con un cambio de color desde amarillo pálido-naranja a marrón. La cromatografía en capa fina (TLC; Merck silica gel 60 GF254 sobre láminas de aluminio, 9:1 v/v CH₂Cl₂ : MeOH) mostró la eliminación cuantitativa del material de partida CB 1954 (R_f 0,73) y la formación de dos productos polares a R_f 0,53 y R_f 0,47. Los dos productos mostraron idéntico comportamiento en la TLC que las muestras de 5-(aziridin-1-il)-2-hidroxilamino-4-nitrobenzamida y 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida auténticas, respectivamente, preparadas mediante los procedimientos publicados [Knox, R.J., Friedlos, F., Jarman, M., Roberts, J.J. *Biochemical Pharmacology* 37, 4661-4669 (1988); Knox, R.J., Friedlos, F., Biggs, P.J., Flitter, W.D. Gaskell, M., Goddard, P., Davies, L., Jarman, M. *Biochemical Pharmacology* 46, 797-803 (1993)].

La mezcla de reacción se filtró mientras estaba caliente y el material insoluble se lavó con metanol frío (10 ml). El filtrado combinado se enfrió y se evaporó de forma rotatoria (30 °C, vacío elevado) para dar un aceite viscoso de color amarillo-marrón (1,02 g, > 100 %). El examen de la mediante TLC confirmó que estaban presentes dos productos principales. Fueron también evidentes manchas menores (< 1-2 % del total, R_f 0,62, 0,66) que correspondían a los productos de oxidación 2-nitroso y 4-nitroso resultantes de la oxidación 02 en condiciones alcalinas durante la manipulación y el funcionamiento (Nota: debe minimizarse la exposición al aire lavando todos los aparatos con gas N₂ para evitar la oxidación de las hidroxilaminas a productos nitroso y subproductos coloreados no deseados). Se consideró que los productos de reacción 2-hidroxilamina (R_f 0,53) y 4-hidroxilamina (R_f 0,47) estaban formados en una relación de ~ 40:60. La separación cromatográfica de los isómeros está impedida por sus estrechas propiedades de elución utilizando los sistemas solventes disponibles. Sin embargo, la separación mediante cromatografía instantánea de una muestra de mezcla bruta (100 mg) (gel de sílice de Merck, malla de 60-200, 9:1 v/v CH₂Cl₂-MeOH) proporcionó la S-(aziridin-1-il)-2-hidroxilamino-4-nitrobenzamida (31 mg) y 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida (49 mg) tras la eliminación del solvente de las fracciones. Ambos productos proporcionaron espectros de RMN consistentes con las propiedades notificadas para las hidroxilaminas poliméricas y el comportamiento de la TLC que fueron indistinguibles con los compuestos auténticos [Knox, R.J., Friedlos, F., Jarman, M., Roberts, J.J. *Biochemical Pharmacology* 37, 4661-4669 (1988)].

Notas:

(1) El solvente de reacción preferido es metanol. El dímero de 1,3-dihidroxiacetona (DHA) tiene una limitada solubilidad en muchos solventes comunes, incluyendo la acetona y los alcoholes superiores.

(2) la reacción es casi instantánea a 60 °C, pero es más lenta a temperaturas inferiores. El uso de sistemas de reacción con temperaturas superiores puede tener un efecto adverso sobre el rendimiento relativo del producto.

El producto de hidroxilamina muestra mayor sensibilidad a la oxidación del aire en presencia de álcali; se recomienda, por tanto, que el reactivo de K₂CO₃ se retire de la mezcla de reacción tan pronto como sea posible. La separación cromatográfica de la mezcla que contiene los productos de la 2 y la 4-hidroxilamina requiere la minimización de cualquier exposición para el material disuelto con O₂ (aire) durante la manipulación.

Referencias

Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Coles, B., Friedlos, F. y Knox, R.J. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) - I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*- a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem Pharmacol*, 44, 2289-95.

Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Wilson, W.R., Denny, W.A., Palmer, B.D., Knox, R.J., Friedlos, F. y Williams, A. (1995). Bioactivation of dinitrobenzamide mustards by an *E. coli* B nitroreductase. *Biochem Pharmacol*, 50, 609-18.

Bailey, S.M., Knox, R.J., Hobbs, S.M., Jenkins, T.C., Mauger, A.B., Melton, R.G., Burke, P.J., Connors, T.A. y Hart, I.R. (1996). Investigation of alternative prodrugs for use with *E. coli* nitroreductase in 'suicide gene' approaches to cancer therapy. *Gene Ther*, 3, 1143-50.

Boland, M.P., Knox, R.J. y Roberts, J.J. (1991). The differences in kinetics of rat and human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide). *Biochem Pharmacol*, 41, 867-75.

Bridgewater, J.A., Knox, R.J., Pitts, J.D., Collins, M.K. y Springer, C.J. (1997). The bystander effect of the nitroreductase/CB 1954 enzyme/prodrug system is due to a cell-permeable metabolite. *Hum Gene Ther*, 8, 709-17.

Bridgewater, J.A., Springer, C.J., Knox, R.J., Minton, N.P., Michael, N.P. y Collins, M.K. (1995). Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB 1954. *Eur J Cancer*, 31a, 2362-70.

Burke, P.J. & Knox, R.J. (1998). Therapeutic systems PCT/GB98/01731); WO 98/57662.

Chung-Faye, G., Palmer, D., Anderson, D., Clark, J., Downes, M., Baddeley, J., Hussain, S., Murray, Ph., Searle, P., Seymour, L., Harris, P.A., Ferry, D. y Kerr, D.J. (2001). Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: a phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954. *Clin Cancer Res*, 7, 2662-8.

Cobb, L.M. (1970). Toxicity of the selective antitumor agent 5-aziridino-2,4-dinitrobenzamide in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 17, 231-238.

Connors, T.A. y Melzack, D.H. (1971). Studies on the mechanism of action of 5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954), a selective inhibitor of the Walker tumour. *Int J Cancer*, 7, 86-92.

Cui, W., Allen, N.D., Skynner, M., Gusterson, B. y Clark, A.J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*, 34, 272-82.

Cui, W., Gusterson, B. y Clark, A.J. (1999). Nitroreductase-mediated cell ablation is very rapid and mediated by a p53-independent apoptotic pathway. *Gene Ther*, 6, 764-70.

Felmer, R., Cui, W. y Clark, A.J. (2002). Inducible ablation of adipocytes in adult transgenic mice expressing the e. Coli nitroreductase gene. *J Endocrinol*, 175, 487-98.

Friedlos, F., Court, S., Ford, M., Denny, W.A. y Springer, C. (1998). Gene-directed enzyme prodrug therapy - quantitative bystander cytotoxicity and DNA damage induced by CB 1954 in cells expressing bacterial nitroreductase. *Gene Therapy*, 5, 105-112.

Friedlos, F., Quinn, J., Knox, R.J. y Roberts, J.J. (1992). The properties of total adducts and interstrand crosslinks in the DNA of cells treated with CB 1954. Exceptional frequency and stability of the crosslink. *Biochem Pharmacol*, 43, 1249-54.

Hu, L., Yu, C., Jiang, Y., Han, J., Li, Z., Browne, P., Race, P.R., Knox, R.J., Searle, P.F. y Hyde, E.I. (2003). Nitroaryl phosphoramides as novel prodrugs for E. coli nitroreductase activation in enzyme prodrug therapy. *J Med Chem*, 46, 4818-21.

Isles, A.R., Ma, D., Milsom, C., Skynner, M.J., Cui, W., Clark, J., Keverne, E.B. y Allen, N.D. (2001). Conditional ablation of neurones in transgenic mice. *J Neurobiol*, 47, 183-93.

Knox, R.J., Burke, P.J., Chen, S. y Kerr, D.J. (2003). CB 1954: from the Walker tumor to NQO2 and VDEPT. *Curr Pharm Des*, 9, 2091-104.

Knox, R.J., Friedlos, F., Biggs, P.J., Flitter, W.D., Gaskell, M., Goddard, P., Davies, L. y Jarman, M. (1993). Identification, synthesis and properties of 5-(aziridin-1-yl)-2-nitro-4-nitrosobenzamide, a novel DNA crosslinking agent derived from CB 1954. *Biochem Pharmacol*, 46, 797-803.

Knox, R.J., Friedlos, F., Jarman, M. y Roberts, J.J. (1988). A new cytotoxic, DNA interstrand crosslinking agent, 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide, is formed from 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by a nitroreductase enzyme in Walker carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 37, 4661-9.

Knox, R.J., Friedlos, F., Lydall, D.A. y Roberts, J.J. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum (II) Differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res*, 46, 1972-9.

Knox, R.J., Friedlos, F., Marchbank, T. y Roberts, J.J. (1991 a). Bioactivation of CB 1954: reaction of the active 4-hydroxylamino derivative with thioesters to form the ultimate DNA-DNA interstrand crosslinking species. *Biochem Pharmacol*, 42, 1691-7.

Knox, R.J., Friedlos, F., Sherwood, R.F., Melton, R.G. y Anlezark, G.M. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) - II. A comparison of an Escherichia coli nitroreductase and Walker DT

diaphorase. *Biochem Pharmacol*, 44, 2297-301.

Knox, R.J., Jenkins, T.C., Hobbs, S.M., Chen, S., Melton, R.G. y Burke, P.J. (2000). Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res*, 60, 4179-86.

Knox, R.J., Lydall, D.A., Friedlos, F., Basham, C., Rawlings, C.J. y Roberts, J.J. (1991b). The Walker 256 carcinoma: a cell type inherently sensitive only to those difunctional agents that can form DNA interstrand crosslinks. *Mutat Res*, 255, 227-40.

Knox, R.J., Lydall, D.A., Friedlos, F., Basham, C. y Roberts, J.J. (1987). The effect of monofunctional or difunctional platinum adducts and of various other associated DNA damage on the expression of transfected DNA in mammalian cell lines sensitive or resistant to difunctional agents. *Biochim Biophys Acta*, 908, 214-23.

Li, Z., Han, J., Jiang, Y., Browne, P., Knox, R.J. y Hu, L. (2003). Nitrobenzocyclophosphamides as potential Prodrugs for bioreductive activation: synthesis, stability, enzymatic reduction, and antiproliferative activity in cell culture. *Bioorg Med Chem*, 11, 4171-8.

Ma, D., Allen, N.D., Van Bergen, Y.C., Jones, C.M., Baum, M.J., Keverne, E.B. y Brennan, P.A. (2002). Selective ablation of olfactory receptor neurons without functional impairment of vomeronasal receptor neurons in OMP-ntr transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 16, 2317-23.

Malisza, K.L. y Hasinoff, B.B. (1995). Doxorubicin reduces the iron (III) complexes of the hydrolysis products of the antioxidant cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) and produces hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys*, 316, 680-8.

Mauger, A.B., Burke, P.J., Somani, H.H., Friedlos, F. y Knox, R.J. (1994). Self-immolative prodrugs: candidates for antibody-directed enzyme prodrug therapy in conjunction with a nitroreductase enzyme. *J Med Chem*, 37, 3452-8.

Sheard, C.E., Double, J.A. y Berenbaum, M.C. (1971). The sensitivity to chemotherapeutic agents of a rat tumour grown in immunosuppressed mice. *Br J Cancer*, 25, 838-844.

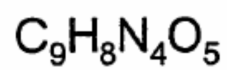
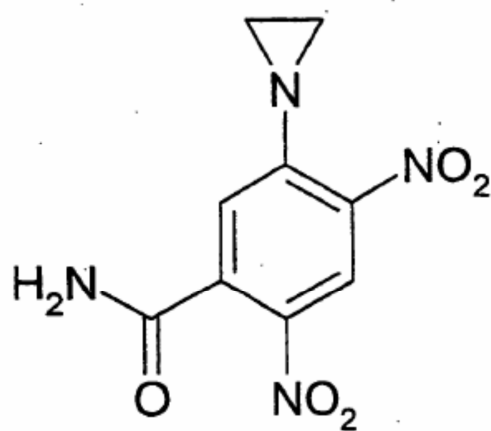
Workman, P., Morgan, J.E., Talbot, K., Wright, K.A., Donaldson, J. y Twentyman, P.R. (1986a). CB 1954 revisited. II. Toxicity and antitumour activity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 16, 9-14.

Workman, P., White, R.A. y Talbot, K. (1986b). CB 1954 revisited. I. Disposition kinetics and metabolism. *Cancer Chemother Pharmacol*, 16, 1-8.

Wu, K., Knox, R., Sun, X.Z., Joseph, P., Jaiswal, A.K., Zhang, D., Deng, P.S. y Chen, S. (1997). Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2) a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys*, 347, 221-8.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica tópica que comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y un adyuvante, un diluyente o un vehículo tópicamente aceptables.
2. La composición tópica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es una solución o una suspensión.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la solución o la suspensión se pueden pulverizar.
4. Una composición de aerosol en polvo seco que comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida.
5. Un sistema terapéutico que comprende:
 - (a) un dispositivo inhalador de polvo seco, que contiene opcionalmente una fuente de gas propulsor y
 - (b) una o más dosis discretas de una composición de aerosol en polvo seco que comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida.
6. Un dispositivo que es:
 - (a) Un pulverizador mecánico que tiene un depósito cargado con una solución o una suspensión que comprenden 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables; o
 - (b) Un dispositivo de aerosol que comprende una solución o una suspensión que comprenden uno o más gases propelentes y comprende 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.
7. La composición tópica de la reivindicación 1, para uso para combatir el crecimiento o la proliferación indeseados de células en un individuo, en donde el crecimiento o la proliferación de células en un individuo son:
 - benigna,
 - una verruga, una psoriasis o una hiperplasia precancerosa.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 para uso para combatir el crecimiento o la proliferación indeseados de células en un individuo, en donde el crecimiento o la proliferación indeseados de células son:
 - una neoplasia;
 - un tumor; o
 - cáncer de cuello de útero, vejiga, cerebro, tórax o útero.
9. 5-(Aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida para su uso en el tratamiento de un cáncer de la boca, la cavidad nasal, la garganta, la faringe, la laringe, la tráquea o los pulmones, en donde dicha 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida se proporciona como una solución o una suspensión que comprenden 5-(aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida y un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables que se administran en forma de pulverización.
10. Una composición como se define en la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un cáncer de la boca, la cavidad nasal, la garganta, la faringe, la laringe, la tráquea o los pulmones, en la que dichas solución o suspensión se administran en forma de pulverización.
11. Uso de 5-(Aziridin-1-il)-4-hidroxilamin-2-nitrobenzamida en la fabricación de una composición como se define en la reivindicación 2 para el tratamiento de un cáncer de la boca, la cavidad nasal, la garganta, la faringe, la laringe, la tráquea o los pulmones, en donde dichas solución o suspensión se administran en forma de pulverización.



252,18

C 42,9 %; H 3,2 %; N 22,2 %; O 31,7 %

Fig. 1

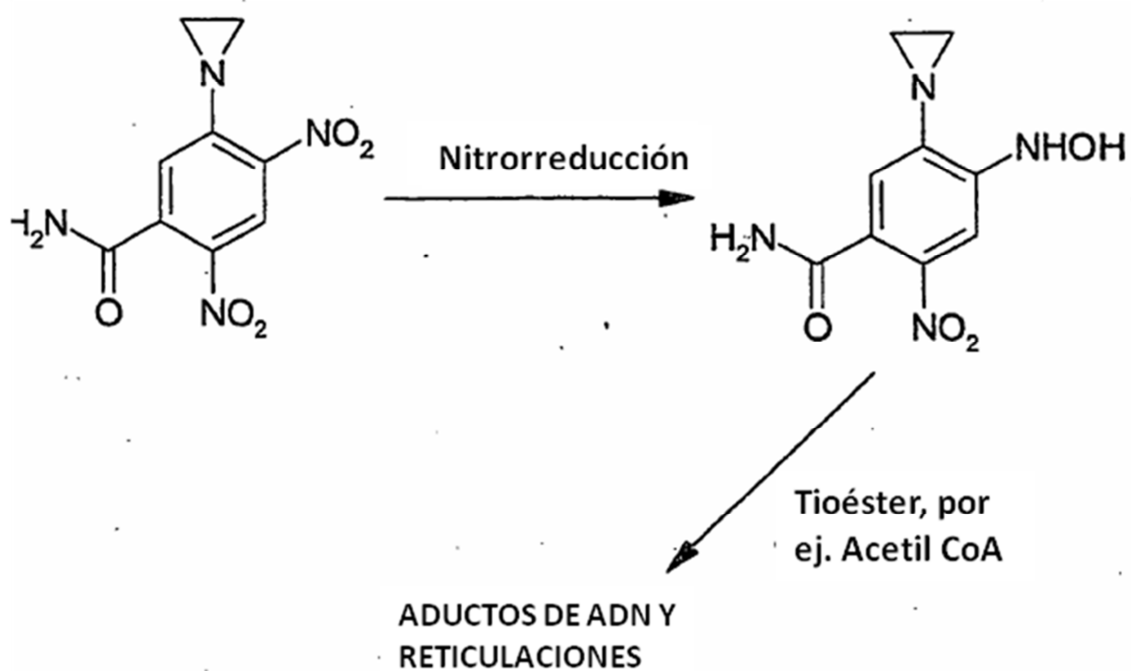


Fig. 2

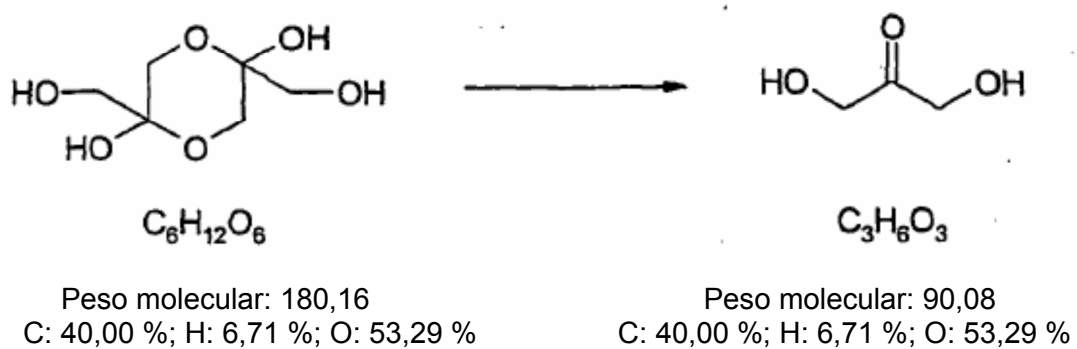
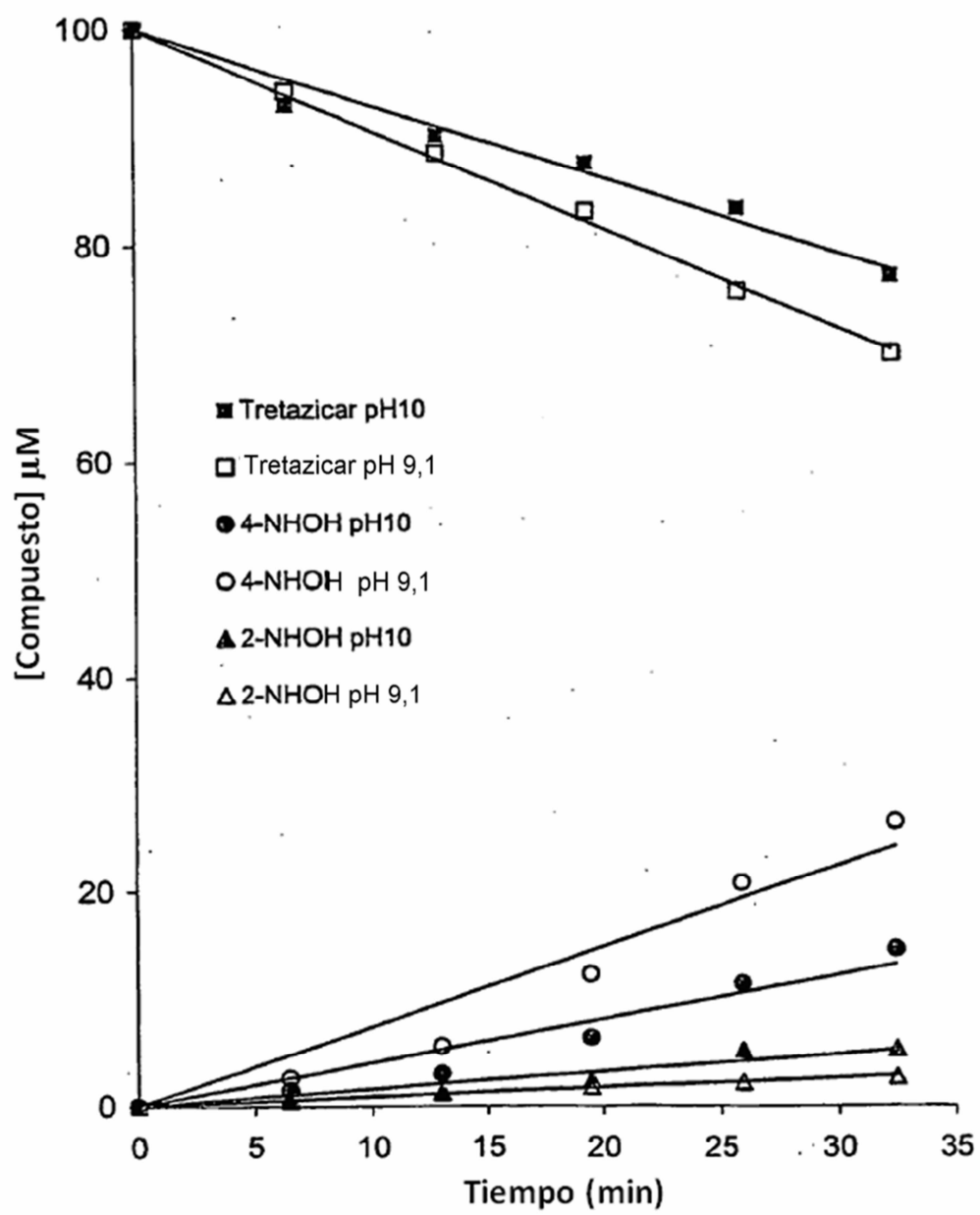


Fig. 3

*Fig. 4*

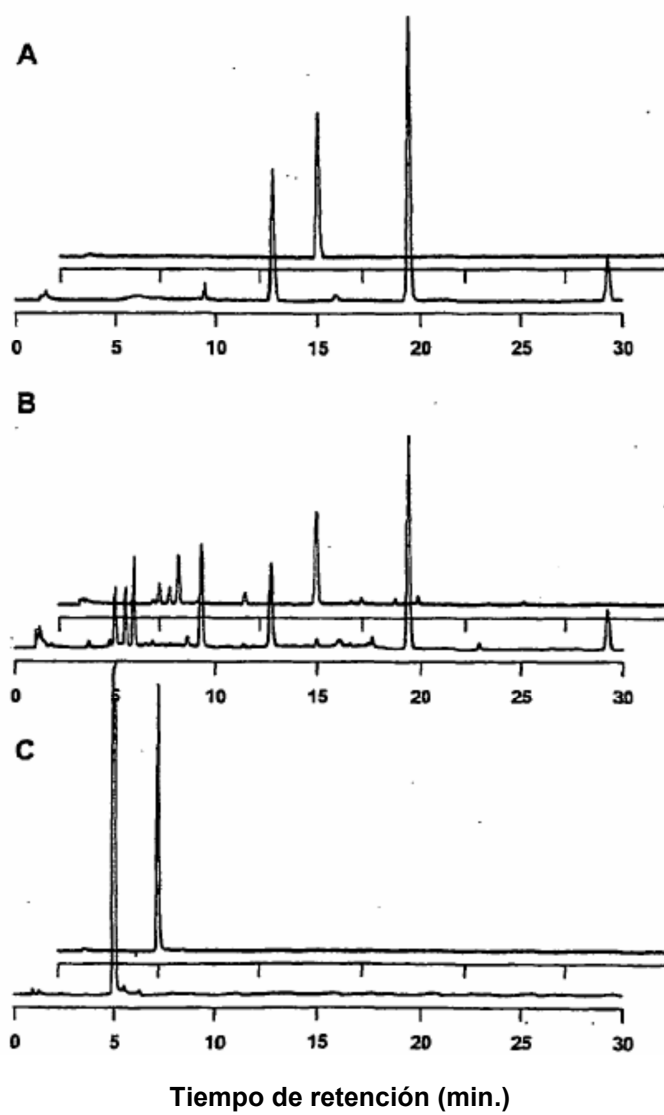


Fig. 5

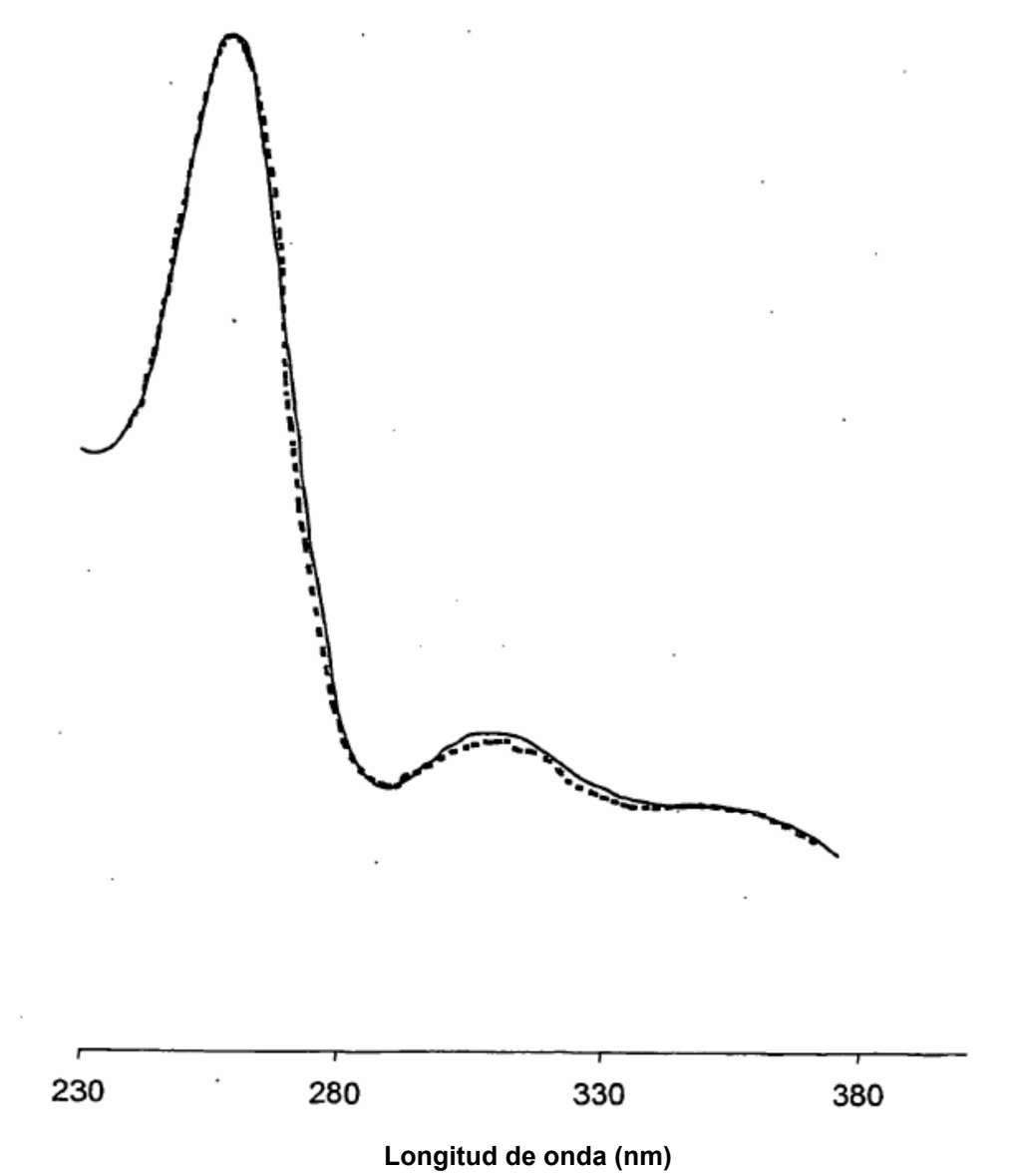
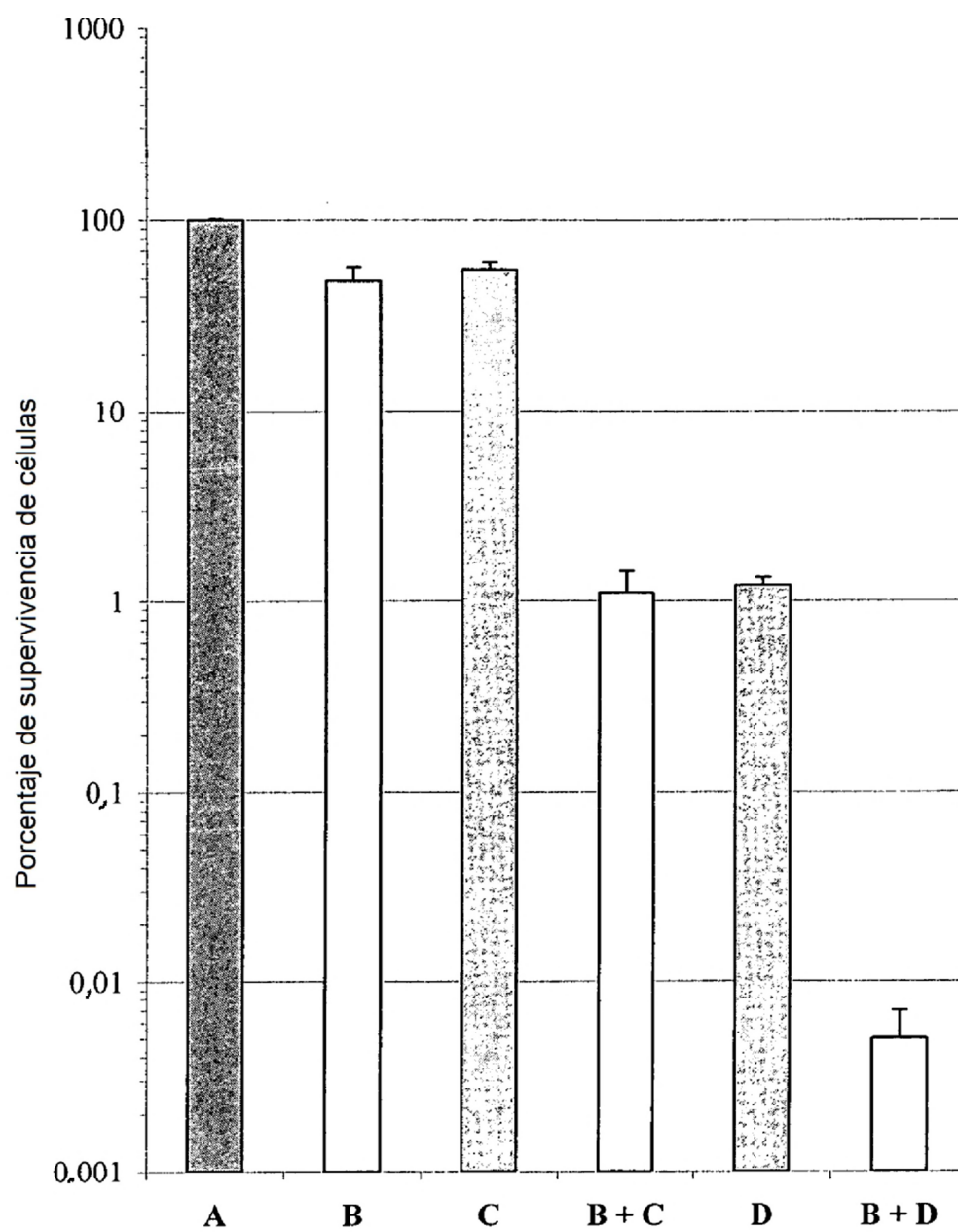


Fig. 6

***Fig. 7***