

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 917**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/396** (2006.01)  
**A61K 31/407** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)  
**C07D 203/14** (2006.01)  
**C07D 403/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013 PCT/EP2013/065968**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13742640 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2882743**

54 Título: **Compuestos de quinona y sus usos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**30.07.2012 GB 201213486**

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

**10.04.2018**

73 Titular/es:

**ONCO-NX LIMITED (100.0%)  
76 King Street  
Manchester M2 4NH, GB**

72 Inventor/es:

**MCGOWN, ALAN;  
HADFIELD, JOHN y  
BUTLER, JOHN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 662 917 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

Compuestos de quinona y sus usos para el tratamiento del cáncer

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de Patente del Reino Unido GB 1213486.2 presentada el 30 de julio de 2012, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de quinona y a sus usos médicos, en particular para el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos de 2,5-diaziridinilbenzoquinona que son profármacos capaces de activarse en células cancerosas que expresan DT-diaforasa.

Antecedentes de la invención

10 La DT-diaforasa (DTD) es una enzima que se sobreexpresa en muchos tipos de tejidos cancerosos, que incluyen mama, colon, hígado, vejiga, estómago, el sistema nervioso central (SNC) y tumores de pulmón y en melanomas. Se han estudiado diversos profármacos de quinona para determinar su efecto sobre las células cancerosas que expresan DTD. A modo de ejemplo, la expresión de DTD se incrementa hasta 80 veces en el cáncer primario de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en relación con el pulmón normal y hasta 400 veces en las líneas celulares de cáncer  
15 de pulmón de células pequeñas (CPCP). También se sabe que la DTD activa los profármacos a base de quinona y esto se ha propuesto como un enfoque para seleccionar selectivamente las células cancerosas que expresan la DTD.

Sin embargo, aunque se han diseñado y probado profármacos basados en quinona para tratar de explotar esta biología, hasta la fecha se ha descubierto que experimentan uno o más inconvenientes.

20 A modo de ejemplo, se ha demostrado que xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas con alta actividad de DTD son susceptibles al profármaco de quinona mitomicina C. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la mitomicina C tiene actividad en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, es un sustrato comparativamente pobre para DTD (Beall et al., Cancer Research, 54: 3196-3201, 1994) y el metabolismo de mitomicina C por DTD es dependiente del pH, lo que conduce a la inhibición dependiente del pH de DTD a pH más altos (Siegel et al., Mol. Pharmacol., 44: 1128-1134, 1993).

25 La apaziquona o (E)-5-(1-azirinil)-3-(hidroximetil)-2-(3-hidroxi-1-propenil)-1-metil-1H-indol-4,7-diona es una indolquinona que está relacionada con mitomicina C que también es susceptible a la conversión reductora a metabolitos activos por DTD. Ha sido objeto de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer superficial de vejiga. Sin embargo, mientras que la apaziquona se reduce eficientemente mediante la DTD, genera principalmente radicales de oxígeno reactivos en lugar de enlaces entrecruzados de ADN y se ha demostrado que forma exclusivamente roturas  
30 de cadenas de ADN. Siendo un agente convencional de "orientación hipóxica", la apaziquona no era activa en estudios de esferoides que demostraban una expresión aumentada de DTD hacia el centro necrótico del esferoide. Los resultados probablemente se refieren a la escasa capacidad de la apaziquona para penetrar las células y atravesar las membranas celulares (Bibby et al., Int. J. Oncol., 3: 661-666, 1993).

35 La MeDZQ (2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzoquinona) es un ejemplo adicional de un agente prometedor que utiliza el enfoque dirigido por la enzima DTD para el tratamiento del cáncer. Los resultados iniciales mostraron que es más de 150 veces más eficaz como sustrato para la DTD humana recombinante que la mitomicina C, que tiene un metabolismo independiente del pH y no inactiva la DTD a pH más altos (Beall et al., supra; Ross et al. Oncol. Res., 6: 493-500, 1994).

40 Aunque la MeDZQ se somete a activación biorreductiva por DTD, es claramente diferente de la apaziquona, ya que solo produce un aumento muy modesto de la citotoxicidad bajo condiciones hipóxicas en relación con las condiciones aeróbicas. Además, a pesar de mostrar una buena correlación entre la actividad DTD y la citotoxicidad MeDZQ a través de un rango de líneas celulares tumorales humanas, la formulación de MeDZQ como agente terapéutico útil se vio obstaculizada por su escasa solubilidad.

45 El documento US 6,156,744 describe un profármaco de quinona soluble en agua, 2,5-diaziridin-1-3-(hidroximetil)-6-metil-1,4-benzoquinona, denominado "RH1" y sus ésteres formados con grupos acetilo, benzoilo, naftoilo y aminoácidos protegidos. El documento US 6,156,744 muestra que RH1 se reduce mediante DTD y mata selectivamente a las células que expresan DTD mediante reticulación de ADN, y que es más soluble que la MeDZQ.

Sigue siendo un problema en la técnica el desarrollo de profármacos que se activen mediante DTD y tengan propiedades farmacológicas para hacerlos candidatos a fármacos eficaces.

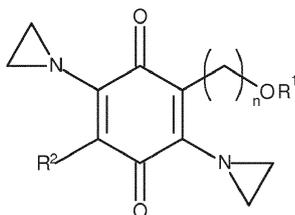
[Nakao, H. et al. (1972) Chem. Pharm. Toro. vol 20, no. 9 pp 1968-1979 describe una serie de derivados de 2,5-bis(1-aziridinil)-p-benzoquinona que se analizaron para determinar si tenían actividad antileucémica.

Yoshimoto, M. et al. (1979) J. Med. Chem. vol 22, no. 5 pp 491-496 describe el ensayo de las actividades antileucémicas de una serie de 2,5-bis(1-aziridinil)-p-benzoquinonas.

## 5 Resumen de la invención

En términos generales, la presente invención se basa en la idea de los presentes inventores de que los ésteres de RH1 de la técnica anterior tienden a ser muy inestables en solución acuosa, limitando de ese modo su eficacia como agentes terapéuticos. Por consiguiente, la presente invención se refiere a nuevos compuestos basados en quinona que tienen propiedades farmacológicas mejoradas, que están diseñados para ser activados selectivamente por reducción de 2 electrones dentro de los tumores. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que los compuestos de la presente invención son profármacos de quinona que experimentan una reducción enzimática de 2 electrones por DT-diaforasa en células cancerosas para producir hidroquinona, un potente agente de entrecruzamiento de ADN. Como la DT-diaforasa se sobreexpresa en un rango de tumores humanos, esto significa que los compuestos de la presente invención son selectivamente citotóxicos para las células cancerosas en comparación con las células normales. Además, la presente invención demuestra además que los compuestos de la presente invención, representados por el ejemplo del profármaco de quinona Es5, tienen una estabilidad inesperada cuando se comparan con otros ésteres de RH1 y tienen una mayor selectividad hacia las células que expresan DT-diaforasa que compuestos de la técnica anterior tales como RH1 y ésteres de los mismos. En particular, el éster Es5 (compuesto 4.65) tiene una vida media de más de 24 h, al igual que su producto de hidrólisis 4.61, de modo que es >20 veces más estable que otros ésteres basados en RH1.

En términos generales, la presente invención se refiere a compuestos representados por la Fórmula I:



25 en donde:

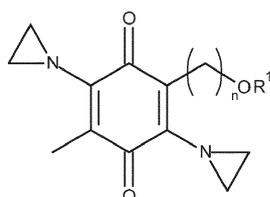
$n = 2, 3, 4, 5, 6$  o  $7$ ;

$R^1$  es hidrógeno, etanoilo, propanoilo, butanoilo o benzoilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo  $C_{1-10}$ , alcoxi  $C_{1-10}$ , hidroxilo, halógeno, nitro o amino; y

30  $R^2$  es metilo, etilo o fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo  $C_{1-10}$ , alcoxi  $C_{1-10}$ , hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

y sales y/o solvatos de los mismos, y a métodos de tratamiento que usan tales compuestos.

Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos representados por la Fórmula Ia:



35

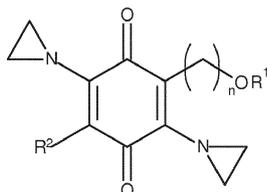
en donde:

n = 2, 3 o 4; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno, etanoilo, propanoilo o butanoilo; y

sales y/o solvatos de los mismos.

5 De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula I:



en donde:

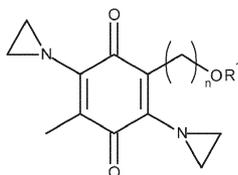
10 n = 3, 4, 5, 6 o 7;

R<sup>1</sup> es hidrógeno, etanoilo, propanoilo, butanoilo o benzoilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo C<sub>1-10</sub>, alcoxi C<sub>1-10</sub>, hidroxilo, halógeno, nitro o amino; y

R<sup>2</sup> es metilo, etilo o fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo C<sub>1-10</sub>, alcoxi C<sub>1-10</sub>, hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

15 o una sal y/o solvato del mismo.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula Ia:



20 En donde:

n = 3 o 4; y

R<sup>1</sup> es hidrógeno, etanoilo, propanoilo o butanoilo; y

sales y/o solvatos de los mismos.

En algunas realizaciones preferidas, n = 3.

25 En una realización preferida, n = 3 y R<sup>1</sup> es hidrógeno o etanoilo, de modo que el compuesto es 3-(2,5-bis-aziridin-1-il-4-metil-3,6-dioxo-ciclohexa-1,4-dienil)-propiléster del ácido acético o 2,5-bisaziridin-1-il-3-(3-hidroxipropil)-6-metil-1,4-benzoquinona, denominados Es5 y 4-61 en la presente solicitud. En cualquier aspecto de la presente invención, los sustituyentes halógenos opcionales pueden ser grupos fluoro, cloro o bromo.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, y que comprende opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento del cáncer. Ejemplos adecuados pueden incluir, no a modo de limitación, cisplatino (cis-platino), docetaxel, cloruro de cobalto, epirrubicina, citarabina (ARA-C) y mitomicina C. Preferiblemente, la combinación de agentes terapéuticos demuestra un efecto aditivo o sinérgico, más preferiblemente un efecto sinérgico.

5 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto y mitomicina C. Preferiblemente, la composición comprende un compuesto de Fórmula I como se define en este documento en combinación con cisplatino o cloruro de cobalto.

Las combinaciones particularmente preferidas incluyen Es5 (4.65) y cisplatino, y Es5 (4.65) y cloruro de cobalto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento para uso en un método de terapia.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, para uso en un método para tratar el cáncer. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención se usan para el tratamiento de tipos de cáncer en los cuales las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa. En este caso, los compuestos de la presente invención actúan como profármacos y experimentan reducción enzimática por DT-diaforasa para producir hidroxiquinona, un compuesto que es citotóxico para las células cancerosas. A modo de ilustración, la presente invención puede usarse en el tratamiento de cáncer de cerebro, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata o cáncer de mama. Por consiguiente, la presente invención puede implicar determinar la idoneidad de un individuo con cáncer para el tratamiento con los compuestos de la presente invención. Preferiblemente, esto implica obtener una muestra de células cancerosas de un paciente, determinar si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa y, si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa, tratar al paciente con un compuesto representado por la Fórmula I. El método puede implicar el paso de asignar la sobreexpresión de DTD a un individuo, para determinar si son adecuados, o no, para el tratamiento con un compuesto representado por la Fórmula I. Esto puede implicar el paso de asignar la sobreexpresión de DTD en una escala que distingue a un individuo que probablemente se beneficia del tratamiento de un individuo que tiene menos probabilidad, o es poco probable, de beneficiarse del tratamiento, por ejemplo, en algunos casos, las células cancerosas de ese individuo no expresan DT-diaforasa a un nivel que sea capaz de reducir eficazmente un compuesto de la presente invención a una hidroxiquinona citotóxica.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I como se define en este documento para uso en un método para tratar cáncer, en el que el método comprende el tratamiento con un agente terapéutico adicional seleccionado de cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto, y mitomicina C. Las combinaciones particularmente preferidas incluyen Es5 (4.65) y cisplatino, Es5 (4.65) y cloruro de cobalto, Es5 (4.65) y docetaxel, y Es5 (4.65) y mitomicina C.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define aquí, a un paciente que necesita tratamiento de los mismos.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, y un agente terapéutico adicional seleccionado de cisplatino, docetaxel, cobalto cloruro y mitomicina C, a un paciente que necesita tratamiento de los mismos.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritas, excepto cuando tal combinación sea claramente inadmisibles, o se establece que se evite expresamente. Se describirán ahora realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y no de limitación.

45 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación gráfica de los resultados de los experimentos *in vivo* que muestran la comparación de los tratamientos expresados como % de supervivencia celular en comparación con el control s.c. o i.p. relativo.

Figura 2. Representación gráfica de los resultados de los experimentos *in vivo* que muestran la comparación de las líneas celulares expresadas como % de supervivencia celular en comparación con el control s.c. o i.p. relativo.

50 Descripción detallada

DT-Diaforasa

Los compuestos, composiciones farmacéuticas y usos médicos de la presente invención son particularmente aplicables para el tratamiento de cánceres que sobreexpresan la enzima DT-diaforasa (DTD), también conocida en la técnica como NQO1 y NAD(P)H:aceptor de quinona oxidorreductasa 1 (EC 1.6.99.2). Sin desear estar sujetos a ninguna teoría en particular, generalmente se cree que las células cancerosas que sobreexpresan DTD hacen que profármacos de quinona relativamente inactivos se activen selectivamente mediante una reducción enzimática de 2 electrones dentro de las células cancerosas para producir hidroquinona que es un potente agente de entrecruzamiento de ADN que luego es citotóxico para las células cancerosas. La selectividad de esta aplicación terapéutica se puede lograr porque la DTD está sobreexpresada en una gama de tumores humanos en comparación con células normales, que incluyen cáncer cerebral, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama (Zappa et al., *J. Histochem., Cytochem.*, 49: 1187-1188, 2001; Tudor et al., *Anti-Cancer Drugs*, 16: 381-391, 2005; Danson et al., *Annals of Oncology*, 22: 1653-1660, 2011). En general, se prefiere que la sobreexpresión de DTD por las células cancerosas sea el resultado del fenotipo de tipo silvestre de las células. Alternativa o adicionalmente, la sobreexpresión de DTD puede ser causada por la transformación de células cancerosas diana con un ácido nucleico que codifica DTD (véase Danson et al., supra).

Sin embargo, aunque esta aplicación de los compuestos es un aspecto preferido de la presente invención, también se sabe en la técnica que los compuestos de 2,5-diaziridinilbenzoquinona son citotóxicos para algunas formas de cáncer que no sobreexpresan la DTD en una extensión sustancial, como la leucemia. También se sabe que los compuestos de este tipo general también pueden experimentar reducción para formar productos citotóxicos a través de la acción de otros tipos de enzimas reductoras que se encuentran en las células cancerosas.

De acuerdo con esto, la expresión de DTD es una herramienta útil en el contexto de la presente invención para determinar si un tipo dado de cáncer puede tratarse usando los compuestos y composiciones descritos en el presente documento y/o como un criterio para la selección de pacientes para el tratamiento. En ambas situaciones, esto puede implicar probar una muestra de células cancerosas para determinar si la DTD está sobreexpresada y, por lo tanto, si es probable que el tipo de cáncer o paciente individual se beneficie del tratamiento, por ejemplo, como lo demuestran Hussein et al. *British Journal of Cancer* (2009) 101, pp. 55-63.

De acuerdo con esto, la presente invención incluye analizar una muestra de células cancerosas para determinar si un tipo de cáncer o un individuo dado se pueden tratar de acuerdo con la presente invención. Esto puede hacerse determinando si la proteína DT-diaforasa está presente a un nivel elevado en las células de la muestra, por ejemplo en comparación con la expresión en células normales, o mediante la determinación de la expresión génica de DT-diaforasa. La muestra puede ser de células cancerosas del individuo. En general, la sobreexpresión puede determinarse con relación a un control, por ejemplo, con relación a células no cancerosas, preferiblemente del mismo tejido. El método puede implicar el paso de asignar la sobreexpresión de DTD a una escala que distingue a un individuo que probablemente se beneficia del tratamiento de un individuo que tiene menos probabilidad, o poco probablemente se beneficie del tratamiento.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención, que incluye la determinación de si un paciente tiene un cáncer que sobreexpresen DT-diaforasa, puede llevarse a cabo mediante el análisis de la expresión de la proteína DT-diaforasa.

Preferiblemente, la presencia o cantidad de proteína DT-diaforasa puede determinarse usando un agente de unión capaz de unirse específicamente a la proteína DT-diaforasa, o fragmentos de la misma. Un tipo preferido de agente de unión a proteína DT-diaforasa es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a la DT-diaforasa o fragmento de la misma. El anticuerpo puede marcarse para permitir su detección o capacidad de detección después de la reacción con una o más especies adicionales, por ejemplo, usando un anticuerpo secundario que está marcado o es capaz de producir un resultado detectable, por ejemplo en un ensayo de tipo ELISA. Como alternativa, se puede emplear un agente de unión marcado en una inmunotransferencia Western para detectar la proteína DT-diaforasa. También se sabe que algunas formas de cáncer se caracterizan por tener mutaciones en el gen NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] que significa que codifica DT-diaforasa funcionalmente inactiva y esto también puede determinar que individuos que tienen niveles inactivos o reducidos de DT-diaforasa tienen menos probabilidades de responder al tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención. Esto puede determinarse mediante análisis de SNP o polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Alternativa, o adicionalmente, el método para determinar la presencia de proteína DT-diaforasa puede llevarse a cabo en muestras tumorales, por ejemplo usando análisis inmunohistoquímico (IHC). El análisis IHC puede llevarse a cabo utilizando muestras fijadas en parafina o muestras de tejido congelado, y generalmente implica tinción de las muestras para resaltar la presencia y ubicación de la proteína DT-diaforasa.

En un ejemplo específico, siguiendo el enfoque utilizado en Zappa et al. (supra) pueden analizarse muestras de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina usando inmunohistoquímica (IHC) para detectar la expresión de DTD usando anticuerpos monoclonales anti-DTD (IgG1) derivados de un ratón BALB-c inmunizado con proteína DTD humana recombinante purificada (Siegel et al., *Clin. Cancer Res.*, 4: 2065-2070, 1998). Este enfoque utiliza anticuerpos monoclonales de ratón no reactivos con los seres humanos (IgG1) producidos en cultivo de tejidos que se

usaron como reactivo de control negativo. Las secciones de tejido (3 µm) pueden desparafinarse en xileno, rehidratarse mediante alcohol graduado y someterse a microondas. La actividad de peroxidasa endógena y la unión no específica pueden bloquearse añadiendo, respectivamente, agente bloqueante de peroxidasa (DAKO EnVision Kit; Carpintería, CA) y 20% de suero de conejo normal. Las secciones en serie pueden incubarse sucesivamente con anticuerpos anti-DTD o de control y luego con el anticuerpo secundario (polímero marcado HRP anti-ratón). La inmunodetección se realiza utilizando una solución sustrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno y cromógeno 3,3-diaminobenzidina). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. La intensidad de la inmunotinción (tinción marrón) se calificó visualmente como 0 (negativa), +1 (muy débil), +2 (débil), +3 (fuerte) y +4 (muy intensa). En este tipo de ensayo, no debería haber sustancialmente inmunotinción en las secciones de control cuando se usaron anticuerpos no específicos (puntuación 0). Por otro lado, en células cancerosas de cánceres o pacientes individuales tratables de acuerdo con la presente invención, se esperaría que la tinción en la prueba de IHC tuviera una intensidad de +3 o +4.

En un ejemplo adicional, la actividad DTD puede determinarse espectrofotométricamente midiendo la reducción de citocromo C a 550 nm a 25°C, véase Chen et al., *Biochem J.* 284: 855-860, 1992. Este ensayo usa una mezcla de ensayo (1 mL) que contiene 25 mM de regulador Tris, pH 7.5, 200 µM de NAD(P)H, 0.8 µM de menadiona y 30 µM de citocromo C. En este ensayo, la menadiona es el aceptor de electrones y el citocromo C se usa para reoxidar el menadiol formado. El efecto de otras quinona reductasas se puede distinguir en este ensayo mediante la adición de 1 µM de dicumarol, un inhibidor selectivo de la DTD.

Alternativamente o de manera adicional, la determinación de la expresión génica de DT-diaforasa puede implicar determinar la presencia o cantidad de ARNm de DT-diaforasa en una muestra. Los métodos para hacer esto son bien conocidos por la persona experta. A modo de ejemplo, incluyen la determinación de la presencia de ARNm DT-diaforasa (i) usando una sonda marcada que sea capaz de hibridarse con el ácido nucleico DT-diaforasa, por ejemplo mediante el uso de técnicas tales como FISH, y/o (ii) usando PCR que implica uno o más cebadores basados en una secuencia de ácido nucleico DT-diaforasa para determinar si el transcrito de DT-diaforasa está presente en una muestra. La sonda también se puede inmovilizar como una secuencia incluida en una micromatriz.

Preferiblemente, la detección de ARNm DT-diaforasa se lleva a cabo extrayendo ARN de una muestra del tumor y midiendo la expresión de DT-diaforasa usando específicamente RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Alternativa o adicionalmente, la expresión de DT-diaforasa podría evaluarse usando ARN extraído de una muestra tumoral usando análisis de microarreglos, que mide los niveles de ARNm para un grupo de genes usando una pluralidad de sondas inmovilizadas en un sustrato para formar el conjunto.

Como se mencionó anteriormente, la elección de si la expresión de proteínas o la expresión génica, o ambas, se usan para determinar la sobreexpresión de DTD, es una decisión que el experto debe tomar a la luz del conocimiento de las ventajas y desventajas de las diferentes metodologías teniendo en cuenta la precisión y sensibilidad respectivas de las técnicas, la aparición de falsos positivos y falsos negativos y la disponibilidad de los diferentes ensayos por razones económicas u otras prácticas.

#### Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención descritos en este documento para el tratamiento de cáncer pueden administrarse solos, pero generalmente es preferible proporcionarlos en composiciones farmacéuticas que comprenden adicionalmente con uno o más vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, rellenos, reguladores, estabilizadores, conservantes, lubricantes u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos o profilácticos. Se proporcionan ejemplos de componentes de composiciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Estos compuestos o derivados de los mismos pueden usarse en la presente invención para el tratamiento de cáncer, en particular cánceres que sobreexpresan DTD. Como se usa en el presente documento, los "derivados" de los agentes terapéuticos incluyen sales, complejos de coordinación, ésteres tales como ésteres hidrolizables *in vivo*, ácidos o bases libres, hidratos, profármacos o lípidos, y parejas de acoplamiento.

Las sales de los compuestos de la invención son preferiblemente bien toleradas fisiológicamente y no tóxicas. Se conocen muchos ejemplos de sales para los expertos en la técnica. Los compuestos que tienen grupos ácidos, tales como fosfatos o sulfatos, pueden formar sales con metales alcalinos o alcalinotérreos tales como Na, K, Mg y Ca, y con aminas orgánicas tales como trietilamina y tris(2-hidroxietil)amina. Las sales pueden formarse entre compuestos con grupos básicos, por ejemplo, aminas, con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido fumárico o ácido tartárico. Los compuestos que tienen ambos grupos ácido y básico pueden formar sales internas.

Se pueden formar ésteres entre los grupos hidroxilo o ácido carboxílico presentes en el compuesto y un asociado de reacción de ácido carboxílico o alcohol apropiado, usando técnicas bien conocidas en el arte.

Los derivados que son profármacos de los compuestos son convertibles *in vivo* o *in vitro* en uno de los compuestos parentales. Típicamente, al menos una de las actividades biológicas del compuesto se reducirá en la forma profármaco del compuesto, y se puede activar mediante la conversión del profármaco para liberar el compuesto o un metabolito del mismo. La administración de profármacos puede ser ventajosa para mejorar, por ejemplo, la estabilidad en almacenamiento y/o la formulación/biodisponibilidad con respecto al compuesto original.

Otros derivados incluyen parejas de acoplamiento de los compuestos en los que los compuestos están unidos a un asociado de acoplamiento, por ejemplo estando químicamente acoplado al compuesto o asociado físicamente con él. Ejemplos de parejas de acoplamiento incluyen una etiqueta o molécula indicadora, un sustrato de soporte, un vehículo o molécula de transporte, un efector, un fármaco, un anticuerpo o un inhibidor. Los asociados de acoplamiento se pueden unir covalentemente a compuestos de la invención a través de un grupo funcional apropiado en el compuesto tal como un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo o un grupo amino. Otros derivados incluyen formular los compuestos con liposomas.

El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento incluye compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Los agentes activos descritos en este documento para el tratamiento de cánceres que sobreexpresan DTD de acuerdo con la presente invención son preferiblemente para la administración a un individuo en una "cantidad profilácticamente efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), esto es suficiente para mostrar el beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trate. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., están bajo la responsabilidad de médicos generales y otros médicos, y generalmente toman en cuenta el trastorno que se tratará, la condición del paciente individual, el lugar de la entrega, el método de administración y otros factores conocidos por practicantes. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>a</sup> Edición, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins. Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección que se va a tratar.

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un vehículo, que puede constituir uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Los agentes descritos en este documento para el tratamiento de cáncer que sobreexpresa DTD pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier ruta conveniente de administración, ya sea sistémica/periféricamente o en el sitio de la acción deseada, que incluye pero no se limita a, oral (por ejemplo por ingestión); tópico (que incluye, por ejemplo, transdérmico, intranasal, ocular, bucal y sublingual); pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz); rectal; vaginal; parenteral, por ejemplo, mediante inyección, que incluye subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; mediante implante de un depósito, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

Las formulaciones adecuadas para administración oral (por ejemplo, por ingestión) se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o tabletas, conteniendo, cada una, una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; como un bolo; como un electuario; o como una pasta.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, que incluyen cutáneas, subcutáneas, intramusculares, intravenosas e intradérmicas), incluyen soluciones de inyección estériles, isotónicas, acuosas, no acuosas, que pueden contener antioxidantes, reguladores, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes, y liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para dirigir el compuesto a componentes sanguíneos o a uno o más órganos. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para usar en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer o inyección de Ringer lactato. Típicamente, la concentración del compuesto activo en la solución

es del orden de 1 ng/ml a 10 µg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar suspensiones y soluciones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles. Las formulaciones pueden estar en forma de liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para dirigir el compuesto activo a los componentes sanguíneos o a uno o más órganos.

#### Combinaciones

Las composiciones que comprenden agentes descritos en este documento para el tratamiento de cáncer se pueden usar en los métodos descritos en este documento en combinación con regímenes quimioterapéuticos estándar o junto con radioterapia. Ejemplos de otros agentes quimioterapéuticos incluyen Amsacrine (Amsidine), Bleomicina, Busulfan, Capecitabine (Xeloda), Carboplatino, Carmustina (BCNU), Clorambucil (Leukeran), Cisplatino (Cisplatinum), Cladribina (Leustat), Clofarabina (Evoltra), cloruro de cobalto, Crisantaspasa (Erwinase), Ciclofosfamida, Citarabina (ARA-C), Dacarbazina (DTIC), Dactinomicina (Actinomicina D), Daunorrubicina, Docetaxel (Taxotere), Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido (Vepesid, VP-16), Fludarabina (Fludara), Fluorouracilo (5-FU), Gemcitabina (Gemzar), Hidroxiurea (Hidroxycarbamida, Hydrea), Idarrubicina (Zavedos). Ifosfamida (Mitoxana), irinotecán (CPT-11, Campto), Leucovorina (ácido folínico), Doxorubicina liposomal (Caelyx, Myocet), Daunorrubicina liposomal (DaunoXome®) lomustina, Melfalano, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino (Eloxatin), Paclitaxel (Taxol), Pemetrexed (Alimta), Pentostatina (Nipent), Procarbazina, Raltitrexed (Tomudex®), Estreptozocina (Zanosar®), Tegafur-uracilo (Uftoral), Temozolomida (Temodal), Tenipósido (Vumon), Tiotepa, Tioguanina (6-TG) (Lanvis), Topotecan (Hycamtin), Treosulfan, Vinblastina (Velbe), Vincristina (Oncovin), Vindesina (Eldisine) y Vinorelbina (Navelbine). Preferiblemente, el otro agente terapéutico se selecciona para dar un efecto aditivo o sinérgico.

También se describen aquí métodos de terapia de combinación, en los que un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento se usa en combinación con un agente terapéutico adicional, preferiblemente un agente quimioterapéutico, para un paciente que necesita tratamiento de los mismos. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, y un agente terapéutico adicional seleccionado de cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto, y mitomicina C, a un paciente que necesita tratamiento de los mismos. El agente terapéutico adicional puede coadministrarse o la administración puede ser secuencial. En algunas realizaciones preferidas, el agente terapéutico adicional es cisplatino o cloruro de cobalto. En algunas realizaciones preferidas, el segundo agente terapéutico es docetaxel o mitomicina C. Las combinaciones particularmente preferidas incluyen Es5 (4.65) y cisplatino, Es5 (4.65) y cloruro de cobalto, Es5 (4.65) y docetaxel, y Es5 (4.65) y mitomicina C. El cáncer puede ser, por ejemplo, de cerebro, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata o cáncer de mama.

En algunas realizaciones, las células del cáncer sobreexpresan DT-diaforasa. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento experimenta una reducción enzimática por DT-diaforasa para producir hidroxiquinona.

En algunas realizaciones, el método comprende obtener una muestra de células cancerosas de un paciente, determinar si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa y, si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa, tratar al paciente con un compuesto representado por la Fórmula I y el agente terapéutico adicional.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento, y opcionalmente que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente terapéutico adicional para uso en el tratamiento del cáncer. Ejemplos adecuados pueden incluir, no a modo de limitación, cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto, epirubicina, citarabina (ARA-C) y mitomicina C. Preferiblemente, la combinación de agentes terapéuticos en la composición demuestra un efecto aditivo o sinérgico, más preferiblemente un efecto sinérgico.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento y uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto y mitomicina C. Preferiblemente, la composición comprende un compuesto de Fórmula I como se define en el presente documento en combinación con cisplatino o cloruro de cobalto.

Las combinaciones particularmente preferidas incluyen Es5 (4.65) y cisplatino, y Es5 (4.65) y cloruro de cobalto.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de un compuesto de Fórmula I como se define aquí y un agente terapéutico adicional,

preferiblemente un agente terapéutico adicional como se define en el presente documento, para uso en métodos de terapia como se describe aquí.

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende Es5 (4.65) y cisplatino para uso en un método de terapia. En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende Es5 (4.65) y cloruro de cobalto para uso en los métodos de terapia descritos en este documento.

#### Administración

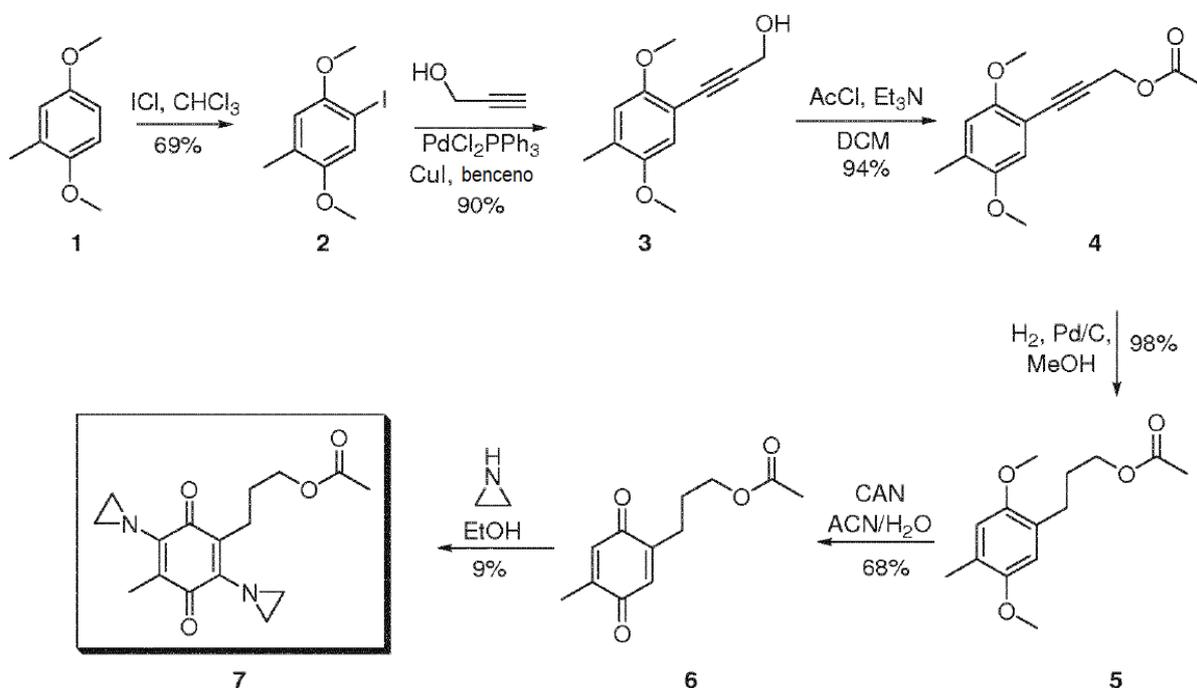
La administración *in vivo* puede efectuarse en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) a lo largo del curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios más eficaces y la dosificación de administración son bien conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la formulación utilizada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que se trata y el sujeto que se está tratando. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 250 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Cuando el compuesto activo es una sal, un éster, profármaco o similar, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto precursor, por lo que el peso real que se va a usar se incrementa proporcionalmente.

#### Parte Experimental

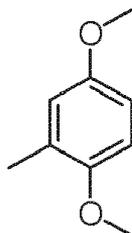
##### Materiales y métodos

##### Síntesis de Es5



20

1,4-Dimetoxi-2-metil-benceno 2[1]



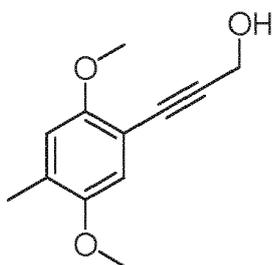
5 Se añadió 2,5-dimetoxitolueno 1 (9.0 g, 59.21 mmol) en éter dietílico (90 cm<sup>3</sup>) a una solución agitada de monocloruro de yodo (10.17 g, 62.65 mmol) en cloroformo (30 cm<sup>3</sup>) durante 30 minutos. La mezcla se agitó durante la noche antes de que se añadiera tiosulfato de sodio al 10% (150 cm<sup>3</sup>). Los extractos orgánicos se extrajeron con 2 x 75 cm<sup>3</sup> de éter dietílico. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (150 cm<sup>3</sup>), salmuera (100 cm<sup>3</sup>), se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se secaron al vacío. El sólido resultante se recrystalizó en metanol para proporcionar el compuesto del título como un sólido rojo 2 (11.3 g, 69%).

R<sub>f</sub> 0.52 (SiO<sub>2</sub>, Hex 3:1 EtOAc).

10 p.f. 80-82°C (Literatura 81-82°C (Reed et al., JACS, 120(38): 9729-9734, 1998)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.72 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.75 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.60 (1H, s, ArH), 7.10 (1H, s, ArH) ppm.

3-(2,5-Dimetoxi-4-metil-fenil)-prop-2-in-1-ol 3 (Sato, J. Org. Chem., 66(1): 309-314, 2000)

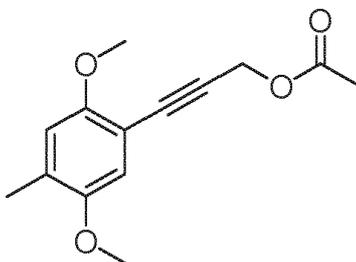


15 A un matraz cargado con cloruro de bis(trifenilfosfina) paladio (151 mg, 0.215 mmol) y yoduro de cobre (273 mg, 1.43 mmol) se añadió una solución de 1,4-dimetoxi-2-metil-benceno 2 (2.0 g, 7.20 mmol) en benceno (40 cm<sup>3</sup>). La mezcla se enfrió a 0°C antes de añadir dietilamina (5.19 cm<sup>3</sup>, 50.35 mmol) y alcohol propargílico (2.1 cm<sup>3</sup>, 36.0 mmol). La mezcla se dejó en agitación durante la noche antes de detenerse con cloruro de amonio saturado (2 cm<sup>3</sup>) y luego se concentró bajo vacío. Luego se añadió acetato de etilo (75 cm<sup>3</sup>) y esto se lavó con salmuera (75 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó bajo vacío. La purificación se logró mediante cromatografía en columna (gel de sílice, Hex 3:1 EtOAc) para producir el compuesto del título 3 como un aceite amarillo pálido (1.33 g, 90%).

R<sub>f</sub> 0.52 (SiO<sub>2</sub>, Hex 1:1 EtOAc).

25 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.55 (1H, br s, OH), 6.68 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.45 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.62 (1H, s, ArH), 6.68 (1H, s, ArH) ppm.

3-(2,5-dimetoxi-4-metil-fenil)-prop-2-inil éster del ácido acético 4

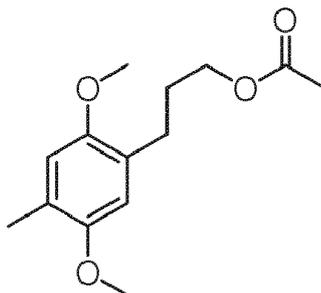


- 5 A una solución agitada del alcohol (4.47 g, 21.69 mmol) en diclorometano (40 cm<sup>3</sup>) se añadió trietilamina (4.39 cm<sup>3</sup>, 43.38 mmol). La mezcla se enfrió a 0°C antes de añadir cloruro de acetilo (2.55 cm<sup>3</sup>, 32.48 mmol) gota a gota. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se inactivó con HCl 1M (15 cm<sup>3</sup>), la capa orgánica se separó y se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (30 cm<sup>3</sup>), salmuera (30 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó bajo vacío para dar el compuesto del título un aceite amarillo 4 (5.08 g, 94%).

R<sub>f</sub> 0.61 (SiO<sub>2</sub>, Hex 1:1 EtOAc).

- 10 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.72 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.90 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.62 (1H, s, ArH), 6.78 (1H, s, ArH) ppm.

3-(2,5-dimetoxi-4-metil-fenil)-propil éster del ácido acético 5



- 15 El alquino 3 (5.01 g, 20.2 mmol) se disolvió en metanol (100 cm<sup>3</sup>) y se añadió Pd/C (100 mg). El matraz de reacción se purgó con gas hidrógeno y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el disolvente se eliminó bajo vacío para producir el compuesto del título 5 como un aceite marrón (4.98 g, 98%).

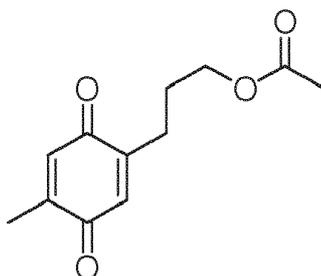
R<sub>f</sub> 0.36 (SiO<sub>2</sub>, Hex 1:1 EtOAc).

- 20 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1.98 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.68 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.82 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 6.66 (1H, s, ArH), 6.70 (1H, s, ArH) ppm.

<sup>13</sup>C RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 14.1, 16.1, 21.0, 26.7, 28.9, 32.3, 55.9, 56.1, 64.3, 112.8, 113.8, 124.9, 127.4, 151.2, 151.4, 171.22.

3-(4-metil-3,6-dioxo-ciclohexa-1,4-dienil)-propil éster del ácido acético 6

25

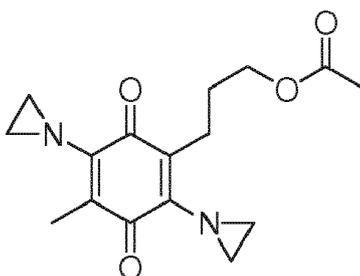


5 A una solución de 5 (1.26 g, 4.99 mmol) en acetonitrilo (15 cm<sup>3</sup>) se añadió nitrato amónico cérico (5.50 g, 9.99 mmol) en agua (10 cm<sup>3</sup>) gota a gota. La mezcla se agitó durante 1 hora antes de extraer los extractos orgánicos con diclorometano (3 x 25 cm<sup>3</sup>), se lavó con salmuera (25 cm<sup>3</sup>), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró bajo vacío para dar el compuesto del título como un aceite marrón 6 (756 mg, 68%).

R<sub>f</sub> 0.69 (SiO<sub>2</sub>, Hex 1:1 EtOAc).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

3-(2,5-bis-aziridin-1-il-4-metil-3,6-dioxo-ciclohexa-1,4-dienil)-propil éster del ácido acético 7



10 Se disolvió quinona 6 (756 mg, 3.40 mmol) en etanol (15 cm<sup>3</sup>), se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota aziridina (0.50 cm<sup>3</sup>, 11.6 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora a 0°C y luego se dejó en la nevera durante 72 h. El disolvente se eliminó bajo vacío. El sólido rojo se trituró con dietil éter y se secó. El sólido rojo se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, Hex 1:1 EtOAc) para producir el compuesto del título 7 en forma de un sólido rojo (98 mg, 9%).

15

R<sub>f</sub> 0.52 (SiO<sub>2</sub>, Hex 1:1 EtOAc).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

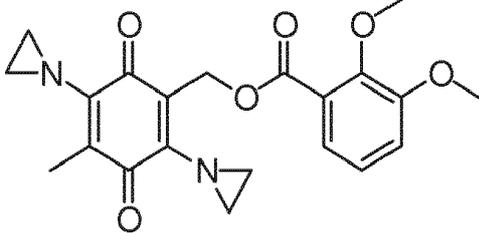
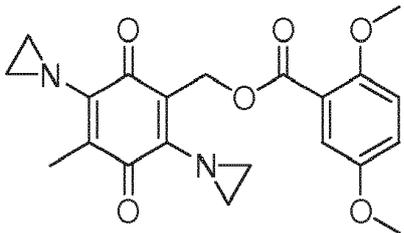
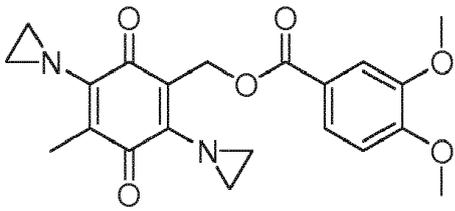
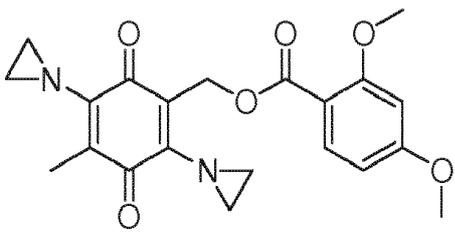
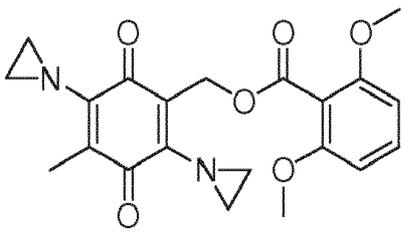
Síntesis de compuestos comparativos

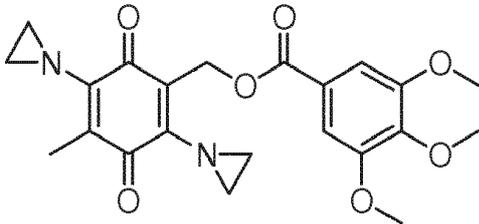
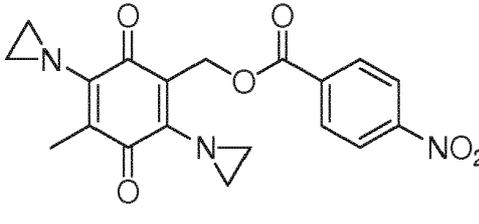
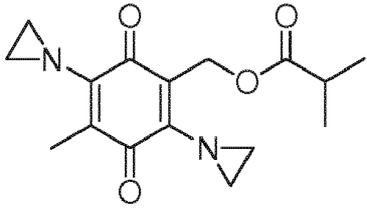
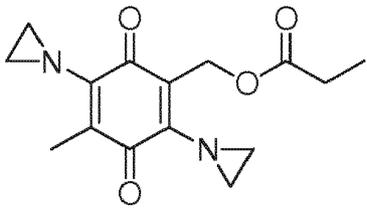
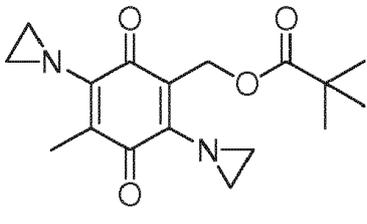
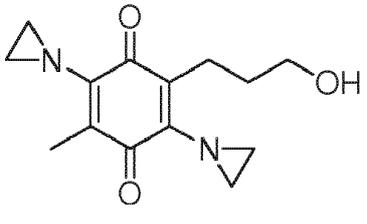
20 RH1, MeDZQ y todos los ésteres se sintetizaron según los protocolos de la técnica anterior (laboratorios KidsScan) y se prepararon como soluciones madre 10 mM en DMSO para el ensayo. La Tabla 1 muestra las estructuras de algunos ésteres y su vida media en regulador Tris además de sus valores IC<sub>50</sub> en las líneas celulares MDA 468 y MDA NQ01.

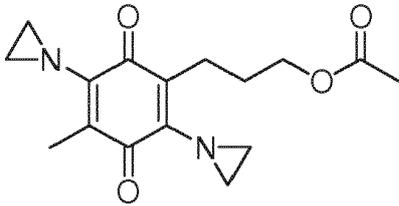
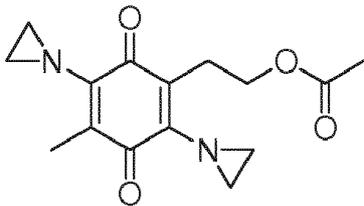
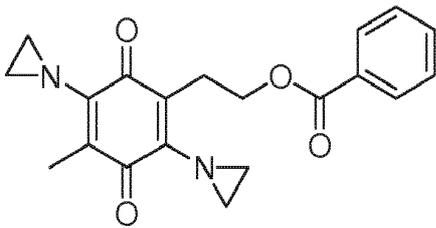
Prueba de estabilidad

25 La estabilidad de los ésteres y sus productos de hidrólisis se midió en solución. (Es 50 μM en regulador Tris (0.1 mol dm<sup>-3</sup>) a pH 7.4). Se tomaron muestras a intervalos de tiempo de hasta 24 horas y se analizaron por HPLC. La longitud de onda de detección fue 330 nm. El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante elución isocrática con MeOH:regulador Tris (0.1 mol dm<sup>-3</sup>, pH 7.4), 30:70, a 1 ml min<sup>-1</sup>. La separación cromatográfica del fármaco se logró usando una columna Hypersil ODS con 250 mm x 4.6 mm I.D.

Tabla 1 - Las estructuras de los ésteres de RH1 y sus valores de vida media.

Compuesto	Ésteres y productos de hidrólisis de éster de RH1. Estructuras químicas	T <sub>1/2</sub> en regulador pH 7.0
4-05		<10 minutos
4-07		<20 minutos
4-09		<30 minutos
4-10		<30 minutos
4-11		<30 minutos

Compuesto	Ésteres y productos de hidrólisis de éster de RH1. Estructuras químicas	T <sub>1/2</sub> en regulador pH 7.0
4-14		<30 minutos
4-20		20 minutos
4-36		<30 minutos
4-38		20 minutos
4-39		<30 minutos
4-61		>24 horas

Compuesto	Ésteres y productos de hidrólisis de éster de RH1. Estructuras químicas	T <sub>1/2</sub> en regulador pH 7.0
4-65 (Es5)		>24 horas
4-70		<60 minutos
4-71		<60 minutos

Prueba de selectividad

5 Los compuestos de la presente invención tales como Es5 y 4-61 muestran una excelente selectividad hacia las células que expresan DT-diaforasa. Se encontró que la selectividad excedía la mostrada por RH1. Los valores IC<sub>50</sub> se midieron utilizando un ensayo MTT.

10 La Tabla 2 muestra un resumen de los valores de IC<sub>50</sub> para numerosos fármacos probados en células MDA483 y NQ01. Los datos demuestran que Es5 muestra una excelente selectividad hacia células que expresan DT-diaforasa en comparación con otros agentes anticancerosos. A modo de comparación, el diferencial MDA468 a NQ01 para Es5 es >80 veces, en comparación con ~5 veces para mitomicina C y >30 veces para RH1. El producto de hidrólisis 4-61 de Es5 también muestra una excelente selectividad, con valores de IC<sub>50</sub> de 0.41 nM en MDA NQ01 y de 16.97 nM en MDA 468, y en consecuencia una relación de mejora de DT diaforasa de 41.

Tabla 2 - El efecto de Es5 (4.65) y otros agentes contra el cáncer en las células MDA468 y NQ01.

Ésteres de RH1	IC <sub>50</sub> en MDA468	IC <sub>50</sub> en NQ01
RH1	4.41nM	120pM
Es5 (4.65)	25nM	230pM
Cisplatino	675nM	570nM

Ésteres de RH1	IC <sub>50</sub> en MDA468	IC <sub>50</sub> en NQ01
Docetaxel	1.15nM	1.88nM
Mitomicina C	50nM	10nM
5-fluorouracilo	7.96µM	12µM
Epirubicina	23.2nM	27.5nM
Metotrexato	45nM	27nM
Cloruro de cobalto	35µM	54µM
Vinblastina	16nM	18.3nM
Arabinósido de citosina (ARA-C)	250nM	240nM

#### Activación de Es5

5 Se investigó la escisión de Es5 por esterasa y extractos celulares y su activación. Es5 es estable en reguladores acuosos, pero se sometió a una hidrólisis lenta en suero ( $t_{1/2} = 100$  min). Los experimentos con esterasa porcina mostraron que rápidamente escindía Es5 a su producto de hidrólisis, un resultado que se repitió cuando se usaron extractos de cerebro porcino. Los extractos celulares de DT-diaforasa que expresan la línea celular MDA468 NQ01 rápidamente escindieron el éster, mientras que un extracto de la línea celular DT-diaforasa nula MDA 468 lo hizo a una tasa mucho más reducida, lo que indica que la activación probablemente sea mayor en células o tumores que expresan DT-diaforasa.

10 Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los ésteres de RH1 eran muy inestables en solución acuosa y se hidrolizaron a RH1 en 30 minutos. Las velocidades fueron tales que la cinética no pudo determinarse por HPLC. Es5 era mucho más estable como se muestra en las tablas de arriba.

15 El perfil de estabilidad de Es5 se midió en regulador Tris (0.1 mol dm<sup>-3</sup>, pH 7.0), medio RPMI (pH 7.0) y suero a temperatura ambiente y mostró la pérdida de Es5, concurrente con una ganancia del alcohol 4.61 en suero en la misma escala de tiempo.

#### Reacción de esterasa de lisado celular

20 Se investigó la degradación de Es5 por esterasas del lisado celular de las dos líneas celulares MDA NQ01 y MDA468. Es5 era inestable en el extracto de línea celular MDA NQ01 y se degradó al alcohol 4.61 que mostró una vida media de aproximadamente 160 minutos a temperatura ambiente. En la línea celular nula DTD MDA468, la degradación de la molécula parental a su alcohol fue a una velocidad apreciablemente menor.

#### Apoptosis

25 Con base en el método descrito en Martin et al. (Journal of Experimental Medicine 182, 1545-556. 1995), se determinó la inducción de la apoptosis causada por los compuestos de la presente invención. La apoptosis, medida por la unión a la Anexina V, mostró que la inducción de muerte celular programada ocurre dentro de las 2 horas en las células que expresan DT-diaforasa, mientras que no se observa muerte en este momento en las células MDA 468 sin DT-diaforasa. Se observa un nivel reducido de apoptosis en esta línea celular después de 4 horas. Esto muestra el efecto diferencial de Es5 en células que expresan y no expresan DT-diaforasa.

Daño en el ADN

5 El daño en el ADN se midió usando el ensayo Comet para investigar el efecto de Es5 sobre la cabeza del cometa y la intensidad de la cola después del tratamiento de MDA468NQ01 y las líneas celulares DT-diaforasa nula MDA468. Estos experimentos mostraron para ambas líneas celulares que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa rupturas en la cadena de ADN, lo que resulta en una mayor acumulación de ADN en la cola en comparación con la cabeza. En la línea celular que expresa DT-diaforasa (NQ01) el tratamiento con Es5 10 nM durante 2 horas aumentó la proporción de ADN en la cabeza en comparación con el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo. Esto demostró que el ADN ha sido reticulado por Es5. En la línea celular deficiente en DT-diaforasa el tratamiento con Es5 no redujo la intensidad de la cola, lo que demuestra que, en ausencia de activación por DT-diaforasa, Es5 no es un agente de reticulación de ADN, siendo este el mecanismo de acción propuesto de Es5. Después de 6 horas de incubación, hubo evidencia de reticulación en la línea celular DT-diaforasa nula. Sin desear estar ligados por ninguna teoría particular, los inventores creen que esto debe surgir por un mecanismo diferente tal como reducciones de 2 x un electrón, en lugar de la reducción de 2 electrones que ocurre con DT-diaforasa.

Comparación de Es5 y RH1

15 La Tabla 3 muestra una comparación de las características de Es5 (4.65) con RH1 y proporciona sus índices de combinación con cisplatino, docetaxel, cloruro de cobalto, epirrubicina, ara-C y mitomicina C. Para comparación, el índice de combinación a IC<sub>50</sub> de MMC y cloruro de cobalto es 0.443 en MDA468 y 0.239 en células NQ01. Como se puede ver en la Tabla 3, la combinación de Es5 y cisplatino demuestra sinergia en ambas líneas celulares, mientras que la combinación de Es5 y cloruro de cobalto demuestra una fuerte sinergia en ambas líneas celulares. Una combinación de Es5 y docetaxel muestra un efecto aditivo con respecto a NQ01, mientras que muestra un efecto moderadamente inhibitorio con respecto a MDA468, a la vez que una combinación de Es5 y mitomicina C muestra un efecto aditivo con respecto a NQ01 y un ligero antagonismo con respecto a MDA468.

Tabla 3 - Una comparación de las características de Es5 y RH1, y sus índices de combinación con algunos otros agentes anticancerosos. T<sub>90</sub> = tiempo necesario para degradar al 90% de la concentración inicial.

Características	RH1	Es5 (4.65)
Solubilidad (acuoso)	500 µg/ml (agua)	150 µg/ml (PBS)
Estabilidad (acuoso)	>7días	>7 días
Solubilidad (orgánico)	>30 mg/ml (DMSO/cloroformo)	9.4 mg/ml (etanol)
Estabilidad (orgánico)	meses	>1 mes
Límites de detección por HPLC (330nm)	<50 pmoles	<50 pmoles
Degradación por esterasa sérica	NA	t <sub>90</sub> 90 min
Degradación por esterasa hepática porcina	NA	t <sub>1/2</sub> 1min
Degradación por extracto de células MDA468	NA	t <sub>1/2</sub> 280 min (19.6 nmoles/h/10 <sup>6</sup> células)
Degradación por extracto de células MDA NQ01	NA	t <sub>1/2</sub> 160 min (11.25 nmoles/h/10 <sup>6</sup> células)
IC <sub>50</sub> MDA468	3.5 nM	20-25 nM

ES 2 662 917 T3

Características	RH1	Es5 (4.65)
IC <sub>50</sub> MDA NQ01	120 pM	230 pM
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con cisplatino en MDA468	0.499 (sinergia)	0.567 (sinergia)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con cisplatino en MDA NQ01	0.672 (sinergia)	0.674 (sinergia)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con docetaxel en células MDA468	0.850 (ligera sinergia))	1.387 (moderadamente inhibidor)
Índice de combinación IC <sub>50</sub> con Docetaxel en células NQ01	0.864(ligera sinergia)	0.964 (aditivo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con cloruro de cobalto en células MDA468	0.170(fuerte sinergia)	0.464 (fuerte sinergia)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con cloruro de cobalto en células NQ01	0.80 (sinergia moderada)	0.54 (fuerte sinergia)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con epirrubicina en células MDA468	4.81 (fuerte antagonismo)	1.49 (antagonismo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con epirrubicina en células NQ01	2.09 (antagonismo)	2.04 (antagonismo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con ARC-C en células MDA468	1.45 (leve antagonismo)	1.2 (leve antagonismo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con ARA-C en células NQ01	1.22 (leve antagonismo)	1.22 (leve antagonismo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con Mitomicina C en células MDA468	0.577 (sinergia)	1.4 (leve antagonismo)
Índice de combinación a IC <sub>50</sub> con mitomicina C en células NQ01	1.2 (leve antagonismo)	0.924 (aditivo)
Estabilidad del pH	t <sub>1/2</sub> = 0.96 días a pH 9.82	t <sub>1/2</sub> > 6 días a pH 9.44
	t <sub>1/2</sub> = 43.52 días a pH 7.33	t <sub>1/2</sub> > 6 días a pH 7.44
	t <sub>1/2</sub> = 4.46 días a pH 5.95	t <sub>1/2</sub> > 6 días a pH 6.2
	t <sub>1/2</sub> = 4.36 días a pH 5.95	t <sub>1/2</sub> > 6 días a pH 5.9

## ES 2 662 917 T3

Características	RH1	Es5 (4.65)
	$t_{1/2} = 0.07$ días a pH 4.16	$t_{1/2} = 2.4$ días a pH 4.35
	$t_{1/2} = 0.07$ días a pH 4.16 (comparación más cercana de AAPS PharmSciTech 2007; 8(1) Artículo 16)	$t_{1/2} = 1$ día a pH 3.9
Estabilidad de la temperatura	4C $t_{90} > 7$ días	4C $t_{90} > 6$ días
	Ambiente $t_{90}$ 3 días	Ambiente $t_{90}$ 4 días
	40C $t_{90}$ 2 días	37C $t_{90}$ 4 días
	55C $t_{1/2}$ 2 días	55C $t_{1/2} < 1$ día

### Eficacia de Es5 *in vivo*

5 La actividad de Es5 (4.65) se evaluó *in vivo* contra 3 líneas celulares de cáncer H460, MDA-MB-468-NQ01 y MDA-MB-468-MOCK utilizando el ensayo de fibra hueca *in vivo* (HFA), con fibras implantadas tanto en sitios intraperitoneales (i.p.) como subcutáneos (s.c.). Es5 y el agente de control doxorubicina se administraron como dosis múltiples mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en los días 3, 4, 5 y 6 a 0.5 mg/kg/día y 2.5 mg/kg/día, respectivamente.

10 Es5 (4.65) demostró una eficacia significativa ( $p < 0.01$ ) en términos de supervivencia celular en comparación con el control no tratado, en todas las 3 líneas celulares donde las fibras fueron implantadas en el sitio i.p., y en H460 donde las fibras se implantaron en el sitio s.c.. Estos resultados fueron similares al agente de control estándar doxorubicina, lo que indica que este compuesto tiene potencial como agente anticancerígeno.

### Material y métodos

Se disolvió Es5 (4.65) en solución salina con la ayuda de algo de agitación con vórtex.

15 Líneas celulares. Se seleccionaron tres líneas de células tumorales humanas para el análisis: NSCLC H460 (de ICT) y dos líneas de carcinoma de mama MDA-MB-468-NQ01 y MDA-MB-468-MOCK (ambas suministradas por Onco-NX). Las células se cultivaron en medio de cultivo celular RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y suero bovino fetal al 10% (todos de Sigma), y se mantuvieron como cultivos en monocapa a 37°C en un entorno de 5% de CO<sub>2</sub> humidificado.

20 Animales. Se usaron ratones desnudos inmunodeficientes Balb/C hembra de 6-8 semanas (Harlan Reino Unido, Blackthorn, Reino Unido). Los ratones se mantuvieron en jaulas ubicadas en gabinetes de aislamiento en una habitación con aire acondicionado con ciclos de luz y oscuridad alternos y regulares. Recibieron la dieta Teklad 2018 (Harlan, Blackthorn, Reino Unido) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo bajo una licencia de proyecto emitida por el Ministerio del Interior del Reino Unido y se siguieron las directrices de UKCCCR.

25 Ensayo de fibra hueca. Las células se cargaron en fibras huecas de PVDF Spectra/Por codificadas por color esterilizadas (HF) (Spectrum Medical Inc, Houston, TX, Estados Unidos). En resumen, las células se recogieron y resuspendieron en un medio de cultivo celular a la densidad celular requerida. Esta preparación se cargó luego en la HF y los extremos se pinzaron y sellaron con calor. Luego se cortó la HF en longitudes de 1.5 cm que se sellaron nuevamente por calor en ambos extremos, y luego se transfirieron a placas de 6 pozos que contenían medio antes de la implantación para los experimentos *in vivo*, o se incubaron a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5% humidificado durante diferentes tiempos variables antes del procesamiento utilizando el ensayo de MTT modificado como se describe a continuación.

30 Para los experimentos *in vivo*, bajo anestesia por inhalación breve (2% de isoflurano), se trasplantó una fibra hueca cargada para cada una de las líneas celulares por vía intraperitoneal o subcutánea en el flanco dorsal de cada ratón

y se permitió que los ratones se recuperaran. Cada grupo consistió en 6 ratones y el día de la implantación se denominó 'día 0'.

Para la evaluación de la respuesta terapéutica de Es5 (4.65), los días 3, 4, 5 y 6 los ratones se trataron con Es5 (4.65) a 0.5 mg/kg/día o doxorubicina a 2.5 mg/kg/día.

- 5 Se sacrificaron los ratones el día 7 posterior a la implantación, se extrajeron las fibras y se analizó la supervivencia celular usando un ensayo de MTT modificado, comparando las absorbancias observadas para los grupos tratados con el correspondiente grupo de control no tratado. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando una prueba t de Student.

#### Resultados

- 10 Las Figuras 1 y 2 muestran los resultados obtenidos para el estudio, con los datos expresados como porcentaje de supervivencia celular en comparación con el control sin tratamiento s.c. o i.p. relativo. La Figura 1 presenta los datos agrupados para cada línea celular, mientras que en la Figura 2 esto se presenta para cada tratamiento.

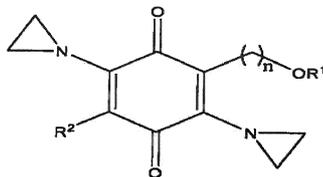
- 15 El Es5 demostró una eficacia significativa ( $p < 0.01$ ) en términos de supervivencia celular en comparación con el control no tratado en las 3 líneas celulares en las que las fibras se implantaron en el sitio i.p., y en H460 donde las fibras se implantaron en el sitio s.c.. Estos resultados fueron similares al agente de control estándar doxorubicina, aunque este agente no demostró una eficacia significativa contra ninguna de las líneas celulares en el sitio s.c..

Es5 también demostró una eficacia mejorada en la expresión de NQ01 en comparación con la línea celular Mock MDA-MB-468, mientras que se observó poca diferencia para la doxorubicina.

Los documentos divulgados aquí están expresamente incorporados como referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula I:



5

en donde:

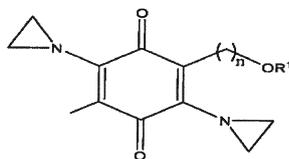
$n = 3, 4, 5, 6$  o  $7$ ;

$R^1$  es hidrógeno, etanoilo, propanoilo, butanoilo o benzoilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo  $C_{1-10}$ , alcoxi  $C_{1-10}$ , hidroxilo, halógeno, nitro o amino; y

10  $R^2$  es metilo, etilo o fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo  $C_{1-10}$ , alcoxi  $C_{1-10}$ , hidroxilo, halógeno, nitro o amino;

o una sal y/o solvato del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1 que está representado por la Fórmula Ia:



15

En donde:

$n=3$  o  $4$ ; y

$R^1$  es hidrógeno, etanoilo, propanoilo o butanoilo; y

20 sales y/o solvatos de los mismos.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que  $n = 3$ .

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que  $R^1$  es hidrógeno o etanoilo.

25 5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es el 3-(2,5-bis-aziridin-1-il-4-metil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-propil éster del ácido acético o 2,5-Bisaziridin-1-il-3-(3-hidroxi-propil)-6-metil-1,4-benzoquinona, o una sal y/o solvato de la misma.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

30 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el agente terapéutico adicional es para uso en el tratamiento del cáncer.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que el agente terapéutico adicional es

- a) seleccionado de cisplatino, docetaxel y mitomicina C,
  - b) cisplatino, o
  - c) docetaxel o mitomicina C.
- 5 10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para uso en un método de terapia.
11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para uso en un método para tratar el cáncer.
12. El compuesto o composición para uso en un método para tratar cáncer de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las células del cáncer sobreexpresan DT-diaforasa.
- 10 13. El compuesto o composición para uso en un método para tratar el cáncer de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde el compuesto experimenta una reducción enzimática por DT-diaforasa para producir hidroxiquinona.
- 15 14. El compuesto o composición para uso en un método para tratar cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el cáncer es de cerebro, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata o cáncer de mama.
- 15 15. El compuesto o composición para uso en un método de tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el método comprende obtener una muestra de células cancerosas de un paciente, determinar si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa y, si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa, tratar al paciente con un compuesto representado por la Fórmula I.
- 20 16. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en un método para tratar el cáncer, en el que el método comprende el tratamiento con un agente terapéutico adicional seleccionado de cisplatino, docetaxel y mitomicina C.
17. El compuesto para uso en el método para tratar el cáncer de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el agente terapéutico adicional es
- 25 a) cisplatino, o
- b) docetaxel o mitomicina C.
18. El compuesto en un método para tratar el cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en donde las células de cáncer sobreexpresan DT-diaforasa.
- 30 19. El compuesto para uso en un método para tratar cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el compuesto experimenta una reducción enzimática por DT-diaforasa para producir hidroxiquinona.
20. El compuesto para uso en un método para tratar cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde el cáncer es de cerebro, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata o cáncer de mama.
- 35 21. El compuesto para uso en un método para el tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde el método comprende obtener una muestra de células cancerosas de un paciente, determinar si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa y, si las células cancerosas sobreexpresan DT-diaforasa, tratar al paciente con un compuesto representado por la Fórmula I y el agente terapéutico adicional.

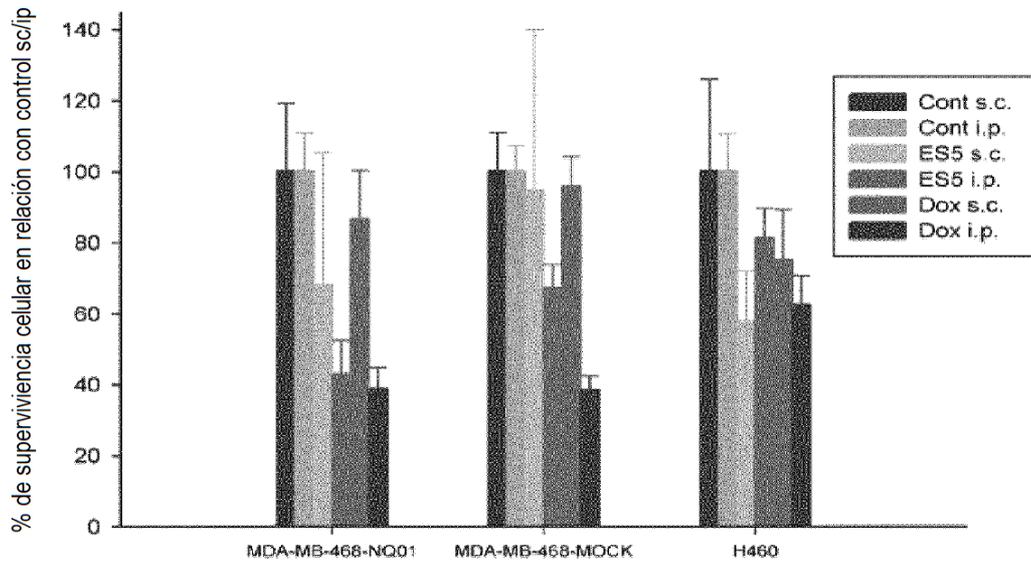


FIGURA 1

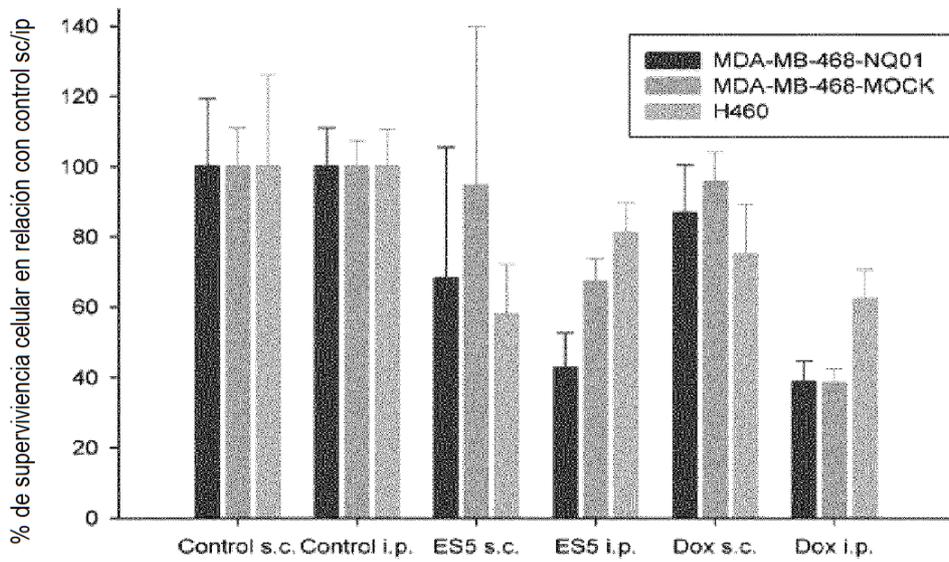


FIGURA 2