

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 219**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6558 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

C07F 9/655 (2006.01)

C07F 9/6584 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012 E 16150494 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3031812**

54 Título: **Compuestos químicos**

30 Prioridad:

01.03.2011 GB 201103582

01.04.2011 GB 201105660

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

16.10.2018

73 Titular/es:

NUCANA PLC (100.0%)

77-78 Cannon Street

London EC4N 6AF, GB

72 Inventor/es:

MCGUIGAN, CHRISTOPHER;

BALZARINI, JAN;

SLUSARCYZK, MAGDALENA;

GONCZY, BLANKA y

MURZIANI, PAOLA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 686 219 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 químicos

5 La presente invención se relaciona con compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer.

10 En 1957, se descubrió la actividad antitumoral de 5-Fluorouracilo (5FU). Más de cincuenta años desde que se sintetizó por primera vez, el 5FU permanece ampliamente usado en el tratamiento de tumores sólidos que incluyen de mamas, del sistema gastrointestinal, de cabeza, de cuello y ovarios y particularmente de cáncer colorrectal, ya que se aprobó por la FDA en 1962. El fluoropirimidina 5-fluorouracilo (5FU) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) se usan en combinación con ácido fólico como tratamiento estándar para una variedad de carcinomas, como de estómago, de colon y mamas. Además, una combinación de 5FU con leucovorin (LV) se considera como quimioterapia estándar para cáncer de colon. El fármaco 5FU se administra usualmente mediante bolo intravenoso o mediante infusión continua.

15 La actividad antitumoral de 5FU es comparable con la de su análogo 5-FdUrd, que actúa parcialmente como profármaco de 5FU. 5-FdUrd se aprobó por la FDA en 1970, y se ha usado extensivamente para el tratamiento clínico de carcinoma de ovarios, de mamas y del tracto gastrointestinal. Además, debido a la extracción hepática extensiva, 5-FdUrd es un fármaco útil para quimioterapia arterial hepática de metástasis del hígado, por consiguiente, se metaboliza más eficientemente por el hígado que 5FU.

20 Sin embargo, existe un problema en que la actividad tanto del agente 5FU como 5-FdUrd puede deteriorarse por el desarrollo de resistencia en células tumorales. El tratamiento del cáncer con 5FU se ha encontrado además que causa efectos secundarios neurotóxicos y cardiotoxicos. La toxicidad además se deriva de la falta de selectividad de 5FU hacia los tumores.

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos derivados de 5-fluoro-2'-desoxiuridina que muestren una mejor actividad y/o reducida toxicidad en su tratamiento del cáncer, en comparación con las que se muestran por 5-fluoracil o 5-fluoro-2'-desoxiuridina *per se*.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar compuestos derivados de 5-fluoro-2'-desoxiuridina que muestren un bajo nivel de resistencia en células tumorales, particularmente una resistencia en células tumorales que sea menor que la que se muestra por 5FU o por 5-FdUrd.

35 El documento WO 2005/012327A2 se relaciona con derivados de fosforamidato de nucleótidos y su uso en el tratamiento del cáncer.

40 El documento WO 99/37753A1 se relaciona con un método para la identificación de agentes terapéuticos potenciales mediante el contacto de una célula objetivo con un agente terapéutico candidato que sea un sustrato selectivo para una enzima intracelular, endógena en la célula que se potencia en su expresión, como resultado de la selección mediante terapia biológica o quimioterapia. Además, se relaciona con los métodos y ejemplos de moléculas para aniquilar de manera selectiva una célula patológica por contacto de la célula con un profármaco que sea un sustrato selectivo para la enzima intracelular, endógena. El profármaco se convierte posteriormente en una toxina celular.

45 De acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-isoleucinil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(pentoxi-L-metioninil)]fosfato
 50 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(hexoxi-L-alaninil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-leucinil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-isoleucinil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 55 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-metioninil)]fosfato
 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi- α,α -dimetilglicina)]fosfato

60 o un derivado farmacéuticamente aceptable de estos, en donde dicho derivado farmacéuticamente aceptable es cualquier sal, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptables.

65 Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención muestran actividad que los hace útiles en la profilaxis o tratamiento del cáncer en homo sapiens. Particularmente, los presentes compuestos exhiben propiedades beneficiosas que indican su capacidad para tratar el cáncer en pacientes, en tanto muestran resistencia reducida en células tumorales. Notablemente, los compuestos de la presente invención pueden mostrar una citoactividad comparable con o mejor que la de 5-fluoracil, pero con una resistencia que es comparable con o menor que la de 5-fluoracil y la de 5-fluoro-2'-desoxiuridina.

5 Por "resistencia" en la presente solicitud se entiende una respuesta baja o disminuida a la terapia. La resistencia puede ser innata o adquirida. Una resistencia innata es un grado de reacción reducido en relación con otros especímenes o pacientes. Una resistencia adquirida es una efectividad reducida con el transcurso del tiempo en un paciente dado, sea o no adquirida en relación con la terapia que comprende la administración al paciente de un régimen terapéutico para tratar el cáncer, por ejemplo, un régimen terapéutico que comprende 5FU y/o 5-FdUrd. Cada resistencia innata y resistencia adquirida pueden corresponder a la regulación por disminución o baja actividad de proteínas transportadoras, que incluyen proteínas transportadoras de nucleósidos, o enzimas anabólicas necesarias o la regulación por aumento de enzimas catabólicas.

10 Aunque el solicitante no desea estar ligado a teoría alguna, se postula, como se discutirá adicionalmente más abajo, que las causas de resistencia en células tumorales a la actividad de 5FU y/o de 5-FdUrd podrían ser: a) delección de quinasa activante como timidina quinasa (TK), una enzima clave requerida para la etapa inicial de fosforilación de 5-FdUrd a 5-FdUMP; b) superproducción de timidilato sintasa (TS); y/o c) transporte deficiente dentro de las células objetivo.

15 Sorprendentemente ahora se ha encontrado que los compuestos de la presente invención pueden mostrar actividad citostática significativa en células con nivel reducido de proteínas transportadoras de nucleósidos y/o en células deficientes de quinasa de nucleósidos y/o en células infectadas con micoplasmas.

20 La propiedad beneficiosa de los compuestos de la presente invención para retener marcada actividad citostática en células deficientes de quinasa de nucleósidos puede conferir *in vivo* una ventaja clínica en entornos celulares carentes de quinasa de nucleósidos o que tienen niveles disminuidos de quinasa y así incapaces de activar eficientemente el 5-FdUrd.

25 Las células infectadas con micoplasmas reducen en gran medida la actividad de nucleósidos tal como el 5-FdUrd debido, se presume, a la superproducción de timidilato sintasa (TS). El uso propuesto actualmente de los presentes compuestos en células infectadas con micoplasmas por tanto, se postula, se deriva de la propiedad beneficiosa de los presentes compuestos para actuar adicionalmente como inhibidores de TS y así permitir que los presentes compuestos retengan su actividad citostática en células infectadas con micoplasmas. Los profármacos que comprenden los compuestos de la presente invención, debido a su naturaleza lipofílica pueden captarse por las células objetivo en al menos una vía parcialmente independiente del portador transportador de nucleósidos, y así, pueden evadir mecanismos de resistencia potenciales debido a niveles reducidos de portadores transportadores de nucleósidos o nucleobases en la membrana de células objetivo.

35 Adicionalmente, los profármacos que comprenden los compuestos de la presente invención son sorprendentemente insensibles a la acción de la enzima catabólica Timidina Fosforilasa (TP) que frecuentemente se regula por disminución en tumores, y así, los profármacos serían más independientes de la presencia de esta enzima catabólica que 5-FdUrd.

40 Se ha observado que la infección por micoplasmas de las células puede reducir en gran medida la actividad de nucleósidos, que incluyen el 5-FdUrd. La administración de un inhibidor de TP restaura la actividad citostática de 5-FdUrd en cultivos de células infectadas con micoplasmas, lo que proporciona evidencia de la función deteriorante de TP en la actividad citostática final de 5-FdUrd. Esto puede ser una limitación en pacientes que están infectados con micoplasmas. A diferencia de 5-FdUrd, los profármacos de 5-FdUrd de la presente invención pueden retener alta actividad en estas células infectadas con micoplasmas.

45 Los presentes compuestos tienen así el potencial para superar muchas de las limitaciones de 5-FU y 5-FdUrd.

50 5-Fluorouracil (5FU) es uno de los primeros ejemplos de un fármaco anticancerígeno. El diseño de 5-FU se basó en la información bioquímica disponible: un átomo de flúor y un átomo de hidrógeno tienen un tamaño similar, sin embargo, un enlace carbono-flúor es mucho más fuerte que un enlace carbono-hidrógeno. La timidilato sintasa actúa mediante sustitución del hidrógeno 5 de desoxiuridina monofosfato con un grupo metilo obtenido a partir de metilen tetrahidrofolato para hacer timidilato. 5FU ejerce su efecto citotóxico a través de tres rutas diferentes. La nucleobase de 5FU y el desoxirribonucleósido de 5-FdUrd entran a las células a través de sistemas de transporte facilitado de nucleósidos. Uno de los mecanismos de acción de estos agentes es la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS). La nucleobase de 5FU se convierte en el desoxinucleósido de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) mediante la timidina fosforilasa. La fosforilación subsecuente del desoxinucleósido de 5-FdUrd mediante timidina quinasa resulta en la formación del nucleótido citotóxico 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (5-FdUMP). En presencia del folato reducido, 5,10-metilen-tetrahidrofolato (mTHF), el nucleótido (5-FdUMP) inhibe la timidilato sintasa (TS) debido a la incapacidad de la enzima para eliminar el átomo de flúor-5. Así, el primer y más importante mecanismo de acción de 5FU y FDUR es la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS). La timidilato sintasa (TS) tiene dos sustratos (dUMP y mTHF), los cuales se unen en el sitio catalítico para permitir la síntesis de dTMP. 5-FdUMP forma un complejo ternario covalente con la timidilato sintasa (TS), lo que inhibe la actividad de esta enzima y conduce al agotamiento de desoxitimidina trifosfato, necesario para la síntesis de ADN. Alternativamente, (5-FdUMP) se sintetiza después de la conversión de 5FU en 5-FUMP por OPRT, en fluorouridina difosfato (FUDP), fluorodesoxiuridina difosfato (5-FdUDP) por la ribonucleótido reductasa (RR) y finalmente en 5'-FdUMP. Se ha observado que después de la exposición terapéutica a 5FU o 5-FdUrd, las células desarrollan resistencia a estos agentes quimioterapéuticos. La superexpresión de la timidilato sintasa (TS) reduce el efecto terapéutico

del fármaco inhibitorio TS lo que conduce a resistencia. Se observó que algunos individuos son más resistentes a la terapia dirigida con TS que otros. En segundo lugar, el desoxinucleósido 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) puede convertirse en su forma trifosfato 5-FdUTP la cual a su vez puede incorporarse en el ADN lo que causa daño celular. En tercer lugar, 5FU puede inhibir además la síntesis de ARN mediante su conversión en FUMP por OPRT y posteriormente, en dos etapas, en fluorouridina trifosfato (FUTP) que se incorpora en el ARN. Esto se presume sea otra acción potencial de 5FU.

Así la molécula 5FU no resulta en un fármaco inhibitorio óptimo de TS porque se convierte de manera ineficiente en 5-FdUMP, debido a varias etapas metabólicas requeridas para la activación metabólica de 5FU. Puede ocurrir resistencia adicional si la célula produce cantidades en exceso de dUMP que compita con el fármaco por el sitio activo.

5-FdUrd es un sustrato relativamente bueno para la timidina quinasa, que lo convierte directamente en 5-FdUMP. *Los estudios in vitro*, en varias líneas celulares de cáncer han demostrado que 5-FdURd es aproximadamente 5000 veces más potente como inhibidor del crecimiento celular que 5FU. Además, el profármaco 5-FdURd no muestra significativa conversión en metabolitos de ribonucleótidos en concentraciones citotóxicas. *Los estudios in vivo* mostraron que una cantidad significativa de 5-FdUrd se degrada en sus 5FU de bases relativas por la timidina fosforilasa, enzima para la cual 5-FdUrd muestra una buena afinidad. Esta escisión fosforolítica rápida de 5-FdUrd en 5FU *in vitro* e *in vivo* representa un obstáculo trascendental en el suministro del 5-FdUrd intacto a las células para mejor acción citotóxica. Adicionalmente, la degradación de 5-FdUrd en homogenados de intestinos de ratas y en humanos, después de la administración oral, sugiere que 5-FdUrd podría absorberse escasamente como 5-FdUrd intacto.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el compuesto de la presente invención se proporciona para usar en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer en homo sapiens. Adecuadamente, el cáncer se selecciona del grupo que comprende leucemia, cáncer pancreático, de próstata, pulmón, mama y de cuello uterino.

Particularmente, el compuesto de la presente invención es para usar en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer en un paciente que ha desarrollado o tiene el potencial para desarrollar resistencia en células tumorales con respecto a la actividad de 5-fluoracilo o 5-fluoro-2'-desoxiuridina en la profilaxis o tratamiento de cáncer.

Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede usarse en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer en un paciente con células con un reducido nivel de proteínas transportadoras de nucleósidos y/o con células deficientes de la nucleósido quinasa de y/o con células infectadas con micoplasmas, particularmente donde el cáncer es leucemia. El compuesto de la presente invención puede ser más bien o lo mismo para usar en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer en un paciente que tiene células con nivel elevado de timidilato sintasa (TS).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de profilaxis o tratamiento de cáncer que comprende administrar a un paciente de homo sapiens que necesita de dicho tratamiento una dosis efectiva de un compuesto de la presente invención. Adecuadamente, el cáncer se selecciona del grupo que comprende leucemia, cáncer pancreático, de próstata, pulmón, mama y de cuello uterino.

Particularmente, la presente invención comprende un método para tratar un paciente que ha desarrollado o tiene el potencial para desarrollar resistencia en células tumorales con respecto a la actividad de 5-fluoracilo o 5-fluoro-2'-desoxiuridina en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer. Por ejemplo, el método de la presente invención puede comprender el tratamiento a un paciente con células con un reducido nivel de proteínas transportadoras de nucleósidos y/o con células deficientes de la nucleósido quinasa y/o con células infectadas con micoplasmas, particularmente donde el cáncer es leucemia. El método de la presente invención para tratar a un paciente puede ser más bien o lo mismo para tratar a un paciente que tiene células con un nivel elevado de timidilato sintasa (TS).

"Tumor" o "célula tumoral" como se usa en la presente solicitud, a menos que se indique de otra manera, se refiere tanto a tumores sólidos como cánceres tal como leucemia.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse para tratar a un paciente con cáncer lo mismo *de novo* o junto con otra terapia contra el cáncer. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden usarse en un régimen de tratamiento contra el cáncer junto con otros fármacos anticancerígenos, tal como 5-FU y/o 5-FdUrd lo mismo, con o sin leucovorin (LV), y/u otros fármacos anticancerígenos. Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden usarse cuando un paciente ha fallado en responder a otros fármacos anticancerígenos, tal como por ejemplo 5FU y/o 5-FdUrd ya sea con o sin leucovorin (LV), o cuando el paciente ha mostrado resistencia a otros fármacos anticancerígenos, tal como por ejemplo 5-FU y/o 5-FdUrd ya sea con o sin leucovorin (LV).

Los compuestos de la presente invención cuando Ar es 1-naftilo, sea sustituido o no sustituido, son particularmente adecuados para usar en los usos y métodos anteriores de la presente invención, particularmente en un paciente que ha desarrollado, o que tiene el potencial para desarrollar, resistencia en células tumorales, tal como, por ejemplo, un paciente con células con un reducido nivel de células transportadoras de nucleósidos y/o con células deficientes de quinasas y/o con células infectadas con micoplasmas y/o un paciente que tiene células con elevado nivel de timidilato sintasa (TS).

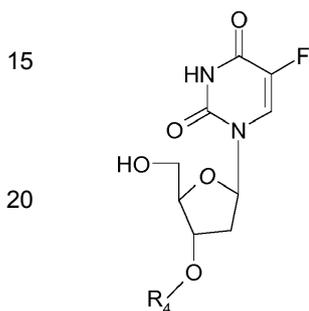
65

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprenden un compuesto de la presente invención en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparar una composición farmacéutica que comprende la etapa de combinar un compuesto de la presente invención con un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.

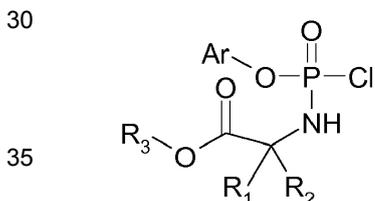
10 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de la presente invención que comprende reaccionar un compuesto de la fórmula (II)

II



con un compuesto de la Fórmula III:

III



40 en donde Ar, R₃, R₄, R₁ y R₂ tienen los significados requeridos para formar los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1.

45 Por "un derivado farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier sal, éster, sal de dicho éster, hidrato, solvato o forma cristalina o metabolito o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable que, tras la administración a un receptor, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la invención.

50 El tratamiento convencional del cáncer mediante el uso de compuestos quimioterapéuticos se basa mayormente en el uso de análogos de nucleósidos. Estas moléculas se diseñan para imitar los nucleósidos naturales de pirimidina y purina. Después de la captación por la célula, se fosforilan mediante enzimas celulares tales como (desoxi)citidina quinasa (dCK), timidina quinasa (TK) y/o nucleósidos/nucleótidos quinasa. Estos antimetabolitos pueden interferir posteriormente con la síntesis *de novo* de precursores de ADN/ARN para finalmente inhibir la síntesis de ADN/ARN lo que resulta en la actividad citotóxica/citostática (Hatse y otros, 1999; Galmarini y otros, 2002).

55 Los antimetabolitos basados en fluoropirimidina tales como fluorouracilo (5-FU), capecitabina y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd) se usan principalmente en el tratamiento del carcinoma de colon, mama y ovario (de Bruin y otros, 2006; Ishikawa y otros, 1998; Walko y otros, 2005). Intracelularmente, estos fármacos se metabolizan en 5-FdUMP, el cual forma un complejo inhibidor estable con timidilato sintasa (TS) y el cosustrato 5,10-metilentetrahidofolato reducido, lo que bloquea de ese modo la unión del sustrato normal dUMP a la enzima (Beck y otros, 1994; Tanaka y otros, 2000; Longley y otros, 2003). TS es la enzima responsable de la conversión de dUMP en TMP y, por lo tanto, es indispensable para la proliferación celular, que la hace un objetivo interesante para el diseño de fármacos. Entre las fluoropirimidinas mencionadas anteriormente, 5-FdUrd requiere solo una conversión metabólica, una fosforilación catalizada por TK para generar 5-FdUMP (Longley y otros, 2003). Esta fosforilación obligatoria frecuentemente es la etapa limitante de la velocidad en el metabolismo de muchos fármacos anticancerígenos (que incluyen 5-FdUrd), y por lo tanto es aún uno de los factores limitantes para el uso terapéutico de los análogos de nucleósidos. Por lo tanto, se han investigado diferentes estrategias para mejorar la eficacia antitumoral de los análogos de nucleósidos (Galmarini y otros, 2002).

La naturaleza cargada de los monofosfatos de nucleósidos en condiciones fisiológicas resulta en una penetración pobre, si la hay, a través de la membrana celular (Mehellou y *otros*, 2009). Por lo tanto, la administración directa de moléculas fosforiladas para eludir la primera etapa de fosforilación tiene poca ventaja terapéutica. Por tanto, se han explorado diferentes estrategias para eludir la fosforilación limitante de la velocidad mediante el uso de varios tipos de profármacos de nucleósido 5'-monofosfato para una administración de fármacos más eficiente (Hecker & Erion, 2008). La administración de profármacos de nucleótido fosforamidatos lipofílicos (ProTides) ha demostrado ser exitosa para varias moléculas con actividad antiviral/cancerígena (Harris y *otros*, 2001; Congiatu y *otros*, 2006; McGuigan y *otros*, 2010). Mediante enmascaramiento de las cargas del motivo de fosfato, puede lograrse una buena difusión pasiva de la membrana de los profármacos después de lo cual el profármaco se convierte rápidamente intracelularmente en el nucleósido monofosfato por escisión enzimática (Mehellou y *otros*, 2009).

Los micoplasmas son los organismos autorreplicantes más pequeños en la tierra y se caracterizan por la falta de una pared celular y un genoma fuertemente reducido (600-1,200 kb). Muchas de estas bacterias tienen un estilo de vida parasitario y residen en el cuerpo humano lo que causa infecciones asintomáticas (Razin y *otros*, 1998). Se demostró que estos procariotas tienden a colonizar preferentemente el tejido tumoral: Zhang y *otros*. (2001) informaron que 39.7-56 % de los cánceres humanos, el gástrico, de colon, esofágico, pulmonar y de mamas están infectados con micoplasmas en comparación con 20.9-30 % en el tejido no tumorigénico. Pehlivan y *otros*. (2005) encontraron >80 % de las muestras de tejido renal de pacientes con carcinoma de células renales estaban infectadas con micoplasmas en comparación con 14 % en muestras de control de tejido. Chan y *otros* (1996) informaron una tasa de infección de 59 % en tejidos de cáncer de ovario y otros estudios informan además una alta tasa de infección por micoplasma en tejidos gástricos (Sasaki y *otros*, 1995, Yang y *otros*, 2010) y de condiloma de cuello uterino (Kidder y *otros*, 1998). Debido a su conjunto reducido de genes, los micoplasmas carecen de la ruta para la síntesis *de novo* de pirimidina y purina y, por lo tanto, expresan una amplia serie de enzimas que metabolizan nucleósidos/nucleótidos, tales como timidina fosforilasa (TP), desoxicitidina desaminasa, etc. (Razin, 1978; Charron & Langelier, 1981; Neale y *otros*, 1983; Tham y *otros*, 1993). Ya en 1985 se observó que las enzimas codificadas por micoplasmas (por ejemplo, TP), presentes en cultivos de células contaminadas, conducen a una reducida incorporación de dTTP en los linfocitos (Sinigaglia & Talmadge, 1985). Recientemente, se ha demostrado que estas enzimas, particularmente la timidina fosforilasa codificada por micoplasma, además interfieren con la actividad citostática de varios agentes quimioterapéuticos, lo que incluye la 5-trifluorotimidina, *in vitro* (Bronckaers y *otros*, 2008; Jetté y *otros*, 2008; Liekens y *otros*, 2009). Por lo tanto, se ha formulado la hipótesis de que la eliminación de micoplasmas por antibióticos o la supresión de enzimas codificadas por micoplasmas en tejido tumoral humano puede optimizar el tratamiento de pacientes con cáncer que usan antimetabolitos de purina y pirimidina (Liekens y *otros*, 2009).

La presente invención se deriva del desarrollo y evaluación de profármacos de fosforamidato independiente de TK de 5-FdUrd y proporciona compuestos que pueden además ser insensibles a la inactivación dependiente de TP de su análogo de nucleósido libre. Los compuestos de la presente invención pueden proporcionar así profármacos análogos de nucleósidos insensibles a micoplasmas que pueden optimizar el tratamiento de pacientes con cáncer con el uso de un antimetabolito de pirimidina. De entre los profármacos de fosforamidato sintetizados actualmente de 5-FdUrd, se eligió CPF-373 (identificado más abajo y mencionado anteriormente como un compuesto particularmente adecuado de la invención con R₄ como H) para promover estudios en profundidad. Esta molécula contiene un grupo naftilo y bencilalanililo para enmascarar el 5'-fosfato cargado en 5-FdUMP.

Se han descrito varios mecanismos de resistencia de las células tumorales hacia las fluoropirimidinas como 5FU, 5-FdUrd y trifluorotimidina (TFT), que incluyen una actividad disminuida de las enzimas activadoras de fármacos cruciales (por ejemplo, TK y orotato fosforibosiltransferas), una actividad incrementada de enzimas inactivadoras de fármacos (es decir, la timidina fosforilasa) y/o una regulación por aumento de las enzimas objetivo (por ejemplo, TS) (Agarwal y *otros*, 1999; Murakami y *otros*, 2000; Kosaka y *otros*, 2004). Además, se informó que los altos niveles de TP encontrados en varios tipos de tejido canceroso son predictivos de un pronóstico menos favorable después del tratamiento con fluoropirimidinas (Kamoshida y *otros*, 2005; Ciaparrone y *otros*, 2006; Koopman y *otros*, 2009), aunque otros estudios no han confirmado estos hallazgos (Ciccolini y *otros*, 2004; Koopman y *otros*, 2009). La presente invención se deriva del desarrollo de un profármaco para 5-FdUrd, para eludir posibles mecanismos de resistencia y susceptibilidad a la degradación por enzimas catabólicas, presentes en el microambiente tumoral.

Los compuestos que ejemplifican la presente invención, por ejemplo, CPF-373, son profármacos de fosforamidato de 5-FdUrd y se describen en la presente descripción y pueden cumplir estos objetivos. Después de la captación en las células tumorales, CPF-373, por ejemplo, genera 5-FdUMP intracelularmente después de la escisión enzimática. Los estudios de estabilidad y los estudios enzimáticos/séricos mediante tecnología de ³¹P RMN revelaron que el profármaco CPF-373, por ejemplo, es completamente estable en condiciones ácidas y alcalinas, pero sujeto a hidrólisis en presencia de suero o carboxipeptidasa Y, lo que resulta en la formación de derivado de nucleósido 5'-fosforamidato. Mientras que TK es una enzima clave en la activación de 5-FdUrd, se encontró que CPF-373, por ejemplo, fue mucho menos dependiente de TK para ejercer su acción citostática tanto en cultivos de células de murino (L1210) como de humano (CEM). Debido a la naturaleza lipofílica de ProTides, estas moléculas pueden suministrar nucleósido-monofosfatos directamente en la célula tumoral intacta después de la conversión en su derivado de nucleósido fosforamidato por enzimas tales como carboxiesterasas o carboxipeptidasas (es decir, carboxipeptidasa Y), lo que elimina la necesidad de una fosforilación inicial por nucleósido quinasas específicas tal como TK. Con respecto a esto, CPF-373, por ejemplo, puede ser una herramienta adecuada para el tratamiento de células tumorales con una actividad de TK modificada (ya sea adquirida o inherente). Además, dado que la expresión de TK depende de la fase S, se espera que CPF-373, por ejemplo, pueda

además suministrar eficientemente 5-FdUMP en células tumorales que no estén en la fase S de su ciclo de replicación. Los estudios de actividad de TS revelaron que CPF-373, por ejemplo, fue capaz de inhibir a TS en líneas celulares tumorales tanto de tipo silvestre como deficientes de TK, lo que señaló nuevamente hacia un suministro intracelular eficiente del 5'-monofosfato de 5-FdUrd, y su independencia implícita de la TK celular para la activación metabólica.

5 Es poco probable que los compuestos de la presente invención se inactiven por enzimas catabólicas implicadas en el metabolismo de los nucleósidos. De hecho, mientras que 5-FdUrd es altamente susceptible a la hidrólisis enzimática por TP lo que resulta en la formación de 5-FU y 2-desoxirribosa-1-fosfato, su profármaco, por ejemplo CPF-373, no es un sustrato para TP procariótica (es decir, de *E. coli*) o de mamíferos (es decir, de eritrocitos humanos). Además, la uridina fosforilasa no reconoce, por ejemplo, a CPF-373 como sustrato, mientras que 5-FdUrd se hidroliza (pobremente, pero de forma medible) por esta enzima. Varios estudios revelaron que muchas células tumorales tienen niveles elevados de TP, que además actúa como un factor angiogénico (Koopman y otros, 2009; Bronckaers y otros, 2009). Además, hay varios informes sobre la colonización preferencial de tejido tumoral por micoplasmas (Sasaki y otros, 1995; Chan y otros, 1996; Huang y otros, 2001; Pehlivan y otros, 2005) que interfieren con la actividad citostática de varios agentes quimioterapéuticos convencionales *in vitro* a través de su TP codificada (Bronckaers y otros, 2008; Jetté y otros, 2008; Liekens y otros, 2009). Las presentes observaciones de que 5-FdUrd, pero no, por ejemplo, CPF-373, pierde notablemente la actividad citostática cuando las células tumorales (que expresan TP) están infectadas por micoplasmas, están totalmente en concordancia con estas observaciones. Por lo tanto, la administración de un profármaco anticancerígeno insensible a TP tal como CPF-373, probado como químicamente estable en condiciones de pH extremas, puede mejorar aún más la quimioterapia contra el cáncer. En conclusión, ProTides, como CPF-373, proporciona un nuevo enfoque interesante para el desarrollo de fármacos anticancerígenos más resilientes. Por ejemplo, CPF-373 puede tener al menos varias ventajas sobre su fármaco original 5-FdUrd: ejerce su actividad citostática independiente de las TK y es resistente a la degradación metabólica por TP, una enzima que frecuentemente se regula por aumento en tumores o puede expresarse externamente por infección por micoplasmas del tejido tumoral.

25 El compuesto que tiene la Fórmula I o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un paciente homo sapiens mediante cualquier medio adecuado.

30 Los medicamentos empleados en la presente invención se pueden administrar por ruta oral o parenteral, incluyendo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (que incluyen bucal y sublingual).

35 Para la administración oral, los compuestos de la invención generalmente se proporcionarán en forma de comprimidos o cápsulas, como un polvo o gránulos, o como una solución o suspensión acuosa.

40 Los comprimidos para uso oral pueden incluir el ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes desagregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes desagregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

45 Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

50 Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende por ejemplo manteca de cacao o un salicilato.

55 Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, aerosoles o fórmulas que contienen, además del ingrediente activo, los portadores que se conocen en la técnica como apropiados.

60 Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, los compuestos de la invención generalmente se proporcionarán en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas de acuerdo con la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y de n-propilo.

Los compuestos de la invención pueden presentarse además como formulaciones liposómicas.

65 En general, una dosis adecuada estará en el intervalo de 0.1 a 300 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Una dosis más baja preferida es 0.5 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, una dosis más baja más

preferida es 6 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, una dosis más baja aún más preferida es 10 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día. Una dosis adecuada está preferentemente en el intervalo de 6 a 150 mg por kilogramo de peso corporal por día, y con la máxima preferencia en el en el intervalo de 15 a 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. La dosis deseada se presenta preferentemente como dos, tres, cuatro, cinco o seis o más subdosis administradas en intervalos apropiados durante todo el día. Estas subdosis pueden administrarse en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, que contiene de 10 a 1500 mg, preferentemente de 20 a 1000 mg, y con la máxima preferencia de 50 a 700 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Los ejemplos de la presente invención se describirán ahora, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos acompañantes, que comprenden las Figuras 1 a 11, en donde:

La Figura 1 muestra la fórmula estructural de 5-FdUrd y su profármaco CPF-373 de fosforamidoato;

La Figura 2 muestra el efecto de la timidina fosforilasa y la uridina fosforilasa sobre dThd, Urd, 5-FdUrd y CPF-373, donde los datos son la media de al menos 2 experimentos independientes (\pm S.D.);

La Figura 3 muestra la inhibición de TS por 5-FdUrd y CPF-373 medida por liberación de tritio a partir de [5-³H]dUrd (paneles A y B) y de [5-³H]dCyd (paneles C y D) en cultivos de células L1210/0 y por liberación de tritio a partir de [5-³H]dCyd (paneles E y F) en cultivos de células L1210/TK-, donde los datos son la media de 2 experimentos independientes (\pm S.E.M.);

La Figura 4 muestra un supuesto mecanismo propuesto de activación de 5-FdUrd ProTides;

La Figura 5 muestra la escisión mediada por carboxipeptidasa del profármaco CPF-373 monitoreado mediante ³¹P RMN;

La Figura 6 muestra el espectro de ³¹P RMN del compuesto CPF-373 en suero;

La Figura 7 muestra el espectro de ³¹P RMN del compuesto CPF-373 en tampón pH = 1;

La Figura 8 muestra el espectro de ³¹P RMN del compuesto CPF-373 en tampón pH = 8;

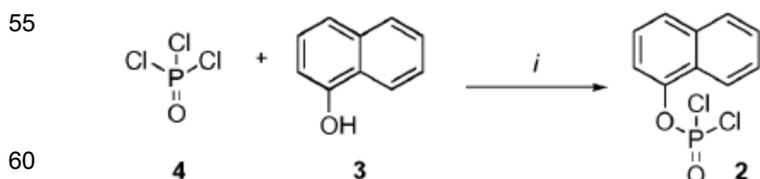
La Figura 9 muestra los espectros de nucleósido y base relativa por ¹⁹F RMN: a) 5-FdUrd sometido al ensayo de fosforilasa (A); b) 5-FdUrd y la base 5FU en condiciones del ensayo en ausencia de la enzima (TP) (B);

La Figura 10 muestra los espectros de nucleósido y la base en tampón de fosfato de potasio (205 nM) por ¹⁹F RMN: a) 5-FdUrd sometido al ensayo de fosforilasa en ausencia de la enzima (A); b) Resultado después de la adición de la enzima (TP) (B); y

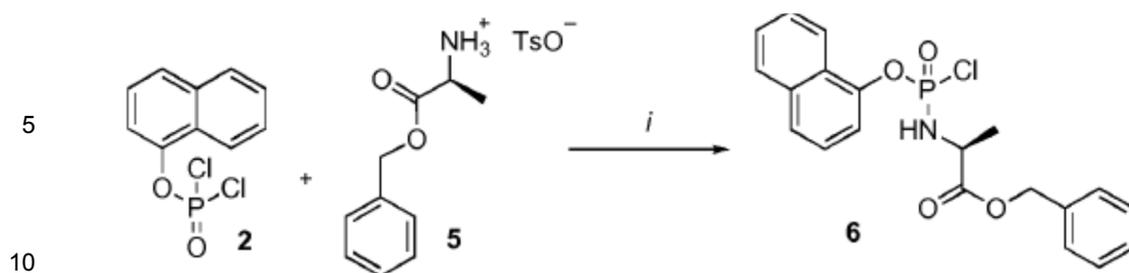
La Figura 11 muestra los espectros del compuesto de profármaco CPF-373 en el ensayo de fosforilasa: a) profármaco CPF-373 en condiciones del ensayo en ausencia de la enzima (TP) (A); b) profármaco CPF-373 sometido a la acción de la timidina fosforilasa (TP) (B).

Síntesis de compuestos

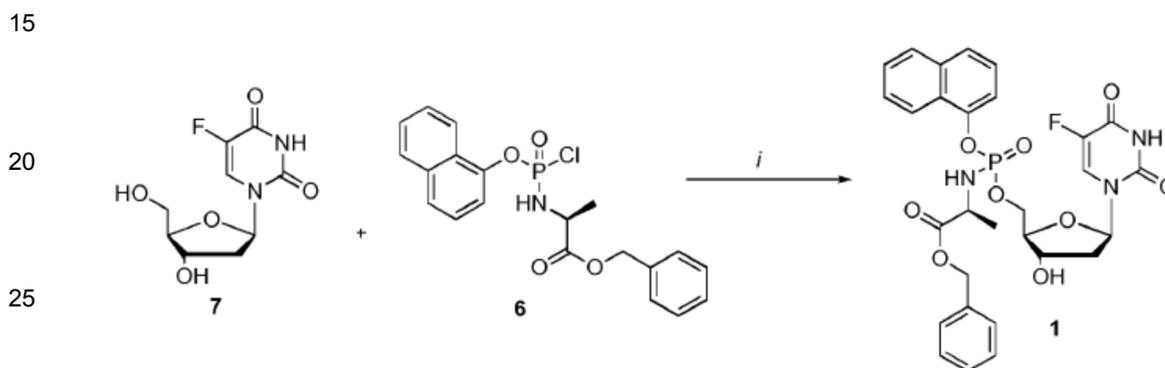
Con referencia a la Figura 1 y Esquemas 1 a 3 más abajo, los compuestos de la presente invención - como se ejemplifica por el compuesto CPF-373 (1), el cual no forma parte de la presente invención, pero se proporciona como ejemplo de referencia - se han sintetizado mediante el uso de la química de fosforocloridato. La química de fosforocloridato ha sido previamente informada por McGuigan y otros (1993, 1996, 1997). Por ejemplo, el arilfosforodichlorofosfato (2) se preparó mediante acoplamiento de 1-naftol (3) con oxicluro de fósforo (4) en presencia de Et₃N (Esquema 1) y se dejó reaccionar con el tosilato de éster bencílico de L-alanina (5) en presencia de Et₃N para generar el derivado de fosforocloridato (6) (Esquema 2). El nucleósido 5-FdUrd (7) se convirtió en 5' ProTide por acoplamiento con el derivado de fosforocloridato (6) en THF, en presencia de *N*-metil imidazol (NMI) para dar el compuesto objetivo CPF-373 (1) (Esquema 3). La muestra se obtuvo como una mezcla de dos diastereoisómeros confirmada por la presencia de dos picos en la ³¹P RMN.



Esquema 1: Reactivos y Condiciones: (i) 1-naftol (3), oxicluro de fósforo (4), Et₂O, Et₃N seco, -78°C, 30 min, después t.a., 3 h.



Esquema 2: Reactivos y Condiciones: (i) Et₃N seco, CH₂Cl₂, -78°C, 1 h después t.a., 3h.



Esquema 3: Reactivos y Condiciones: (i) NMI, THF seco, 10 min, después fosforcloridato (6), t.a. toda la noche

Los disolventes anhidros se obtuvieron de Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo una atmósfera de argón. Las reacciones se monitorearon con TLC analítica en placas de aluminio recubiertas previamente con gel de sílice 60-F254 y se visualizaron con espectros bajo luz UV (254 nm) y/o con ³¹P RMN. La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice (35-70 μM). Los espectros de RMN con protón (¹H), carbono (¹³C), fósforo (³¹P) y flúor (¹⁹F) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 25 °C. Los espectros se autocalibraron con el pico de disolvente deuterado y todos los espectros de ¹³C RMN y ³¹P RMN se desacoplaron de protones. La HPLC analítica se realizó mediante Varian Prostar (LC Workstation-Varian prostar 335 LC detector) mediante el uso de Varian Polaris C18-A (10 μM) como columna analítica.

Los espectros de masas de baja y alta resolución se realizaron como un servicio por la Universidad de Birmingham, mediante el uso de electrospray (ES). El microanálisis de CHN se realizó como un servicio por MEDAC Ltd., Surrey.

Procedimiento estándar A: Síntesis de Diclorofosfato (2).

Se añadió oxiclورو de fósforo (1.0 equiv) a una solución de 1-naftol (1.0 equiv) en éter dietílico en atmósfera de argón, después se añadió trietilamina anhidra (1.0 equiv) gota a gota a -78 °C y se agitó la mezcla de reacción resultante durante 1 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente durante 3 h. La formación del compuesto deseado se monitoreó mediante ³¹P RMN. La mezcla resultante se filtró y después se evaporó *al vacío* bajo nitrógeno para proporcionar el aceite incoloro en bruto como producto, que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis de 1-Naftil Diclorofosfato (2): Se preparó de acuerdo con el Procedimiento estándar A, a partir de 1-naftol (3.00 g, 20.81 mmol), oxiclورو de fósforo (1.94 mL, 20.81 mmol), trietilamina (2.9 mL, 20.81 mmol) y éter dietílico anhidro (70 mL). Después de 1 h a -78 °C la reacción se dejó subir a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. El producto en bruto se obtuvo como un aceite. La mezcla resultante se filtró y luego se evaporó *al vacío*, después de la purificación por cromatografía en columna mediante elución con hexano-EtOAc, (1:1) para proporcionar un aceite incoloro (4.59 g, 84 %) [R_f = 0.93 (hexano-EtOAc, 1:1)], ³¹P RMN (202 MHz, CDCl₃): δ_P 5.07; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ_H 7.52-7.71 (m, 4H, ArH), 7.86-7.89 (m, 1H, ArH), 7.95-7.98 (m, 1H, ArH), 8.16-8.19 (m, 1H, ArH).

Procedimiento estándar B: Síntesis de Fosforocloridato (6).

Se añadió gota a gota una solución de fosforodichloridato de arilo (1.0 equiv) y sal de éster de aminoácido apropiada (1.0 equiv.) en diclorometano en atmósfera de argón, a trietilamina anhidra (2.0 equiv.) a -78 °C. Después de 1 h, la mezcla de reacción se dejó poner tibio lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas y la formación del compuesto deseado se monitoreó mediante ³¹P RMN. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, el residuo se redisolvió en éter

diétilico, se filtró y se evaporó *al vacío* bajo nitrógeno para proporcionar un aceite incoloro en bruto, que en algunos casos se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. El fosforocloridato de arilo sintetizado se purificó por cromatografía en columna mediante elución con hexano-EtOAc, (7:3) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro.

5 Síntesis de fosforocloridato de 1-naftil(bencil-L-alaninilo) (6): El fosforocloridato se preparó mediante el uso de diclorofosfato de 1-naftilo (2.50 g, 9.57 mmol), sal de tosilato de L-alanina bencil éster (3.36 g, 9.57 mmol), trietilamina seca (2.66 mL, 19.14 mmol) y diclorometano seco (35.7 mL) de acuerdo con el procedimiento general B. Purificación por cromatografía en columna mediante elución con hexano-EtOAc, (7:3) proporcionó el compuesto del título en forma de un
10 aceite incoloro (1.82 g, 47 %) [$R_f = 0.90$ (hexano-EtOAc, 7:3)], ^{31}P RMN (202 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros): δ_P 7.92, 8.14 (Int.: 1.00:1.00); ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , mezcla de diastereoisómeros con una relación de 1:1): δ_H 1.42-1.45 (m, 3H, CHCH_3), 4.20-4.23 (m, 1H, CHCH_3), 4.78-4.81 (m, 1H, NH), 5.09 (s, 2H, OCH_2Ph), 7.09-7.73 (m, 11H, ArH), 7.97-8.12 (m, 1H, ArH).

Procedimiento estándar C: Síntesis del Nucleósido Fosforamidato (1).

15 Se añadió una solución del nucleósido apropiado (1.0 equiv.) en THF seco (10 mL) a NMI (5.0 equiv.) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a una solución de fosforocloridato (3.0 equiv) en THF anhidro. La reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche y se evaporó
20 *al vacío*. El aceite obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 , se lavó dos veces con H_2O , después con 0.5 M de HCl o como alternativa, el producto en bruto se lavó con éter diétilico. Después el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice, mediante elución con CH_2Cl_2 -MeOH como un gradiente para proporcionar el fosforamidato.

Síntesis de 5-Fluoro-2'desoxiuridina-5'-O-[α -naftil (bencil-L-alaninil)]fosfato (1) (proporcionado como ejemplo de referencia): El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-Fluoro-2'desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.40 mL, 5.07 mmol) y naftil(bencil-L-alaninil)fosforocloridato (0.82 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general C. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH_2Cl_2 until CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) afforded the title compound as a colourless solid (47.0 mg, 8%) [$R_f = 0.19$ (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa^+ , 636.1520. $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{FNaP}$ requiere [MNa^+], 636.1523); ^{31}P RMN (202 MHz, MeOD, mezcla de diastereoisómeros): δ_P 4.24, 4.59; ^{19}F RMN (470 MHz, MeOD): δ_F -167.36, -167.18; ^1H RMN (500 MHz, MeOD): δ_H 1.34-1.38 (m, 3H, CHCH_3), 1.67-1.79 (m, 1H, $H-2'$), 2.08-2.17 (m, 1H, $H-2'$), 4.03-4.15 (m, 2H, CHCH_3 , $H-4'$), 4.24-4.36 (m, 3H, CH_2OP , $H-3'$), 5.08 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, OCHHPh), 5.13 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, OCHHPh), 6.09-6.16 (m, 1H, $H-1'$), 7.27-7.45 (m, 6H, ArH), 7.47-7.55 (m, 3H, ArH), 7.67-7.72 (m, 2H, ArH , $H-6$), 7.86-7.90 (m, 1H, ArH), 8.12-8.18 (m, 1H, ArH); ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): δ_C 20.3 (d, $^3J_{C-P} = 7.6$ Hz, CH_3), 20.5 (d, $^3J_{C-P} = 6.5$ Hz, CH_3), 40.8 (CH_2), 40.9 (CH_2), 51.8 (CH), 51.9 (CH), 67.6 (d, $^2J_{C-P} = 5.3$ Hz, CH_2), 67.8 (d, $^2J_{C-P} = 5.2$ Hz, CH_2), 68.0 (CH_2), 68.1 (CH_2), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, $^3J_{C-P} = 8.1$ Hz, CH), 86.8 (d, $^3J_{C-P} = 8.1$ Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 116.2 (d, $^3J_{C-P} = 3.3$ Hz, CH), 116.5 (d, $^3J_{C-P} = 3.5$ Hz, CH), 122.6 (CH), 125.3 (CH), 125.4 (CH), 125.6 (CH), 125.7 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 127.8 (C), 127.9 (C), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 129.4 (CH), 129.5 (CH), 129.6 (CH), 129.7 (CH), 136.2 (C), 137.1 (C), 137.2 (C), 141.6 (d, $^1J_{C-F} = 233.8$ Hz, C), 141.7 (d, $^1J_{C-F} = 233.9$ Hz, C), 147.8 (d, $^2J_{C-P} = 7.7$ Hz, C), 147.9 (d, $^2J_{C-P} = 7.4$ Hz, C), 150.5 (d, $^4J_{C-F} = 4.0$ Hz, C), 159.3 (d, $^2J_{C-F} = 26.1$ Hz, C), 174.6 (d, $^3J_{C-P} = 5.0$ Hz, C), 174.9 (d, $^3J_{C-P} = 4.3$ Hz, C), m/z (ES) 636 (MH^+ , 100 %), HPLC inversa mediante elución con ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ de 100/0 a 0/100) en 45 min., mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 34.23 min. and t_R 34.59 min. Anal. Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$: C, 56.77; H, 4.76; N, 6.85. Encontrado: C, 56.57; H, 5.06; N, 6.72.

Desoxinucleósidos pirimidínicos radiactivos

45 [$5\text{-}^3\text{H}$]dCyd (radiospecificidad: 22 Ci/mmol) y [$5\text{-}^3\text{H}$]dUrd (radiospecificidad: 15.9 Ci/mmol) se obtuvieron de Moravek Biochemicals Inc. (Brea, CA).

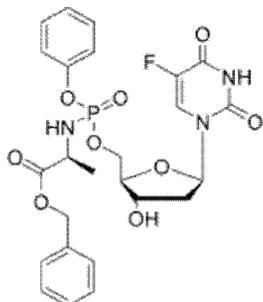
Procedimiento estándar D: síntesis de fosforamidatos (método NMI)

50 A una solución en agitación de 5-F-dUrd (1.0 eq.) en THF anhidro, se añadió gota a gota un fosforocloridato apropiado (3.0 eq) disuelto en THF anhidro bajo una atmósfera de Ar. A esa mezcla de reacción a -78°C se añadió gota a gota NMI (5.0 eq.) durante 5 minutos. Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El disolvente se eliminó *al vacío* y el residuo se volvió a disolver en DCM y se lavó tres veces con 0.5
55 M de HCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se redujo a sequedad y se purificó por cromatografía en columna con gradiente de eluyente (DCM/MeOH 99:1 a 97:3 a 95:5).

Procedimiento estándar E: síntesis de fosforamidatos (método $t\text{BuMgCl}$)

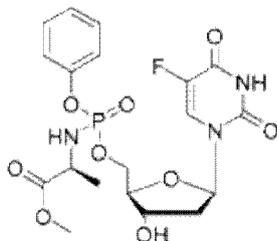
60 A una solución en agitación de 5-FdUrd (1.0 eq.) disuelta en THF anhidro, se añadió $t\text{BuMgCl}$ (1.1 mol eq. solución 1M en THF) gota a gota en una atmósfera de Ar, seguido de la adición (después de 30 min.) del fosforocloridato apropiado (2.0 mol eq.) disuelto en THF anhidro. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El solvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna mediante el uso de gradiente de eluyente
65 (DCM/MeOH 99:1 a 97:3 a 95:5)

5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF381) (proporcionado como ejemplo de referencia)



El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.40 g, 1.62 mmol), cloruro de *tert*-butilmagnesio en tetrahidrofurano ($t\text{BuMgCl}$) (1.0 M, 2.43 mL, 2.43 mmol) y fenil(benzoxi-L-alaninilo)fosforocloridato (1.08 g, 3.20 mmol) de acuerdo con el procedimiento general E. Purificación por cromatografía en columna de gradiente sobre sílice, mediante elución con CH_2Cl_2 hasta CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (71.0 mg, 8 %) [$R_f = 0.35$ (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa^+ , 586.1360. $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9\text{NaPF}$ requiere $[\text{MNa}^+]$, 586.1367); ^{31}P RMN (202 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{P}}$ 3.74, 4.14; ^{19}F RMN (470 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{F}}$ -167.57, -167.46; ^1H RMN (500 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{H}}$ 1.35 (d, 3H, $J = 7.4$ Hz, CHCH_3 , un diast.), 1.37 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, CHCH_3 , un diast.), 1.96-2.32 (m, 2H, H -2'), 3.95-4.08 (m, 2H, CHCH_3 , H -4'), 4.23-4.34 (m, 3H, CH_2OP , H -3'), 5.13 (br d, 1H, $J = 12.3$ Hz, OCHHPh), 5.16 (br d, 1H, $J = 12.3$ Hz, OCHHPh , un diast.), 5.17 (br d, 1H, $J = 12.2$ Hz, OCHHPh , un diast.), 6.16-6.22 (m, 1H, H -1'), 7.17-7.25 (m, 3H, ArH), 7.26-7.40 (m, 7H, ArH), 7.81-7.85 (m, 1H, H -6); ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{C}}$ 20.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH_3), 20.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, CH_3), 40.6 (CH_2), 40.9 (CH_2), 51.6 (CH), 51.8 (CH), 67.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, CH_2), 67.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH_2), 68.0 (CH_2), 71.8 (CH), 71.9 (CH), 86.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.0$ Hz, CH), 86.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.3$ Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 121.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.1$ Hz, CH), 121.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, CH), 125.5 (d, $^5J_{\text{C-P}} = 3.2$ Hz, CH), 125.8 (d, $^5J_{\text{C-P}} = 3.2$ Hz, CH), 126.3 (CH), 129.0 (CHx2), 129.3 (CHx2), 129.6 (CHx2), 130.8 (CHx2), 140.9 (C), 141.6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 233.6$ Hz, C), 141.7 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 233.6$ Hz, C), 150.7 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 5.7$ Hz, C), 152.1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 6.5$ Hz, C), 159.2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.3$ Hz, C), 174.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.9$ Hz, C), 174.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.9$ Hz, C), m/z (ES) 586 (MNa^+ , 100 %); La HPLC de fase inversa eluyendo con $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, $\lambda = 275$ nm, mostró un pico de la mezcla de diastereoisómeros con t_R 25.08 min. (97 %).

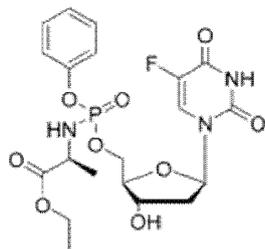
5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(metoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF382) (proporcionado como ejemplo de referencia)



El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), *N*-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y fenil(metoxi-L-alaninil)fosforocloridato (0.84 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general D. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH_2Cl_2 hasta CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (16.0 mg, 4 %) [$R_f = 0.30$ (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa^+ , 510.1045. $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_9\text{NaPF}$ requiere $[\text{MNa}^+]$, 510.1054); ^{31}P RMN (202 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{P}}$ 3.79, 4.09; ^{19}F RMN (470 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{F}}$ -167.78, -167.72; ^1H RMN (500 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{H}}$ 1.34 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, CHCH_3 , un diast.), 1.36 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, CHCH_3 , un diast.), 2.02-2.16 (m, 1H, H -2'), 2.25-2.34 (m, 1H, H -2'), 3.69 (s, 3H, OCH_3 , un diast.), 3.70 (s, 3H, OCH_3 , un diast.), 3.93-4.02 (m, 1H, CHCH_3), 4.08-4.13 (m, 1H, H -4'), 4.27-4.45 (m, 3H, CH_2OP , H -3'), 6.20-6.29 (m, 1H, H -1'), 7.18-7.28 (m, 3H, ArH), 7.35-7.40 (m, 2H, ArH), 7.85 (d, 1H, $^3J_{\text{H-F}} = 6.4$ Hz, H -6); ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{C}}$ 20.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, CH_3), 20.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, CH_3), 40.8 (CH_2), 40.9 (CH_2), 51.5 (CH_3), 51.6 (CH_3), 52.7 (CH), 52.8 (CH), 67.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, CH_2), 67.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.1$ Hz, CH_2), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2$ Hz, CH), 86.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2$ Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 121.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, CH), 121.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.7$ Hz, CH), 125.6 (d, $^5J_{\text{C-P}} = 2.9$ Hz, CH), 125.9 (d, $^5J_{\text{C-P}} = 2.9$ Hz, CH), 126.2 (CH), 130.8 (CH), 130.9 (CH), 141.6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 233.8$ Hz, C), 141.7 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 233.9$ Hz, C), 150.6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, C), 152.1 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, C), 152.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, C), 159.4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26.0$ Hz, C), 175.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.8$ Hz, C), 175.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$ Hz, C), m/z (ES) 510 (MNa^+ , 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, $\lambda = 275$ nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 23.11 min. y t_R 24.11 min. (74 % : 24 %).

5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(etoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF383) (proporcionado como ejemplo de referencia)

5



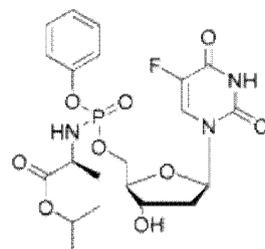
10

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.10 g, 0.40 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.16 mL, 2.03 mmol) y (etoxi-L-alaninil)fosforocloridato (0.35 g, 1.21 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (10.0 mg, 5 %) [R_f = 0.11 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 524.1202. C₂₀H₂₅N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 524.1210); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 3.83, 4.11; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.67, -167.61; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.25 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.26 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.34 (d, 3H, J = 7.2 Hz, CHCH₃, un diast.), 1.36 (d, 3H, J = 7.2 Hz, CHCH₃, un diast.), 2.02-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.24-2.34 (m, 1H, H-2'), 3.90-4.00 (m, 1H, CHCH₃), 4.08-4.19 (m, 3H, CH₂CH₃, H-4'), 4.27-4.45 (m, 3H, CH₂OP, H-3'), 6.20-6.28 (m, 1H, H-1'), 7.18-7.28 (m, 3H, ArH), 7.34-7.39 (m, 2H, ArH), 7.85 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.4 Hz, H-6); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 14.4 (CH₃), 15.4 (CH₃), 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, CH₃), 20.5 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₃), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.6 (CH), 51.7 (CH), 62.4 (CH₂), 62.5 (CH₂), 67.5 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂), 67.6 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, ³J_{C-P} = 8.1 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 8.3 Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 121.3 (d, ³J_{C-P} = 4.8 Hz, CH), 121.4 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, CH), 125.6 (d, ⁵J_{C-P} = 4.6 Hz, CH), 125.8 (d, ⁵J_{C-P} = 4.8 Hz, CH), 126.3 (CH), 130.8 (CH), 130.9 (CH), 141.6 (d, ¹J_{C-F} = 233.7 Hz, C), 141.8 (d, ¹J_{C-F} = 233.8 Hz, C), 150.8 (br C), 152.0 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C), 152.1 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C), 159.6 (d, ²J_{C-F} = 26.0 Hz, C), 174.8 (d, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, C), 175.1 (d, ³J_{C-P} = 4.4 Hz, C), m/z (ES) 524 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, λ = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 25.63 min. y t_R 26.40 min. (71 % : 27 %).

30

5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[(S)-1-metilimidazol-2-ylideneamino]fosfato (CPF384) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35



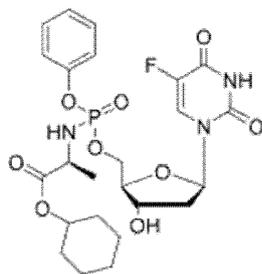
40

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y fenil(isopropoxi-L-alaninil)fosforocloridato (0.93 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (31.0 mg, 6 %) [R_f = 0.21 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 538.1370. C₂₁H₂₇N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 538.1367); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 3.87, 4.13; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.64, -167.56; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.22-1.26 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1.33 (d, 3H, J = 7.1 Hz, CHCH₃, un diast.), 1.35 (d, 3H, J = 7.1 Hz, CHCH₃, un diast.), 2.00-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.23-2.34 (m, 1H, H-2'), 3.88-3.96 (m, 1H, CHCH₃), 4.08-4.14 (m, 1H, H-4'), 4.27-4.45 (m, 3H, CH₂OP, H-3'), 4.98 (hept, 1H, J = 6.1 Hz, CH(CH₃)₂), 6.20-6.29 (m, 1H, H-1'), 7.17-7.29 (m, 3H, Ar-H), 7.34-7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.84 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.4 Hz, H-6); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, CH₃), 20.5 (d, ³J_{C-P} = 6.4 Hz, CH₃), 21.9 (CH₃x2), 22.0 (CH₃x2), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.7 (CH), 51.8 (CH), 67.5 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, CH₂), 67.6 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂), 70.2 (CH), 70.3 (CH), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.6 (d, ³J_{C-P} = 8.2 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 8.2 Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 121.2 (d, ³J_{C-P} = 4.7 Hz, CH), 121.4 (d, ³J_{C-P} = 4.9 Hz, CH), 125.6 (d, ⁵J_{C-P} = 7.1 Hz, CH), 125.9 (d, ⁵J_{C-P} = 7.1 Hz, CH), 126.3 (CH), 130.8 (CH), 130.9 (CH), 141.8 (d, ¹J_{C-F} = 234.5 Hz, C), 141.9 (d, ¹J_{C-F} = 234.4 Hz, C), 150.7 (d, ⁴J_{C-F} = 3.7 Hz, C), 152.0 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, C), 152.1 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, C), 159.3 (d, ²J_{C-F} = 26.3 Hz, C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 26.0 Hz, C), 174.3 (d, ³J_{C-P} = 5.6 Hz, C), 174.6 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, C), m/z (ES) 538 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, λ = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 28.93 min. y t_R 29.45 min. (44 % : 52 %).

60

5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[(S)-1-metilimidazol-2-ylideneamino]fosfato (CPF508) (proporcionado como ejemplo de referencia)

65



5

10

15

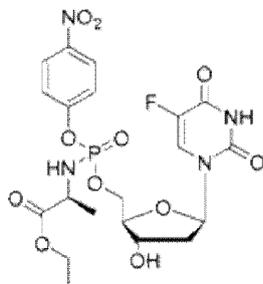
20

25

30

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.30 g, 1.21 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.48 mL, 6.09 mmol) y fenil(ciclohexoxi-L-alaninil)fosforocloridato (1.026 g, 3.65 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (6.7 mg, 3 %) [R_f = 0.45 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 565.48. C₂₄H₃₁N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 565.49); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 3.86, 4.15; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.68, -167.62; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.26-1.40 (m, 3H, CHCH₃), 1.41-1.50 (m, 4H, CH(CH₂)₅), 1.52-1.61 (m, 1H, CH(CH₂)₅), 1.70-1.88 (m, 5H, CH(CH₂)₅), 2.00-2.14 (m, 1H, H-2'), 2.23-2.34 (m, 1H, H-2'), 3.90-3.98 (m, 1H, CHCH₃), 4.07-4.14 (m, 1H, H-4'), 4.29-4.39 (m, 2H, CH₂OP), 4.40-4.45 (m, 1H, H-3'), 4.72-4.78 (m, 1H, CH(CH₂)₅), 6.20-6.28 (m, 1H, H-1'), 7.18-7.29 (m, 3H, ArH), 7.34-7.39 (m, 2H, ArH), 7.85 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.6 Hz, H-6); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, CH₃), 20.6 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₃), 24.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 32.3 (CH₂), 32.4 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.7 (CH), 51.9 (CH), 67.5 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, CH₂), 67.7 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 74.9 (CH), 86.6 (d, ³J_{C-P} = 8.5 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 8.5 Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 121.3 (CH), 121.4 (CH), 121.5 (CH), 121.6 (CH), 125.6 (CH), 125.7 (CH), 125.8 (CH), 125.9 (CH), 126.3 (CH), 130.1 (CH), 141.5 (d, ¹J_{C-F} = 234.0 Hz, C), 150.7 (d, ⁴J_{C-P} = 4.0 Hz, C), 152.0 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C), 152.1 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 26.3 Hz, C), 174.3 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, C), 174.5 (d, ³J_{C-P} = 4.3 Hz, C); m/z (ES) 565 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 30.00 min. y t_R 30.45 min. (33 % : 65 %).

5-fluoro-2'desoxiuridina-5'-O-[p-nitro-fenil(e-toxi-L-alaninil)]fosfato (CPF430) (proporcionado como ejemplo de referencia)



35

40

45

50

55

60

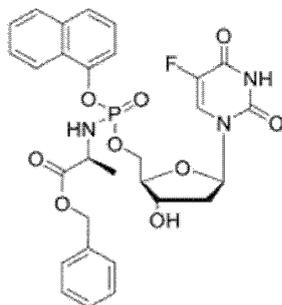
El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y p-nitro-fenil(e-toxi-L-alaninil)fosforocloridato (1.02 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (77.0 mg, 14 %) [R_f = 0.24 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 569.1066. C₂₀H₂₄N₄O₁₁NaPF requiere [MNa⁺], 569.1061); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 3.63, 3.67; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.89, -167.82; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.24 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 1.25 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 1.36-1.40 (m, 3H, CHCH₃), 2.16-2.25 (m, 1H, H-2'), 2.30-2.38 (m, 1H, H-2'), 3.95-4.00 (m, 1H, CHCH₃), 4.09-4.19 (m, 3H, CH₂CH₃, H-4'), 4.32-4.48 (m, 3H, CH₂OP, H-3'), 6.21-6.29 (m, 1H, H-1'), 7.46 (d, 1H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.49 (d, 1H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.85 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.6 Hz, H-6), 7.87 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.6 Hz, H-6), 8.29 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 14.5 (CH₃), 14.6 (CH₃), 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, CH₃), 20.4 (d, ³J_{C-P} = 6.4 Hz, CH₃), 40.8 (CH₂), 51.6 (CH), 51.7 (CH), 62.5 (CH₂), 67.8 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂), 68.0 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂), 71.8 (CHx2), 86.4 (CH), 86.5 (CH), 87.0 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, CH), 122.1 (d, ³J_{C-P} = 5.2 Hz, CH), 122.5 (d, ³J_{C-P} = 5.0 Hz, CH), 125.7 (CH), 126.0 (CH), 126.6 (CH), 141.3 (d, ¹J_{C-F} = 233.6 Hz, C), 141.5 (d, ¹J_{C-F} = 233.7 Hz, C), 146.2 (C), 150.6 (d, ⁴J_{C-P} = 4.6 Hz, C), 156.9 (d, ²J_{C-P} = 2.6 Hz, C), 157.0 (d, ²J_{C-P} = 2.6 Hz, C), 159.3 (d, ²J_{C-F} = 26.3 Hz, C), 174.6 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, C), 174.9 (d, ³J_{C-P} = 3.7 Hz, C), m/z (ES) 569 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 min., 1 mL/min, L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 31.63 min. and t_R 31.89 min. (11 % : 85 %).

5-Fluoro-2'desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF373) (proporcionado como ejemplo de referencia)

65

5

10

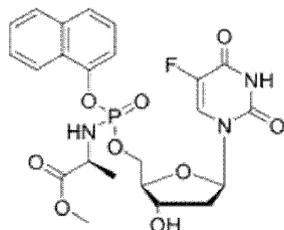


15 El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y 1-naftil(benzoxi-L-alaninil)fosforocloridato (0.82 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (47.0 mg, 8 %) [R_f = 0.19 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 636.1520. C₂₉H₂₉N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 636.1523); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 4.24, 4.59; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.36, -167.18; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.34-1.38 (m, 3H, CHCH₃), 1.67-1.79 (m, 1H, H-2'), 2.08-2.17 (m, 1H, H-2'), 4.03-4.15 (m, 2H, CHCH₃, H-4'), 4.24-4.36 (m, 3H, CH₂OP, H-3'), 5.08 (d, 1H, J = 12.0 Hz, OCHHPh), 5.13 (d, 1H, J = 12.0 Hz, OCHHPh), 6.09-6.16 (m, 1H, H-1'), 7.27-7.45 (m, 6H, ArH), 7.47-7.55 (m, 3H, ArH), 7.67-7.72 (m, 2H, ArH, H-6), 7.86-7.90 (m, 1H, ArH), 8.12-8.18 (m, 1H, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.6 Hz, CH₃), 20.5 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₃), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.8 (CH), 51.9 (CH), 67.6 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, CH₂), 67.8 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, CH₂), 68.0 (CH₂), 68.1 (CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, ³J_{C-P} = 8.1 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 8.1 Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 116.2 (d, ³J_{C-P} = 3.3 Hz, CH), 116.5 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH), 122.6 (CH), 125.3 (CH), 125.4 (CH), 125.6 (CH), 125.7 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 127.8 (C), 127.9 (C), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 129.4 (CH), 129.5 (CH), 129.6 (CH), 129.7 (CH), 136.2 (C), 137.1 (C), 137.2 (C), 141.6 (d, ¹J_{C-F} = 233.8 Hz, C), 141.7 (d, ¹J_{C-F} = 233.9 Hz, C), 147.8 (d, ²J_{C-P} = 7.7 Hz, C), 147.9 (d, ²J_{C-P} = 7.4 Hz, C), 150.5 (d, ⁴J_{C-F} = 4.0 Hz, C), 159.3 (d, ²J_{C-F} = 26.1 Hz, C), 174.6 (d, ³J_{C-P} = 5.0 Hz, C), 174.9 (d, ³J_{C-P} = 4.3 Hz, C), m/z (ES) 636 (MNa⁺, 100%); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R34.23 min. y t_R 34.59 min. (23 % : 76 %).

35 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(metoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF385) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35

40



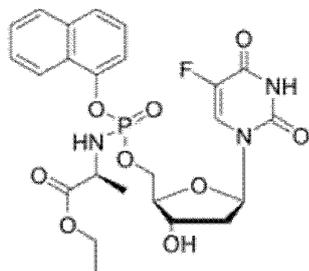
45

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y 1-naftil(metoxi-L-alaninil)fosforocloridato (0.99 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (7.0 mg, 1 %) [R_f = 0.23 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 560.1198. C₂₃H₂₅N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 560.1210); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 4.31, 4.56; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.51, -167.37; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.34 (d, 3H, J = 6.7 Hz, CHCH₃, un diast.), 1.36 (d, 3H, J = 6.7 Hz, CHCH₃, un diast.), 1.76-1.87 (m, 1H, H-2'), 2.12-2.22 (m, 1H, H-2'), 3.64 (s, 3H, OCH₃, un diast.), 3.65 (s, 3H, OCH₃, un diast.), 4.03-4.13 (m, 2H, CHCH₃, H-4'), 4.30-4.38 (m, 2H, CH₂OP), 4.41 (dd, 1H, J = 2.5 Hz, J = 5.8 Hz, H-3'), 6.12-6.19 (m, 1H, H-1'), 7.41-7.46 (m, 1H, ArH), 7.50-7.58 (m, 3H, ArH), 7.70-7.76 (m, 2H, H-6, ArH), 7.87-7.91 (m, 1H, ArH), 8.15-8.20 (m, 1H, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₃), 20.4 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₃), 40.7 (CH₂), 40.8 (CH₂), 51.6 (CH₃), 51.7 (CH₃), 52.7 (CH), 52.8 (CH), 67.8 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, CH₂), 67.5 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, ³J_{C-P} = 7.9 Hz, CH), 86.9 (d, ³J_{C-P} = 8.5 Hz, CH), 87.0 (CH), 116.2 (d, ³J_{C-P} = 3.1 Hz, CH), 116.5 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH), 122.5 (CH), 122.6 (CH), 125.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 125.7 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (Cx2), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 136.3 (C), 141.6 (d, ¹J_{C-F} = 233.4 Hz, C), 141.7 (d, ¹J_{C-F} = 234.1 Hz, C), 147.8 (d, ²J_{C-P} = 7.9 Hz, C), 148.0 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C), 150.6 (C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 27.0 Hz, C), 175.2 (d, ³J_{C-P} = 3.9 Hz, C), 175.5 (d, ³J_{C-P} = 3.9 Hz, C), m/z (ES) 560 (MNa⁺, 100%); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 28.45 min. y t_R 28.85 min. (73% : 25%).

65 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(etoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF386) (proporcionado como ejemplo de referencia)

5

10



15

20

25

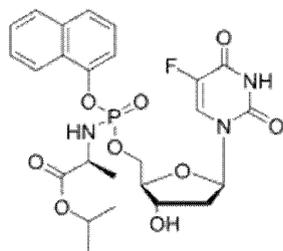
30

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), N-metilimidazol (NMI) (0.40 mL, 5.07 mmol) y 1-naftil(etoxi-L-alaninil) fosforocloridato (1.04 g, 3.04 mmol) de acuerdo con el procedimiento general D. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (47.0 mg, 4 %) [R_f = 0.25 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 574.1360. C₂₄H₂₇N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 574.1367); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 4.34, 4.55; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.31, -167.16; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.20 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.21 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.33-1.37 (m, 3H, CHCH₃), 1.73-1.86 (m, 1H, H-2'), 2.12-2.21 (m, 1H, H-2'), 4.01-4.07 (m, 1H, CHCH₃), 4.08-4.13 (m, 3H, CH₂CH₃, H-4'), 4.31-4.43 (m, 3H, CH₂OP, H-3'), 6.11-6.19 (m, 1H, H-1'), 7.39-7.46 (m, 1H, ArH), 7.50-7.57 (m, 3H, ArH), 7.68-7.75 (m, 2H, ArH, H-6), 7.86-7.91 (m, 1H, ArH), 8.15-8.20 (m, 1H, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 14.4 (CH₃), 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, CH₃), 20.5 (d, ³J_{C-P} = 6.2 Hz, CH₃), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.8 (CH), 51.9 (CH), 62.4 (CH₂), 62.5 (CH₂), 67.8 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂), 67.9 (d, ²J_{C-P} = 4.6 Hz, CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, ³J_{C-P} = 8.4 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 8.4 Hz, CH), 86.9 (CH), 87.0 (CH), 116.1 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH), 116.5 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, CH), 122.6 (CH), 125.4 (CH), 125.5 (CH), 125.7 (CH), 125.8 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (C), 127.7 (C), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 136.3 (C), 141.6 (d, ¹J_{C-F} = 233.3 Hz, C), 141.7 (d, ¹J_{C-F} = 233.4 Hz, C), 147.8 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, C), 148.0 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, C), 150.6 (C), 159.3 (d, ²J_{C-F} = 26.3 Hz, C), 174.8 (d, ³J_{C-P} = 4.8 Hz, C), 175.1 (d, ³J_{C-P} = 4.0 Hz, C); m/z (ES) 574 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, ^L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 30.77 min. y t_R 31.20 min. (51 %: 48 %).

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil (isopropoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF387) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35

40



45

50

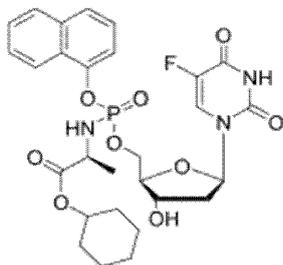
55

60

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.10 g, 0.40 mmol), cloruro de terc-butilmagnesio en tetrahidrofurano (t-BuMgCl) (1.0 M, 0.61 mL, 0.61 mmol) y 1-naftil(isopropoxi-L-alaninil) fosforocloridato (0.31 g, 0.89 mmol) de acuerdo con el procedimiento general E. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (71.0 mg, 17 %) [R_f = 0.21 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 588.1521. C₂₅H₂₉N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 588.1523); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 4.38, 4.58; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.43, -167.26; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.19-1.23 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1.34-1.38 (m, 3H, CHCH₃), 1.68-1.84 (m, 1H, H-2'), 2.09-2.20 (m, 1H, H-2'), 3.96-4.05 (m, 1H, CHCH₃), 4.07-4.12 (m, 1H, H-4'), 4.29-4.38 (m, 2H, CH₂OP), 4.39-4.42 (m, 1H, H-3'), 4.93-5.01 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 5.10-6.18 (m, 1H, H-1'), 7.40-7.46 (m, 1H, ArH), 7.50-7.57 (m, 3H, ArH), 7.70-7.75 (m, 2H, H-6, ArH), 7.87-7.92 (m, 1H, ArH), 8.16-8.20 (m, 1H, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.3 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₃), 20.5 (d, ³J_{C-P} = 6.6 Hz, CH₃), 21.8 (CH₃), 21.9 (CH₃), 22.0 (CH₃), 22.1 (CH₃), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 51.9 (CH), 52.0 (CH), 67.8 (d, ²J_{C-P} = 4.5 Hz, CH₂), 67.9 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, CH₂), 70.2 (CH), 70.3 (CH), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.6 (CH), 86.7 (CH), 86.9 (d, ³J_{C-P} = 8.6 Hz, CH), 87.0 (d, ³J_{C-P} = 8.6 Hz, CH), 116.2 (d, ³J_{C-P} = 2.5 Hz, CH), 116.5 (d, ³J_{C-P} = 2.7 Hz, CH), 122.6 (CH), 125.5 (CH), 125.7 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (C), 127.7 (C), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 136.3 (C), 141.6 (d, ¹J_{C-F} = 233.2 Hz, C), 141.7 (d, ¹J_{C-F} = 233.4 Hz, C), 147.7 (d, ²J_{C-P} = 7.6 Hz, C), 147.9 (d, ²J_{C-P} = 7.7 Hz, C), 150.5 (C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 26.2 Hz, C), 174.4 (d, ³J_{C-P} = 5.0 Hz, C), 174.7 (d, ³J_{C-P} = 5.1 Hz, C); m/z (ES) 588 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, ^L = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 32.20 min. y t_R 32.80 min. (27 % : 69 %).

65

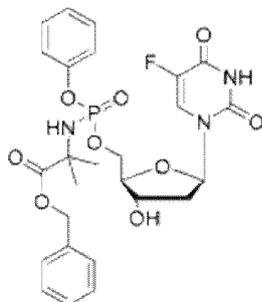
5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(ciclohexoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF509) (proporcionado como ejemplo de referencia)

5
10

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.30 g, 1.21 mmol), *N*-metilimidazol (NMI) (0.48 mL, 6.09 mmol) y fenil(ciclohexoxi-*L*-alaninil)fosforocloridato (1.45 g, 3.65 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (6.7 mg, 3 %) [R_f = 0.47 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)]; (Found: MNH₄⁺, 623.2261. C₂₈H₃₇N₄O₉NaPF requiere [MNH₄⁺], 623.2282); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 4.35, 4.52; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.31, -167.17; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.30-1.43 (m, 3H, CHCH₃), 1.44-1.56 (m, 4H, CH(CH₂)₅), 1.57-1.66 (m, 1H, CH(CH₂)₅), 1.67-1.83 (m, 5H, CH(CH₂)₅), 1.84-1.93 (m, 1H, *H*-2'), 2.09-2.20 (m, 1H, *H*-2'), 3.98-4.06 (m, 1H, CHCH₃), 4.07-4.15 (m, 1H, *H*-4'), 4.29-4.38 (m, 2H, CH₂OP), 4.39-4.44 (m, 1H, *H*-3'), 4.67-4.76 (m, 1H, CH(CH₂)₅), 6.09-6.19 (m, 1H, *H*-1'), 7.38-7.57 (m, 5H, ArH), 7.68-7.75 (m, 1H, ArH), 7.79-7.92 (m, 1H, ArH), 8.17 (d, 1H, ³J_{H-F} = 6.6 Hz, *H*-6); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 20.4 (d, ³J_{C-P} = 8.0 Hz, CH₃), 20.6 (d, ³J_{C-P} = 6.5 Hz, CH₃), 24.5 (CH₂), 26.3 (CH₂), 32.3 (CH₂), 40.8 (CH₂), 51.8 (CH), 51.9 (CH), 67.8 (CH₂), 72.0 (CH), 72.2 (CH), 75.0 (CH), 86.7 (d, ³J_{C-P} = 8.2 Hz, CH), 87.0 (CH), 116.1 (d, ³J_{C-P} = 2.5 Hz, CH), 116.4 (d, ³J_{C-P} = 3.0 Hz, CH), 122.6 (CH), 124.8 (CH), 125.9 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 126.5 (CH), 126.6 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (Cx2), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 136.3 (C), 141.6 (C), 148.0 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C), 150.6 (C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 27.0 Hz, C), 175.2 (d, ³J_{C-P} = 3.9 Hz, C), 175.5 (d, ³J_{C-P} = 3.9 Hz, C); m/z (ES) 623 (MNH₄⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, λ = 275 nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con *t*_R 30.50 min. y *t*_R 31.48 min. (27 % : 69 %).

15
20
25
30

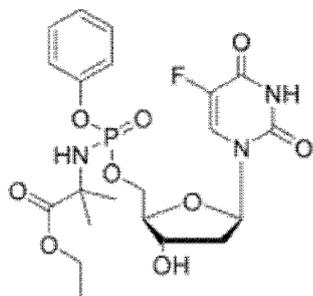
5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi- α,α -dimetilglicina)]fosfato (CPF393) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35
40
45

El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.40 g, 1.62 mmol), cloruro de *tert*-butilmagnesio en tetrahidrofurano (*t*BuMgCl) (1.0 M, 2.43 mL, 2.43 mmol) y fenil(benzoxi- α,α -dimetilglicina) fosforocloridato (1.17 g, 3.20 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **E**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (69.0 mg, 7 %) [R_f = 0.27 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 600.1527. C₂₆H₂₉N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 600.1523); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): TM_P 2.42, 2.47; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): TM_F -167.80, -167.62; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): TM_H 1.51-1.60 (m, 6H, C(CH₃)₂), 1.89-1.97 (m, 1H, *H*-2', un diast.), 2.07-2.15 (m, 1H, *H*-2', un diast.), 2.21 (ddd, 1H, *J* = 3.4 Hz, 5.9 Hz, 13.5 Hz, *H*-2', un diast.), 2.29 (ddd, 1H, *J* = 3.2 Hz, 6.1 Hz, 13.5 Hz, *H*-2', un diast.), 4.00-4.07 (m, 1H, *H*-4'), 4.22-4.31 (m, 2H, CH₂OP), 4.32-4.36 (m, 1H, *H*-3', un diast.), 4.37-4.41 (m, 1H, *H*-3', un diast.), 5.08-5.18 (m, 2H, OCH₂Ph), 6.19-6.25 (m, 1H, *H*-1'), 7.20-7.26 (m, 3H, ArH), 7.27-7.39 (m, 7H, ArH), 7.74 (d, ³J_{H-F} = 6.4 Hz, *H*-6, un diast.), 7.80 (d, ³J_{H-F} = 6.4 Hz, *H*-6, un diast.); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): TM_C 27.5 (CH₃), 27.7 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₃), 27.8 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₃), 40.8 (CH₂), 40.9 (CH₂), 58.2 (C), 58.3 (C), 67.6 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂), 67.7 (d, ²J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂), 68.3 (CH₂), 71.9 (CH), 72.0 (CH), 86.6 (d, ³J_{C-P} = 8.1 Hz, CH), 86.8 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, CH), 86.9 (CH), 121.4 (d, ³J_{C-P} = 4.8 Hz, CH), 121.6 (d, ³J_{C-P} = 4.5 Hz, CH), 125.6 (CH), 125.8 (CH), 125.9 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 129.3 (CH), 129.4 (CH), 129.6 (CH), 130.7 (CH), 130.8 (CH), 137.2 (C), 137.3 (C), 141.8 (d, ¹J_{C-F} = 233.7 Hz, C), 150.6 (C), 152.1 (d, ⁴J_{C-F} = 7.0 Hz, C), 152.1 (d, ⁴J_{C-F} = 7.6 Hz, C), 159.3 (d, ²J_{C-F} = 26.1 Hz, C), 159.4 (d, ²J_{C-F} = 26.1 Hz, C), 176.5 (d, ³J_{C-P} = 4.0 Hz, C), 176.6 (d, ³J_{C-P} = 3.8 Hz, C); m/z (ES) 600.1 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 35 minutos, 1 mL/min, λ = 275 nm, mostró un pico de la mezcla de diastereoisómeros con *t*_R 17.71 (96 %).

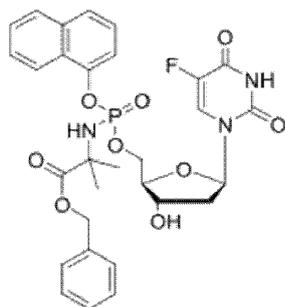
50
55
60
65

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(etoxi- α,α -dimetilglicina)]fosfato (CPF394) (proporcionado como ejemplo de referencia)



El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.20 g, 0.80 mmol), *N*-metilimidazol (NMI) (0.31 mL, 4.0 mmol) fenil(etoxi- α,α -dimetilglicina) fosforocloridato (0.73 g, 2.40 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH_2Cl_2 hasta CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (25.0 mg, 6 %) [$R_f = 0.24$ (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa^+ , 538.1367. $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9\text{NaPF}$ requiere $[\text{MNa}^+]$, 538.1367); ^{31}P RMN (202 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{P}}$ 2.49, 2.52; ^{19}F RMN (470 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{F}}$ -167.62, -167.58; ^1H RMN (500 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{H}}$ 1.24 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3 , un diast.), 1.26 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3 , un diast.), 1.44-1.54 (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.95-2.04 (m, 1H, $H-2'$, un diast.), 2.13-2.21 (m, 1H, $H-2'$, un diast.), 2.24 (ddd, 1H, $J = 3.1$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $J = 13.5$ Hz, $H-2'$, un diast.), 2.31 (ddd, 1H, $J = 3.2$ Hz, $J = 6.1$ Hz, $J = 13.7$ Hz, $H-2'$, un diast.), 4.08-4.19 (m, 3H, CH_2CH_3 , $H-4'$), 4.33-4.49 (m, 3H, CH_2OP , $H-3'$), 6.20-6.30 (m, 1H, $H-1'$), 7.23-7.28 (m, 3H, ArH), 7.33-7.40 (m, 2H, ArH), 7.80 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 6.4$ Hz, $H-6$, un diast.), 7.88 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 6.4$ Hz, $H-6$, un diast.); ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{C}}$ 14.4 (CH_3), 14.5 (CH_3), 27.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, CH_3), 27.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, CH_3), 27.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, CH_3), 40.8 (CH_2), 40.9 (CH_2), 58.1 (C), 62.6 (CH_2), 62.7 (CH_2), 67.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, CH_2), 67.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, CH_2), 71.9 (CH), 72.0 (CH), 86.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.1$ Hz, CH), 86.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, CH), 86.9 (CH), 121.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.4$ Hz, CH), 121.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.4$ Hz, CH), 125.6 (CH), 125.8 (CH), 125.9 (CH), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 130.7 (CH), 130.8 (CH), 130.9 (CH), 141.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 233.5$ Hz, C), 150.6 (C), 150.7 (C), 152.2 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 7.3$ Hz, C), 152.3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 6.9$ Hz, C), 159.2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20.3$ Hz, C), 159.4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20.4$ Hz, C), 176.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.2$ Hz, C), 176.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.6$ Hz, C), m/z (ES) 538.1 (MNa^+ , 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H_2O /MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, $\lambda = 275$ nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros con t_R 18.76 min. y t_R 20.44 min. (68 % : 30 %).

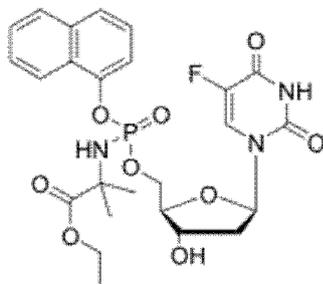
5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi- α,α -dimetilglicina)]fosfato (CPF395) (proporcionado como ejemplo de referencia)



El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.40 g, 1.62 mmol), *N*-metilimidazol (NMI) (0.64 mL, 8.0 mmol) 1-naftil(benzoxi- α,α -dimetilglicina) fosforocloridato (2.00 g, 4.80 mmol) de acuerdo con el procedimiento general **D**. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH_2Cl_2 hasta CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (16.4 mg, 6 %) [$R_f = 0.15$ (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa^+ , 650.1678. $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{NaPF}$ requiere $[\text{MNa}^+]$, 650.1680); ^{31}P RMN (202 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{P}}$ 2.87, 3.03; ^{19}F RMN (470 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{F}}$ -167.95, -167.13; ^1H RMN (500 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{H}}$ 1.37-1.42 (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.61-1.69 (m, 1H, $H-2'$, un diast.), 1.79-1.87 (m, 1H, $H-2'$, un diast.), 2.06 (ddd, 1H, $J = 3.0$ Hz, $J = 6.1$ Hz, $J = 13.6$ Hz, $H-2'$, un diast.), 2.15 (ddd, 1H, $J = 3.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz, $J = 13.7$ Hz, $H-2'$, un diast.), 3.98-4.04 (m, 1H, $H-4'$), 4.19-4.35 (m, 3H, CH_2OP , $H-3'$), 5.09-5.13 (m, 1H, OCHHPh), 5.18-5.19 (m, 1H, OCHHPh), 6.05-6.15 (m, 1H, $H-1'$), 7.28-7.40 (m, 7H, ArH), 7.48-7.55 (m, 3H, ArH), 7.62 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 6.4$ Hz, $H-6$, un diast.), 7.70 (d, $^3J_{\text{H-F}} = 6.4$ Hz, $H-6$, un diast.), 7.86-7.90 (m, 1H, ArH), 8.17-8.22 (m, 1H, ArH); ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): $^{\text{TM}}_{\text{C}}$ 27.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.4$ Hz, CH_3), 27.9 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, CH_3), 28.0 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, CH_3), 40.7 (CH_2), 40.8 (CH_2), 65.2 (C), 67.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, CH_2), 68.3 (CH_2), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2$ Hz, CH), 86.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.8$ Hz, CH), 86.9 (CH), 116.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.2$ Hz, CH), 116.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 2.9$ Hz, CH), 122.8 (CH), 122.9 (CH), 125.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (CH), 126.4 (CH), 126.5 (CH), 127.4 (CH), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 127.8 (CH), 127.9 (C), 128.0 (CH), 128.9 (CH), 129.3 (CH), 129.4 (CH), 129.6 (CH), 136.2 (C), 137.3 (C), 141.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 234.4$ Hz, C), 147.9 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.7$ Hz, C), 148.0 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.2$ Hz, C), 150.7

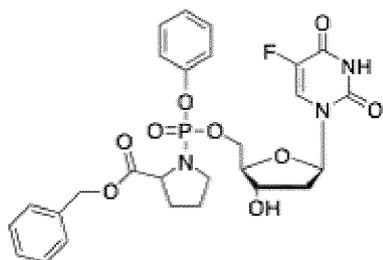
(d, $^4J_{C-F} = 3.7$ Hz, C), 159.5 (d, $^2J_{C-F} = 25.8$ Hz, C), 159.6 (d, $^2J_{C-F} = 25.8$ Hz, C), 176.5 (C), 176.6 (C), m/z (ES) 650.0 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, $\lambda = 275$ nm, mostró dos picos de los diastereoisómeros $t_{R} 20.80$ min. y $t_{R} 21.00$ min. (72 % : 24 %).

5 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(etoxi- α,α -dimetilglicina)]fosfato (CPF396) (proporcionado como ejemplo de referencia)



20 El fosforamidato se preparó mediante el uso de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (0.40 g, 1.62 mmol), cloruro de *tert*-butilmagnesio en tetrahidrofurano (*t*BuMgCl) (1.0 M, 2.43 mL, 2.43 mmol) y 1-naftil(etoxi- α,α -dimetilglicina) fosforocloridato (1.14 g, 3.20 mmol) de acuerdo con el procedimiento general E. Purificación por cromatografía en columna de gradiente mediante elución con CH₂Cl₂ hasta CH₂Cl₂-MeOH (95:5) proporcionó el compuesto del título como un sólido incoloro (54.0 mg, 2 %). [R_f = 0.10 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)], (Encontrado: MNa⁺, 588.1528. C₂₅H₂₉N₃O₉NaPF requiere [MNa⁺], 588.1523); ³¹P RMN (202 MHz, MeOD): δ_{PM} 2.91, 3.03; ¹⁹F RMN (470 MHz, MeOD): δ_F -167.38, -167.21; ¹H RMN (500 MHz, MeOD): δ_H 1.24 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃, un diast.), 1.50-1.55 (m, 6H, C(CH₃)₂), 1.68-1.76 (m, 1H, *H*-2', un diast.), 1.87-1.94 (m, 1H, *H*-2', un diast.), 2.09 (ddd, 1H, *J* = 2.9 Hz, *J* = 6.3 Hz, *J* = 13.4 Hz, *H*-2', un diast.), 2.19 (ddd, 1H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 6.3 Hz, *J* = 13.8 Hz, *H*-2', un diast.), 4.07-4.10 (m, 1H, *H*-4'), 4.16 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 4.36-4.41 (m, 3H, CH₂OP, *H*-3'), 6.10-6.18 (m, 1H, *H*-1'), 7.40-7.46 (m, 1H, ArH), 7.50-7.59 (m, 3H, ArH), 7.66-7.72 (m, 2H, ArH, *H*-6), 7.85-7.91 (m, 1H, ArH), 8.18-8.24 (m, 1H, ArH); ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): δ_C 14.4 (CH₃), 27.5 (br s, CH₃), 27.9 (d, $^3J_{C-P} = 6.1$ Hz, CH₃), 28.0 (d, $^3J_{C-P} = 6.1$ Hz, CH₃), 40.7 (CH₂), 40.8 (CH₂), 58.2 (C), 58.3 (C), 62.6 (CH₂), 67.8 (d, $^2J_{C-P} = 4.9$ Hz, CH₂), 67.9 (d, $^2J_{C-P} = 4.5$ Hz, CH₂), 72.0 (CH), 72.1 (CH), 86.7 (d, $^3J_{C-P} = 7.7$ Hz, CH), 86.9 (d, $^3J_{C-P} = 7.3$ Hz, CH), 87.0 (CH), 116.3 (d, $^3J_{C-P} = 3.2$ Hz, CH), 116.6 (d, $^3J_{C-P} = 2.9$ Hz, CH), 122.8 (CH), 122.9 (CH), 125.4 (CH), 125.6 (CH), 125.7 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (CH), 126.5 (CH), 127.4 (CH), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 127.8 (CH), 127.9 (C), 128.0 (C), 128.9 (CH), 136.2 (C), 141.8 (d, $^1J_{C-F} = 233.5$ Hz, C), 148.0 (d, $^2J_{C-P} = 7.3$ Hz, C), 148.1 (d, $^2J_{C-P} = 7.6$ Hz, C), 150.5 (C), 150.6 (C), 159.3 (d, $^2J_{C-F} = 26.2$ Hz, C), 159.4 (d, $^2J_{C-F} = 26.6$ Hz, C), 176.8 (C), 176.9 (C); m/z (ES) 588.1 (MNa⁺, 100 %); HPLC de fase inversa eluyendo con H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 45 minutos, 1 mL/min, $\lambda = 275$ nm, mostró un pico de la mezcla de diastereoisómeros $t_{R} 16.05$ min. (96 %).

40 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-prolinil)]fosfato (CPF583) (proporcionado como ejemplo de referencia)



55 Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar D a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y fenil(benzoxi-L-prolinil)-fosforocloridato (0.77 g, 2.03 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna seguida de dos purificaciones por TLC preparativas dio el producto como un sólido blanco (0.010 g, 2 %).

³¹P-RMN (MeOD, 202 MHz) δ 1.82

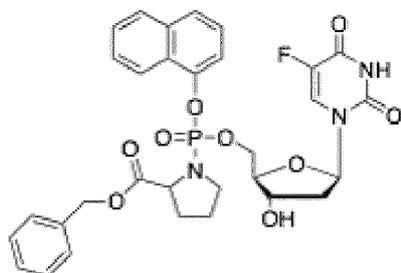
¹⁹F-RMN (MeOD, 470 MHz) δ -167.91

60 ¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 7.84 (d, *J* = 7.18 Hz, 1H, *H*-base), 7.39 - 7.33 (m, 7H, *H*-Ar), 7.22 - 7.19 (m, 3H, *H*-Ar), 6.26 - 6.23 (m, 1H, *H*-1'), 5.22 - 5.13 (m, CH₂Ph éster), 4.40 - 4.35 (m, 3H, NCH, 2 x *H*-5'), 4.33 - 4.28 (m, 1H, *H*-3'), 4.06 - 4.04 (m, 1H, *H*-4'), 3.36 - 3.32 (m, 2H, NCH₂), 2.26 - 2.19 (m, 1H, *H*-2'), 2.18 - 2.13 (m, 1H, CH₂-L-Pro), 2.00 - 1.81 (m, 4H, 3 x H, CH₂-L-Pro, 1 x H, *H*-2')

65 ¹³C-RMN (MeOD, 125 MHz) δ 174.81 (C=O, éster), 159.40 (C=O, base), 152.0 (d, $^2J_{C-P} = 6.32$ Hz, OC-Ar), 150.71 (C=O, base), 141.88 ($^1J_{C-F} = 232$ Hz, CF, base), 137.23 (CAr), 131.33, 129.70, 129.48, 129.45, 129.30, 126.45 (CH-Ar), 125.80, 125.53 (2 x d, $^2J_{C-F} = 29.0$ Hz, CH-base), 121.00, 120.96 (CH-Ar), 87.80 (C-1'), 86.80 (C-4'), 72.02 (C-3'), 68.16 (CH₂Ph), 67.64 (d, $^2J_{C-P} = 4.65$ Hz, C-5'), 62.40 (d, $^2J_{C-P} = 5.60$ Hz, NCH), 48.03 (d, $^2J_{C-P} = 4.80$ Hz, NCH₂), 41.07 (C-2'), 32.18, 32.11 (CH₂-L-Pro), 26.29, 26.21 (CH₂-L-Pro).

MS (ES+) m/e: 612 (MNa⁺, 100%), 590 (MH⁺, 1 %) Masa exacta: C₂₇H₂₉FN₃O₉P requirió 589.51

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-prolinil)]fosfato (CPF577) (proporcionado como ejemplo de referencia)



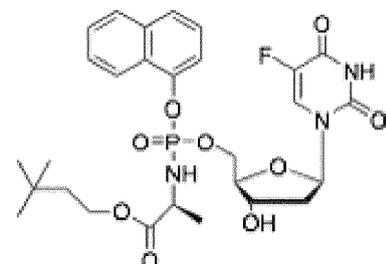
Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil(benzoxi-L-prolinil)-fosfocloridato (0.84 g, 2.03 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna seguida de dos purificaciones por TLC preparativas dio el producto como un sólido blanco (0.006 g, 1 %).

³¹P-RMN (MeOD, 202 MHz) δ 2.27

¹⁹F-RMN (MeOD, 121 MHz) δ - 167.46

¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.14 - 8.12 (m, 1H, *H*-Ar), 7.90 - 7.89 (m, 1H, *H*-Ar), 7.74 - 7.71 (m, 2H, 1 x *H*-Ar, 1 x *H*-base), 7.56 - 7.42 (m, 4H, *H*-Ar), 7.36 - 7.33 (m, 5H, *H*-Ar), 6.13 (t, *J* = 6.38 Hz, *H*-1'), 5.22 - 5.13 (m, 2H, CH₂Ph), 4.49 - 4.46 (m, 1H, NCH), 4.42 - 4.33 (m, 2H, *H*-5'), 4.25 - 4.23 (m, 1H, *H*-3'), 4.06 - 4.04 (m, 1H, *H*-4'), 3.36 - 3.34 (m, 2H, NCH₂), 2.23 - 2.15 (m, 1H, CH₂-L-Pro), 2.10 - 2.02 (m, 2H, 1 x H, CH₂-L-Pro, 1 x H, *H*-2'), 1.97 - 1.77 (m, 2H, CH₂-L-Pro), 1.63 - 1.57 (m, 1H, *H*-2') ¹³C-RMN (MeOD, 125 MHz) δ 174.82 (C=O, éster), 159.52 (C=O, base), 150.54 (C=O, base), 147.84, 147.78 (d, ²*J*_{C-P} = 6.03 Hz, OC-Ar), 141.75, 139.97 (2 x d, ¹*J*_{C-F} = 232 Hz, CF, base), 137.20, 136.34 (C-Ar), 129.76, 129.65, 129.44, 129.36, 129.27, 129.06, 128.95, 128.04, 128.75, 126.56 (CH-Ar), 125.41 (d, ²*J*_{C-F} = 30.0 Hz, CH-base), 122.13 (CH-Ar), 115.76 (d, ³*J*_{C-P} = 3.3 Hz, CH-Ar), 87.06 (C-1'), 86.79 (C-4'), 72.23 (C-3'), 68.15 (d, ²*J*_{C-P} = 5.46 Hz, C-5'), 68.08 (CH₂Ph), 62.53 (d, ²*J*_{C-P} = 5.60 Hz, NCH), 48.26 (d, ²*J*_{C-P} = 5.34 Hz, NCH₂), 40.97 (C-2'), 32.16, 32.09 (CH₂-L-Pro), 26.22, 26.15 (CH₂-L-Pro).

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(3,3-dimetil-1-butoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF585) (proporcionado como ejemplo de referencia)



Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil(3,3-dimetil-1-butoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (1.21 g, 3.04 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna seguida de dos purificaciones por TLC preparativas dio el producto como un sólido blanco (0.010 g, 2 %).

³¹P-RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.48, 4.33

¹⁹F-RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.30, - 167.47

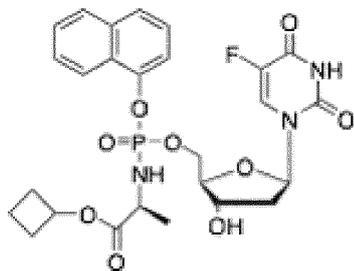
¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.20 - 8.17 (m, 1H, *H*-Ar), 7.91 - 7.89 (m, 1H, *H*-Ar), 7.77 - 7.72 (m, 2H, *H*-Ar), 7.58 - 7.51 (m, 3H, *H*-base, 2 x *H*-Ar), 7.46 - 7.41 (2 x t, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*-Ar), 6.19 - 6.13 (m, 1H, *H*-1'), 4.42 - 4.40 (m, 1H, 1 x *H*-5'), 4.38 - 4.32 (m, 2H, *H*-3', 1 x *H*-5'), 4.14 - 4.00 (m, 4H, *H*-4', CHCH₃, OCH₂CH₂(CH₃)₃), 2.21 - 2.13 (m, 1H, 1 x *H*-2'), 1.91 - 1.76 (m, 1H, 1 x *H*-2'), 1.52 - 1.48 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₃)₃), 1.37 - 1.35 (m, 3H, CHCH₃), 0.92, 0.91 (2 x s, 9H, OCH₂CH₂(CH₃)₃) ¹³C-RMN (MeOD, 125 MHz) δ 175.16, 174.84 (2 x d, ³*J*_{C-P} = 4.75 Hz, C=O, éster), 159.56, 159.35 (C=O, éster), 150.61 (C=O, éster), 148.00, 147.86 (2 x d, ²*J*_{C-P} = 6.25 Hz, OC-Ar), 141.78, 141.73 (2 x d, ¹*J*_{C-F} = 232 Hz, CF, base), 136.28 (C-Ar), 128.98, 128.95, 127.92, 127.90, 127.58, 126.57, 126.20, 126.14 (CH-Ar), 125.63, 125.55 (2 x d, ²*J*_{C-F} = 34 Hz, CH, base), 122.65, 122.63 (CH-Ar), 116.48, 116.15 (2 x d, ³*J*_{C-P} = 3.0 Hz, CH-Ar), 87.01, 86.94 (C-1'), 86.73, 86.68 (d, ³*J*_{C-P} = 7.75 Hz, C-4'), 72.18, 72.07 (C-3'), 67.87, 67.85 (2 x d, ²*J*_{C-P} = 5.0 Hz, C-5'), 64.08, 64.05 (OCH₂CH₂(CH₃)₃), 51.86 (d, ³*J*_{C-P} = 5.5 Hz, CHCH₃), 42.74 (OCH₂CH₂(CH₃)₃), 40.91, 40.83 (C-2'), 29.96 (OCH₂CH₂(CH₃)₃), 20.50, 20.34 (2 x d, ³*J*_{C-P} = 6.5 Hz, CHCH₃).

MS (ES+) m/e: 630 (MNa⁺, 100 %), 608 (MH⁺, 10 %) Masa exacta: C₂₈H₃₅FN₃O₉P requirió 607.56

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(ciclobutoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF578) (proporcionado como ejemplo de referencia)

5

10



15

20

25

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.23 g, 0.93 mmol), NMI (0.38 g, 4.67 mmol, 0.37 mL) y 1-naftil-(ciclobutoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.85 g, 2.33 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna seguida de purificación por TLC preparativa dio el producto como un sólido blanco (0.010 g, 2 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.54, 4.36

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.12, - 167.29

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.18 - 8.17 (m, 1H, *H*-Ar), 7.81 - 7.87 (m, 1H, *H*-Ar), 7.74 - 7.71 (m, 2H, 1 x *H*-Ar, 1 x *H*-base), 7.60 - 7.53 (m, 3H, *H*-Ar), 7.46 - 7.43 (2 x t, $J = 8.0$ Hz, 1H, *H*-Ar), 6.18 - 6.12 (m, 1H, *H*-1'), 5.00 - 4.95 (m, 1H, OCH éster), 4.41 - 4.36 (m, 3H, 2 x *H*-5', *H*-3'), 4.11 - 4.00 (m, 2H, *H*-4', CHCH₃), 2.36 - 2.27 (m, 2H, CH₂), 2.18 - 1.98 (m, 3H, CH₂ éster, 1 x *H*-2'), 1.82 - 1.56 (m, 3H, CH₂ éster, 1 x *H*-2'), 1.36 - 1.34 (m, 3H, CHCH₃)

^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 175.97, 173.34 (C=O, éster), 159.88 (C=O, base), 151.64 (C=O, base), 146.58 (OC-Ar), 141.15 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 220$ Hz, CF, base), 136.28 (CAr), 128.93, 127.89, 127.54, 126.52, 126.18, 126.14 (CH-Ar), 125.53, 125.44 (2 x d, $^2J_{\text{C-F}} = 32.5$ Hz, CH-base), 122.63 (CH-Ar), 116.46, 116.44 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 2.5$ Hz, CH-Ar), 86.98 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.25$ Hz, C-4'), 86.71 (C-1'), 72.14, 72.04 (C-3'), 71.07 (OCH éster), 67.83 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.38$ Hz, C-5'), 51.66 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 8.75$ Hz, CHCH₃), 40.89, 40.83 (C-2'), 31.03 (OCHCH₂), 20.43 (CHCH₃), 14.23 (CH₂ éster).

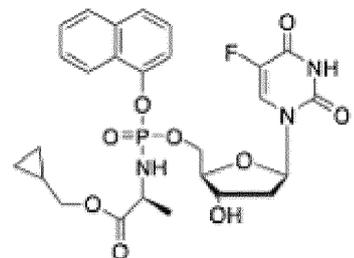
MS (ES+) *m/e*: 600 (MNa⁺, 100 %), 578 (MH⁺, 10 %) Masa exacta: C₂₆H₂₉FN₃O₉P requirió 577.50

30

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil-(ciclopropilmetanoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF579) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35

40



45

50

55

60

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil-(ciclopropilmetanoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.93 g, 2.54 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.056 g, 10 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.58, 4.30

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.18, - 167.22

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.18 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, *H*-Ar), 7.89 - 7.87 (m, 1H, *H*-Ar), 7.73 - 7.70 (m, 2H, *H*-Ar), 7.58 - 7.53 (m, 3H, *H*-Ar), 7.45 - 7.40 (2 x t, $J = 8.0$ Hz, 1H, *H*-Ar), 6.17 - 6.11 (m, 1H, *H*-1'), 4.43 - 4.41 (m, 1H, *H*-5'), 4.38 - 4.32 (m, 2H, *H*-5', *H*-3'), 4.11 - 4.04 (m, 2H, *H*-4', CHCH₃), 3.95 - 3.85 (m, 2H, OCH₂ éster), 2.19 - 2.11 (m, 1H, *H*-2'), 1.84 - 1.72 (m, 1H, *H*-2'), 1.38, 1.36 (2 x d, $J = 5.0$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.15 - 1.07 (m, 1H, OCH₂CH éster), 0.59 - 0.50 (m, 2H, CH₂ éster), 0.30 - 0.24 (m, 2H, CH₂ éster)

^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 175.25, 174.94 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.75$ Hz, C=O, éster), 159.54, 159.35 (C=O, base), 150.60, 150.56 (C=O, base), 148.05, 147.86 (2 x d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, OC-Ar), 141.79, 141.73 (2 x d, $^1J_{\text{C-F}} = 232$ Hz, CF, base), 136.29 (C-Ar), 128.94 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 4.4$ Hz, CH-Ar), 127.89 (d, $^4J_{\text{C-P}} = 3.7$ Hz, CH-Ar), 127.56, 126.55, 126.52, 126.19, 126.16 (CH-Ar), 125.64, 125.53 ($^2J_{\text{C-F}} = 34$ Hz, CH-base), 122.65 (CH-Ar), 116.54, 116.24 (2 x d, $^4J_{\text{C-P}} = 2.6$ Hz, CH-Ar), 87.04, 86.99 (C-1'), 86.90, 86.73 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C-4'), 72.18, 72.07 (C-3'), 71.21, 71.18 (OCH₂, éster), 67.87, 67.84 (t aparente, $^2J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, C-5'), 51.88 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 10.0$ Hz, CHCH₃), 40.91, 40.83 (C-2'), 20.60, 20.46 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, CHCH₃), 10.69 (OCH₂CH éster), 3.70, 3.65 (2 x CH₂, éster).

MS (ES+) *m/e*: 600 (MNa⁺, 100 %), 578 (MH⁺, 15 %) Masa exacta: C₂₆H₂₉FN₃O₉P requirió 577.50.

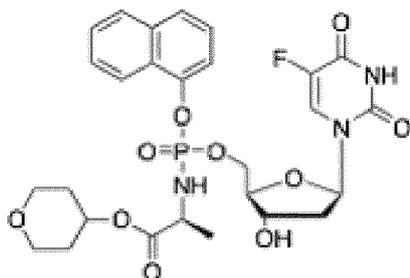
HPLC_b (H₂O/Acetonitrilo de 100/0 a 0/100 en 35 min) TA 12.91 min.

65

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil-(tetrahidropiroxi-L-alaninil)]fosfato (CPF580) (proporcionado como ejemplo de referencia)

5

10



15

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar E a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), *t*BuMgCl (1.1 mL, 1.1 mmol) y 1-naftil-(tetrahidropiroxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.80 g, 2.03 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna seguida de dos purificaciones por TLC preparativas dio el producto como un sólido blanco (0.010 g, 1.6 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 3.77, 3.22

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 168.27, - 168.35

20

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.60 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, *H*-Ar), 8.22 - 8.19 (m, 1H, *H*-Ar), 7.92 - 7.91 (d, $J = 5.50$ Hz, 1H, *H*-Ar), 7.60 - 7.45 (m, 4H, *H*-Ar, *H*-base), 6.29 - 6.25 (m, 1H, *H*-1'), 5.25 - 5.17 (m, 1H, *H*-3'), 4.96 - 4.87 (m, 1H, *CH*-éster), 4.28 - 4.26 (m, 1H, *H*-4'), 4.11 - 4.03 (m, 1H, *CHCH*₃), 3.88 - 3.66 (m, 4H, 2 x *OCH*_{2a}' éster, 2 x *H*-5'), 3.55 - 3.50 (m, 2H, 2 x *OCH*_{2a}' éster), 2.63 - 2.30 (m, 2H, *H*-2'), 1.91 - 1.85 (m, 2H, 2 x *CH*_{2b}' éster), 1.65 - 1.54 (m, 2H, *CH*_{2b}' éster), 1.39 - 1.35 (m, 3H, *CHCH*₃). ^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 174.34 (C=O, éster), 159.24 (C=O, base), 150.76 (C=O, base), 148.03 (OC-Ar), 141.97 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 238$ Hz, CF, base), 136.37 (C-Ar), 128.97, 128.56, 127.61, 127.57, 126.58, 126.23, 126.16, 126.12, 125.84 (CH-Ar), 122.70 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24.0$ Hz, CH-base), 116.62, 116.37 (CH-Ar), 87.54 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.40$ Hz, C-4'), 86.60, 86.57 (C-1'), 79.82, 79.47 (C-3'), 71.45 (CH-éster), 66.12, 66.08 (2 x *OCH*_{2a}' éster), 66.02 (C-5'), 51.83 (CHCH₃), 39.97, 39.94 (C-2'), 32.65, 32.57 (2 x *CH*_{2b}' éster), 20.45, 20.30 (CHCH₃).

25

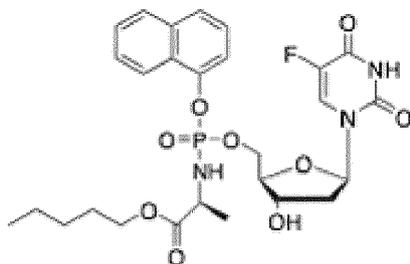
MS (ES+) *m/e*: 630 (MNa⁺, 100 %), 608 (MH⁺, 10 %) Masa exacta: C₂₇H₃₁FN₃O₁₀P requirió 607.52.

30

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF581) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35

40



45

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar E a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), *t*BuMgCl (1.1 mL, 1.1 mmol) y 1-naftil-(pentoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.78 g, 2.03 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.047 g, 8 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.48, 4.32

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.18, - 167.29

50

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.25 - 8.17 (m, 1H, *H*-Ar), 8.05 - 7.95 (m, 2H, *H*-Ar), 7.85 - 7.60 (m, 2H, *H*-Ar, *H*-base), 7.65 - 7.48 (m, 3H, *H*-Ar), 6.30 - 6.18 (m, 1H, *H*-1'), 4.60 - 4.37 (m, 3H, 2 x *H*-5', *H*-3'), 4.28 - 4.00 (m, 4H, *H*-4', *CHCH*₃, *OCH*₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.32 - 2.12 (m, 1H, *H*-2'), 1.95 - 1.75 (m, 1H, *H*-2'), 1.70 - 1.55 (m, 2H, *OCH*₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.50 - 1.28 (m, 7H, 4 x H *OCH*₂CH₂CH₂CH₂CH₃, *CHCH*₃), 0.83, 0.82 (2 x d, $J = 7.9$ Hz, 3H, *OCH*₂CH₂CH₂CH₂CH₃) ^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 175.22, 174.91 (C=O, éster), 159.5 (C=O, base), 150.54 (C=O, base), 147.90, 147.88 (OC-Ar), 141.75 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 225$ Hz, CF, base), 136.37 (CAr), 128.95, 127.90, 127.56, 126.55, 126.19 (CH-Ar), 125.64, 125.53 (2 x d, $^2J_{\text{C-F}} = 34.0$ Hz, CH-base), 122.65 (CH-Ar), 116.51, 116.21 (CH-Ar), 87.03, 86.96 (C-1'), 86.85, 86.74 (C-4'), 72.16, 72.05 (C-3'), 67.87 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, C-5'), 66.54 (*OCH*₂), 51.87, 51.81 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, *CHCH*₃), 40.87, 40.80 (C-2'), 29.35, 29.10 (CH₂ éster), 23.33 (CH₂ éster), 20.60, 20.43 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, *CHCH*₃), 14.28 (CH₃, éster).

55

MS (ES+) *m/e*: 616 (MNa⁺, 100 %), 594 (MH⁺, 10 %) Masa exacta: C₂₇H₃₃FN₃O₉P requirió 593.54.

HPLC_b (H₂O/Acetonitrilo de 100/0 a 0/100 en 35 min) TA 15.56 min.

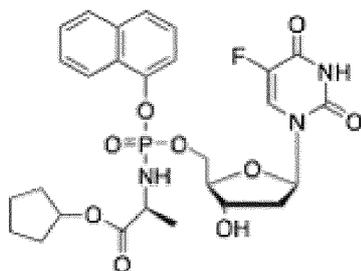
60

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil-(ciclopentoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF582) (proporcionado como ejemplo de referencia)

65

5

10



15

20

25

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar E a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), *t*BuMgCl (1.1 mL, 1.1 mmol) y 1-naftil-(ciclopentoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.77 g, 2.03 mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.030 g, 5 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.53, 4.37

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.07, - 167.19

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.18 - 8.16 (m, 1H, *H*-Ar), 7.89 - 7.85 (m, 1H, *H*-Ar), 7.70 (t aparente, $J = 6.50$ Hz, 2H, *H*-Ar), 7.57 - 7.50 (m, 3H, 2 x *H*-Ar, *H*-base), 7.45 - 7.40 (m, 1H, *H*-Ar), 6.16 - 6.11 (m, 1H, *H*-1'), 5.15 - 5.09 (m, 1H, OCH éster), 4.41 - 4.30 (m, 3H, 2 x *H*-5', *H*-3'), 4.11 - 4.08 (m, 1H, *H*-4'), 4.04 - 3.98 (m, 1H, CHCH₃), 2.19 - 2.10 (m, 1H, *H*-2'), 1.86 - 1.73 (m, 3H, OCHCH₂ éster), 1.73 - 1.56 (m, 6H, *H*-2', CH₂ éster), 1.35, 1.34 (2 x d, $J = 6.57$ Hz, CHCH₃)

^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 174.68, 174.64 (C=O, éster), 159.27 (C=O, base), 150.51 (C=O, base), 147.86 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, OC-Ar), 141.78, 141.72 (2 x d, $^1J_{\text{C-F}} = 232$ Hz, CF-base), 136.30 (C-Ar), 128.95, 128.54, 127.94, 127.80, 127.60, 127.56, 127.17, 126.80, 126.54, 126.19, 126.16 (CH-Ar), 125.66, 125.53 (2 x d, $^2J_{\text{C-F}} = 34$ Hz, CH-base), 122.65, 122.61 (CH-Ar), 116.53, 116.22 (2 x d, $^4J_{\text{C-P}} = 3.75$ Hz, CH-Ar), 86.99, 86.96 (C-1'), 86.70 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.50$ Hz, C-4'), 79.64, 79.61 (OCH éster), 72.21, 72.07 (C-3'), 67.89, 67.85 (2 x d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, C-5'), 51.92 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.0$ Hz, CHCH₃), 40.92, 40.86 (C-2'), 33.65, 33.61, 33.52, 33.47 (2 x CH₂ éster), 24.68, 24.66 (CH₂ éster), 20.45, 20.30 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.25$ Hz, CHCH₃).

MS (ES+) *m/e*: 614 (MNa⁺, 100 %), 592 (MH⁺, 30 %) Masa exacta: C₂₇H₃₁FN₃O₉P requirió 591.52

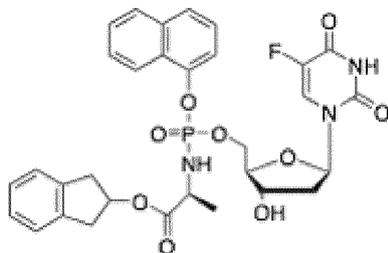
HPLC_b (H₂O/Acetonitrilo de 100/0 a 0/100 en 35 min) TA 14.03 min.

30

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(2-indanoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF597) (proporcionado como ejemplo de referencia)

35

40



45

50

55

60

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar E a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.30 g, 1.22 mmol), *t*BuMgCl (1.34 mL, 1.34 mmol) y 1-naftil-(2-indanoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (1.06 g, 2.43 mmol) en THF (20 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.045 g, 6 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.62, 4.30

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.14, - 167.34

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.15 - 8.12 (m, 1H, *H*-Ar, Naph), 7.89 - 7.87 (m, 1H, *H*-Ar, Naph), 7.72 - 7.67 (m, 2H, *H*-Ar, Naph), 7.56 - 7.46 (m, 3H, 2 x *H*-Ar, *H*-base), 7.40 - 7.37 (m, 1H, *H*-Ar), 7.20 - 7.12 (m, 4H, *H*-Ar, Ph), 6.14 - 6.08 (m, 1H, *H*-1'), 5.49 - 5.46 (m, 1H, OCH éster), 4.32 - 4.26 (m, 3H, 2 x *H*-5', *H*-3'), 4.04 - 3.98 (m, 1H, *H*-4', CHCH₃), 3.30 - 3.24 (m, 2H, 2 x CH éster), 2.99 - 2.91 (m, 2H, 2 x CH éster), 2.14 - 2.07 (m, 1H, *H*-2'), 1.75 - 1.64 (m, 1H, *H*-2'), 1.33 - 1.29 (m, 3H, CHCH₃)

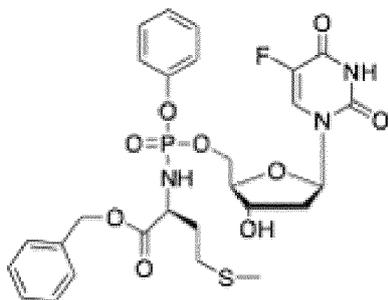
^{13}C -RMN (MeOD, 125 MHz) δ 175.02, 174.66 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.75$ Hz, C=O, éster), 159.48 ($^2J_{\text{C-F}} = 25.0$ Hz, C=O, base), 150.57 (C=O, base), 147.97, 147.80 (2 x d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.5$ Hz, OC-Ar), 141.73, 141.68 (2 x d, $^1J_{\text{C-F}} = 232.5$ Hz, CF-base), 141.54, 141.49, 141.48, 139.10, 136.27, 136.26 (C-Ar), 129.01, 128.94, 128.91, 127.91, 127.87, 128.85, 127.80, 127.77, 127.60, 127.57, 127.50, 126.20, 126.18, 125.69 (CH-Ar), 125.50, 125.43 (2 x d, $^2J_{\text{C-F}} = 25$ Hz, CH-base), 122.64, 122.60, 121.85 (CH-Ar), 116.57, 116.26 (2 x d, $^4J_{\text{C-P}} = 2.5$ Hz, CH-Ar), 86.96 (C-1'), 86.87, 86.66 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.50$ Hz, C-4'), 77.85, 79. (OCH éster), 72.21, 72.07 (C-3'), 67.77, 67.75 (2 x d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.25$ Hz, C-5'), 51.97, 51.82 (CHCH₃), 40.91, 40.86 (C-2'), 40.44, 40.43, 40.38, 40.34 (2 x CH₂ éster), 20.30, 20.16 (2 x d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.25$ Hz, CHCH₃)

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-metioninil)]fosfato (CPF586) (proporcionado como ejemplo de referencia)

65

5

10



15

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y fenil(benzoxi-L-metioninil)-fosfocloridato (0.7 g, mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido amarillento (0.014 g, 2 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.34, 3.94

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.40, - 167.69

20

^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 7.83 - 7.80 (m, 1H, *H*-Ar), 7.74 - 7.72 (m, 1H, *H*-Ar), 7.64 - 7.62 (m, 1H, *H*-Ar), 7.37 - 7.32 (m, 6H, *H*-Ar, *H*-base), 7.26 - 7.17 (m, 2H, *H*-Ar), 6.25 - 6.17 (m, 1H, *H*-1'), 5.18, 5.13 (sistema AB, $J_{\text{AB}} = 12.0$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.40 - 4.35 (m, 1H, *H*-3'), 4.32 - 4.22 (m, 2H, *H*-5'), 4.16 - 4.03 (m, 2H, NHCH, *H*-4'), 2.44, 2.36 (2 x t, $J = 7.50$ Hz, CH_2S), 2.16 - 2.08 (m, 1H, 1 x *H*-2'), 1.98 - 1.82 (m, 6H, 1 x *H*-2', NHCHCH $_2$ CH $_2$ SCH $_3$),

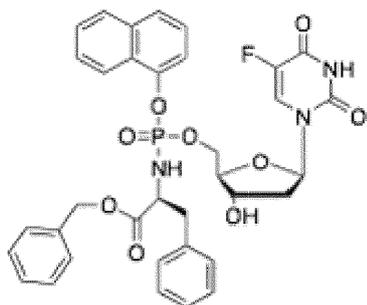
MS (ES+) *m/e*: 646 (MNa $^+$, 100 %), 624 (MH $^+$, 10 %) Masa exacta: C $_{27}$ H $_{31}$ FN $_3$ O $_9$ P requirió 623.56

25

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-fenilalaninil)]fosfato (CPF587) (proporcionado como ejemplo de referencia)

30

35



40

Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil(benzoxi-L-fenilalaninil)-fosfocloridato (1.45 g, mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.007 g, 1 %).

^{31}P -RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.27, 4.14

^{19}F -RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 166.99, - 167.18

45

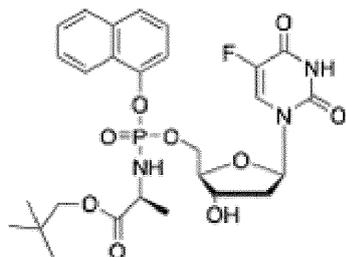
^1H -RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.11 - 8.00 (m, 1H, *H*-Ar, Ar), 7.89 - 7.85 (m, 1H, *H*-Ar), 7.69 - 7.67 (m, 1H, *H*-Ar), 7.60 - 7.49 (m, 3H, 2 x *H*-Ar, *H*-base), 7.37 - 7.33 (m, 2H, *H*-Ar), 7.25 - 7.12 (m, 10H, *H*-Ar), 6.09 - 6.04 (m, 1H, *H*-1'), 5.11 - 5.01 (m, 2H, CH_2Ph), 4.29 - 4.18 (m, 1H, CHCH $_3$), 4.15 - 4.08 (m, 1H, *H*-3'), 4.02 - 3.95 (m, 2H, *H*-5'), 3.86 - 3.67 (m, 1H, *H*-4'), 3.14 - 3.10 (m, 1H, 1 x NHCHCH $_2$ Ph), 2.91 - 2.82 (m, 1H, 1 x NHCHCH $_2$ Ph), 2.12 - 2.06, 2.00 - 1.95 (2 x m, 1H, *H*-2'), 1.68 - 1.62, 1.42 - 1.36 (2 x m, 1H, *H*-2')

50

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(2,2-dimetilpropoxi-L-alaninil)]fosfato (CPF588) (proporcionado como ejemplo de referencia)

55

60



65

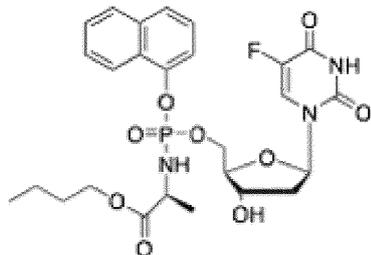
Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil-(2,2-dimetilpropoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.77, mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.006 g, 1 %).

³¹P-RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.56, 4.33

¹⁹F-RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.32, - 167.43

¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.19 - 8.16 (m, 1H, *H*-Ar, Ar), 7.91 - 7.89 (m, 1H, *H*-Ar), 7.74 - 7.71 (m, 2H, *H*-Ar), 7.57 - 7.51 (m, 3H, 2 x *H*-Ar, *H*-base), 7.46 - 7.41 (m, 1H, *H*-Ar), 6.17 - 6.10 (m, 1H, *H*-1'), 4.42 - 4.30 (m, 3H, *H*-3', 2 x *H*-5'), 4.13 - 4.07 (m, 2H, *H*-4', *CHCH*₃), 3.86, 3.75 (sistema AB, *J*_{AB} = 10.50 Hz, 2H, *CH*₂*C*(*CH*₃)₃), 2.18 - 2.10 (m, 1H, *H*-2'), 1.81 - 1.70 (m, 1H, *H*-2'), 1.41 - 1.38 (m, 3H, *CHCH*₃), 0.95, 0.94 (2 x s, 9H, *CH*₂*C*(*CH*₃)₃)

5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil-(butoxi-L-alaninil)] fosfato (CPF589) (proporcionado como ejemplo de referencia)



Se preparó de acuerdo con el procedimiento estándar **D** a partir de 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (0.25 g, 1.01 mmol), NMI (0.41 g, 5.07 mmol, 0.40 mL) y 1-naftil-(butoxi-L-alaninil)-fosfocloridato (0.75 g, mmol) en THF (10 mL). La purificación en columna dio el producto como un sólido blanco (0.006 g, 1 %).

³¹P-RMN (MeOD, 202 MHz) δ 4.52, 4.35

¹⁹F-RMN (MeOD, 470 MHz) δ - 167.36, - 167.49

¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ 8.19 - 8.16 (m, 1H, *H*-Ar, Naph), 7.1 - 7.89 (m, 1H, *H*-Ar, Naph), 7.75 - 7.72 (m, 2H, *H*-Ar, Naph), 7.58 - 7.51 (m, 3H, 2 x *H*-Ar, *H*-base), 7.46 - 7.41 (m, 1H, *H*-Ar), 6.18 - 6.11 (m, 1H, *H*-1'), 4.42 - 4.40 (m, 1H, 1 x *H*-5'), 4.37 - 4.32 (m, 2H, 1 x *H*-5', *H*-3'), 4.12 - 4.01 (m, 4H, *H*-4', *CHCH*₃, *OCH*₂ *CH*₂*CH*₂*CH*₃), 2.20 - 2.12 (m, 1H, *H*-2'), 1.85 - 1.73 (m, 1H, *H*-2'), 1.61 - 1.54 (m, 2H, *OCH*₂*CH*₂*CH*₂*CH*₃), 1.39 - 1.31 (m, 5H, *OCH*₂*CH*₂*CH*₂*CH*₃, *CHCH*₃), 0.93 - 0.89 (m, 3H, *OCH*₂*CH*₂*CH*₂*CH*₃)

35 Ensayos biológicos

Los datos experimentales que tienen que ver con los compuestos que encarnan la presente invención se describen más abajo.

40 Cultivo de células

Las células L1210/0 de leucemia de murino y CEM/0 de linfocitos T humanos se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Cultivos (ATCC) (Rockville, MD). Las células humanas de glioblastoma U87 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. E. Menue (Institut Pasteur, París, Francia). Las células deficientes en timidina quinasa CEM/TK⁻ fueron un amable obsequio del Prof. S. Eriksson (actualmente en la Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia) y del Prof. A. Karlsson (Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia). Las L1210/TK⁻ deficientes en timidina quinasa se derivaron a partir de células L1210/0 después de la selección para la resistencia contra 5-bromo-2'-dUrd (Balzarini y otros, 1982). La infección de líneas celulares relevantes con *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC) resultó en líneas celulares infectadas crónicamente más conocidas como L1210.Hyor y U87.Hyor. Todas las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Biocrom AG, Berlín, Alemania), Heps 10 mM y 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con una fase gaseosa de 5 % de CO₂.

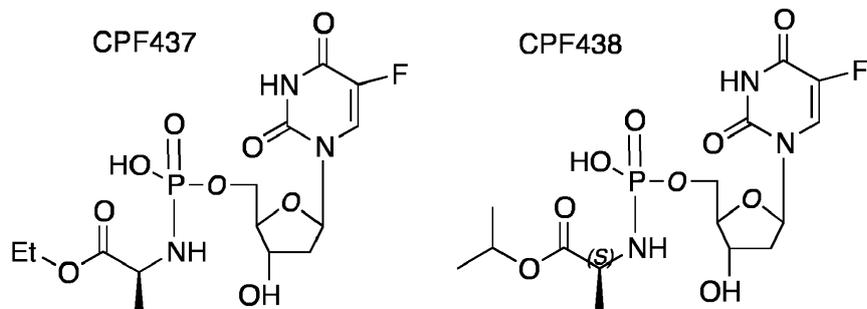
55 Ensayos citostáticos

Ensayos citostáticos Las células monocapas (U87 y U87.Hyor) se sembraron en placas de microvaloración de 48 pocillos (Nunc™, Roskilde, Dinamarca) a 10,000 células/pocillo. Después de 24 horas, se añadió un volumen igual de medio nuevo que contenía los compuestos de ensayo. El día 5, las células se digirieron con tripsina y se contaron en un contador Coulter (Analys, Suarlée, Bélgica). Las células en suspensión (L1210/0, L1210/TK⁻, L1210.Hyor, CEM/0, CEM/TK⁻) se sembraron en placas de microvaloración de 96 pocillos (Nunc™) a 60,000 células/pocillo en presencia de una cantidad dada de los compuestos de prueba. Las células se dejaron proliferar durante 48 h (L1210) o 72 horas (CEM) y después se contaron en un contador Coulter. La concentración inhibitoria de 50 % (IC₅₀) se definió como la concentración de compuesto requerida para reducir el número de células viables en un 50 %.

65 Ensayo 1. Las muestras se ensayaron para determinar la actividad biológica frente a una gama de líneas celulares tumorales con los datos registrados en la Tabla 1 más abajo. Los datos se expresan como CC₅₀ en μM, es decir,

concentración citostática requerida para inhibir la proliferación celular en un 50 %. Las líneas celulares empleadas fueron L1210/0 (una línea celular de leucemia), FM3A/0 (una línea celular de cáncer de mama), Cem/0 (una línea celular de leucemia linfoblástica aguda) y HeLa (una línea celular de cuello uterino).

La Tabla 1 contiene además datos comparativos para 5FU, 5-FdUrd y los compuestos de referencia CPF 382, CPF 437 y CPF 438. La estructura de CPF 382 se proporciona más arriba. La estructura de cada uno de CPF 437 y CPF 438 es la siguiente:



Como puede verse a partir de los datos en la Tabla 1, los compuestos de la presente invención pueden exhibir una actividad citostática que es comparable con o mejor que la del 5-FU, mientras que exhiben una actividad citostática marcada en células deficientes en nucleósido quinasas. Dicha actividad citostática en células deficientes en nucleótidos quinasas está en contraste directo con la de 5-FdUrd.

Como puede verse además a partir de la Tabla 1, la actividad en células TK⁻ de los compuestos que encarnan la presente invención puede ser marcadamente mayor que la de los compuestos de referencia CPF 382, CPF 437 y CPF 438.

Tabla 1

	L1210/0	L1210/TK ⁻	FM3A/0	FM3ArTK ⁻	Cem/0	Cem/TK ⁻	HeLa	HeLa/TK ⁻
5-FdUrd	0.00082 ± 0.00008	3.1 ± 0.2			0.028 ± 0.002	1.5 ± 0.1		
5-FdUrd (2)	0.0010 ± 0.0001	4.8 ± 4.0	0.0065 ± 0.0055	0.70 ± 0.02	0.026 ± 0.000	4.4 ± 2.9	0.029 ± 0.007	1.4 ± 0.5
5-FdUrd (3)	0.0011 ± 0.0002	3.0 ± 0.1			0.022 ± 0.006	3.0 ± 0.4	0.050 ± 0.011	1.4 ± 0.4
FU	0.33 ± 0.17	0.32 ± 0.31	0.18 ± 0.02		18 ± 5		0.54 ± 0.12	
CPF 382(1)	0.0255	37.8			0.346	32.7		
CPF 382(2)	0.0271	39.3			0.21	29.2		
CPF 437	36 ± 5	> 100			> 100	> 100	> 100	> 100
CPF 438	0.12 ± 0.02	51 ± 9			2.1 ± 0.6	32 ± 2	3.7 ± 0.5	72 ± 0

ES 2 686 219 T3

CPF 373	0.015 ± 0.007	0.027 ± 0.004			0.089 ± 0.043	0.32 ± 0.07		
CPF 373(2)	0.0061 ± 0.0043	0.064 ± 0.028	0.059 ± 0.046	0.74 ± 0.18	0.046 ± 0.010	0.74 ± 0.63	0.065 ± 0.013	2.5 ± 1.3
CPF 381	0.028 ± 0.007	13 ± 8			0.18 ± 0.03	22 ± 7		
CPF 383	0.13 ± 0.04	0.94 ± 0.18	0.64 ± 0.57	4.1 ± 2.0	0.92 ± 0.11	14 ± 0	0.48 ± 0.19	9.8 ± 1.4
CPF 384	0.076 ± 0.022	1.1 ± 0.1	0.36 ± 0.25	13 ± 1	1.0 ± 0.1	30 ± 10	0.71 ± 0.15	25 ± 11
CPF 386	0.031 ± 0.005	0.36 ± 0.01			0.25 ± 0.04	1.6 ± 0.2	0.22 ± 0.04	2.8 ± 0.0
CPF 393	0.017 ± 0.003	0.18 ± 0.05			0.23 ± 0.04	4.8 ± 0.7		
CPF 394	0.039 ± 0.001	4.6 ± 0.0			0.65 ± 0.16	22 ± 1		
CPF 395	0.011 ± 0.005	0.13 ± 0.04			0.16 ± 0.02	2.4 ± 0.8		
CPF 396	0.064 ± 0.008	0.82 ± 0.16			0.36 ± 0.05	6.9 ± 1.8		
CPF 508	0.039 ± 0.001	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.00		0.17 ± 0.07		0.18 ± 0.05	
CPF 509	0.043 ± 0.023	0.15 ± 0.00	0.31 ± 0.06		0.057 ± 0.055		0.090 ± 0.014	
CPF 576	1.1 ± 0.5	35 ± 8			0.80 ± 0.28	46 ± 14	0.67 ± 0.03	27 ± 6
CPF 577	0.21 ± 0.08	25 ± 8			0.89 ± 0.35	32 ± 9	1.2 ± 0.0	26 ± 1
CPF 578	0.014 ± 0.003	0.088 ± 0.038			0.073 ± 0.018	1.5 ± 0.3	0.069 ± 0.003	1.5 ± 0.6
CPF 579	0.017 ± 0.007	0.12 ± 0.06			0.059 ± 0.017	1.1 ± 0.2	0.068 ± 0.001	1.4 ± 0.4
CPF 580	0.038 ± 0.014	27 ± 6			0.11 ± 0.02	43 ± 12	0.13 ± 0.04	15 ± 7
CPF 581	0.0028 ± 0.0010	0.13 ± 0.13			0.015 ± 0.006	0.28 ± 0.04	0.029 ± 0.023	0.44 ± 0.35
CPF 582	0.031 ± 0.010	0.13 ± 0.02			0.035 ± 0.025	0.92 ± 0.007	0.071 ± 0.036	2.2 ± 1.3
CPF 583	0.35 ± 0.07	31 ± 5			0.98 ± 0.40	28 ± 8	1.1 ± 0.4	20 ± 11
CPF 585	0.016 ± 0.006	0.062 ± 0.009			0.053 ± 0.021	0.19 ± 0.04	0.078 ± 0.018	1.3 ± 0.9
CPF 586	0.073 ± 0.035	4.1 ± 1.2			0.28 ± 0.03	25 ± 0	0.15 ± 0.02	11 ± 7
CPF 587	0.012 ± 0.007	5.6 ± 1.3			0.10 ± 0.03	7.2 ± 0.1	0.16 ± 0.08	6.8 ± 1.5
CPF 588	0.27 ± 0.11	1.2 ± 0.7			0.49 ± 0.05	6.7 ± 1.0	0.70 ± 0.11	32 ± 26
CPF 589	0.022 ± 0.004	0.11 ± 0.06			0.064 ± 0.007	0.84 ± 0.60	0.12 ± 0.02	2.7 ± 1.5

Ensayo 2. Las muestras se ensayaron además para determinar su % de retención de actividad en células infectadas con micoplasmas. Los resultados se exponen en la Tabla 2 más abajo. Los resultados muestran que los compuestos de la presente invención pueden retener una alta actividad en células infectadas con micoplasmas, en contraste con la actividad mostrada por 5-FdUrd. La administración de un inhibidor de timidina fosforilasa (TP) restaura la actividad citostática de 5-FdUrd en cultivos de células infectadas con micoplasmas, lo que proporciona evidencia de la función deteriorante de TP en la actividad citostática final de 5-FdUrd. Como se sabe que la infección de las células por micoplasmas reduce en gran medida la actividad de los nucleósidos, que incluye 5-FdUrd, la actividad de algunos nucleósidos en las células infectadas por micoplasmas proporciona un beneficio potencial en pacientes que se infectan por micoplasmas.

10 Tabla 2.

15 Valores de CC50 en μM para 5-FdUrd y compuestos que encarnan la presente invención en células negativas y positivas para micoplasmas, y % de retención de actividad en la infección por micoplasma. "% de retención" es una medida de la relación de los valores de CC50 medidos con respecto a L1210 con respecto a aquellos para L1210/Hyor y se calcula como $\text{CC50}_{\text{L1210}} \times 100 \div \text{CC50}_{\text{L1210/Hyor}}$.

Comp.	L1210	L1210/Hyor	% Retención
5-FdUrd	0.00051	0.278	0.2
CPF 373	0.011	0.025	44
CPF 381	0.026	0.15	18
CPF 393	0.029	0.02	145
CPF 394	0.030	0.26	12
CPF 395	0.019	0.045	42
CPF 396	0.056	0.17	33
CPF 576	1.4	2.73	51
CPF 577	0.23	0.63	36
CPF 578	0.015	0.048	31
CPF 579	0.019	0.045	42
CPF 580	0.048	0.41	12
CPF 581	0.0037	0.017	22
CPF 582	0.035	0.042	83
CPF 583	0.387	11.9	3.3
CPF 585	0.021	0.051	41
CPF 586	0.1	0.87	11
CPF 587	0.022	4.2	0.5
CPF 588	0.237	0.39	61
CPF 589	0.02	0.063	32

Se llevaron a cabo otros experimentos (Ensayos 3 a 8 más abajo) con respecto al compuesto CPF 373 que encarna la presente invención.

Ensayo 3. Actividad citostática de 5-FdUrd y su profármaco CPF-373 contra las líneas celulares tumorales competentes para TK y deficientes en TK

La actividad citostática de 5-FdUrd y CPF-373 se determinó en diferentes líneas celulares tumorales que expresan TK y deficientes en TK. Como se muestra en la Tabla 3, 5-FdUrd depende fuertemente de la expresión de TK para su actividad citostática. Su IC_{50} aumentó en 4,000 veces para células L1210/TK- (IC_{50} : 3.1 μM) *versus* células de tipo silvestre L1210/0 (IC_{50} : 0.0008 μM) y en 50 veces para células CEM/TK- (IC_{50} : 1.5 μM) *versus* células CEM/0 (IC_{50} : 0.028 μM). Por el contrario, la actividad citostática del profármaco CPF-373 de 5-FdUrd permaneció prácticamente sin cambios en las células deficientes en TK en comparación con las células de tipo silvestre (IC_{50} : 0.027 y 0.011 μM para células L1210/TK- y L1210/0, y 0.32 y 0.089 μM para CEM/TK- y CEM/0, respectivamente). Aunque la actividad citostática de CPF-373 fue

de 3 a 10 veces inferior a la de 5-FdUrd contra las células de tipo silvestre L1210/0 y CEM/0, resultó 5 a 100 veces superior a la de 5-FdUrd en líneas celulares tumorales deficientes en TK (ver Tabla 3).

Tabla 3. Actividad citostática de 5-FdUrd y CPF-373 representada por el valor IC₅₀ en diferentes líneas celulares

Líneas celulares	IC ₅₀ ^a (μM)	
	5-FdUrd	CPF-373
L1210/0	0.0008 ± 0.000095	0.011 ± 0.0065
L1210/TK-	3.1 ± 0.14	0.027 ± 0.0028
L1210.Hyor	0.24 ± 0.054	0.025 ± 0.0073
CEM/0	0.028 ± 0.0014	0.089 ± 0.030
CEM/TK-	1.5 ± 0.071	0.32 ± 0.049
U87	0.007 ± 0.001	0.035 ± 0.0005
U87.Hyor	3.0 ± 0.55	0.039 ± 0.0025

^a Concentración inhibitoria 50% o concentración de compuesto requerida para inhibir la proliferación de células tumorales en 50 %

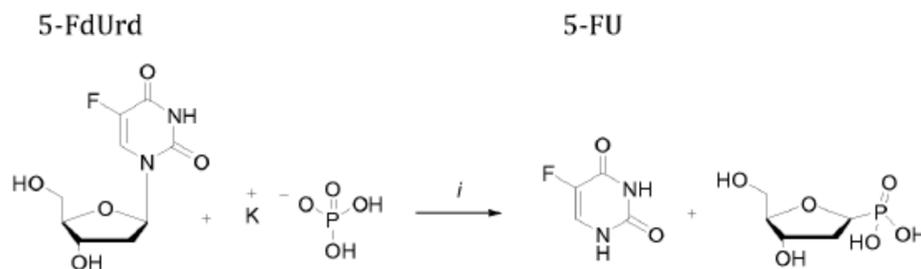
Ensayo 4. Efecto de la infección por micoplasmas de cultivos de células tumorales sobre la actividad citostática de 5-FdUrd y su profármaco CPF-373

Los cultivos de células L1210/0 se infectaron con la especie de micoplasma *M. hyorhinitis* (células designadas: L1210.Hyor). 5-FdUrd perdió notablemente su actividad citostática contra las células L1210.Hyor infectadas con micoplasma en 300 veces (IC₅₀: 0.24 μM). Además, 5-FdUrd perdió su actividad citostática en 400 veces en cultivos de células U87.Hyor en comparación con células U87 no infectadas (ver Tabla 3). En marcado contraste, el profármaco CPF-373 de 5-FdUrd mantuvo un potencial citostático similar tanto en cultivos de células L1210/0 como L1210.Hyor (IC₅₀: 0.011 y 0.025 μM, respectivamente). Se realizó una observación similar para este profármaco cuando se evaluó su actividad citostática en cultivos de células U87 y U87.Hyor (IC₅₀: 0.035 y 0.039 μM, respectivamente). Así, mientras que el nucleósido libre 5-FdUrd perdió notablemente su potencial citostático contra líneas celulares tumorales infectadas con *Mycoplasma hyorhinitis*, el potencial antiproliferativo de su profármaco CPF-373 fue independiente de la infección por micoplasma.

Ensayo 5. Los experimentos se llevaron a cabo para evaluar la estabilidad de CPF 373 en presencia de Timidina Fosforilasa (TP). Los experimentos se ilustran con referencia a las Figuras 9 a 11, cada una de las cuales comprende espectros de RMN, como se describe más abajo. El presente ensayo muestra que la insensibilidad de los compuestos que encarnan la presente invención a la acción de la enzima catabólica TP, que frecuentemente se regula por aumento en tumores, hace que los compuestos de la presente invención sean más independientes de la enzima catabólica TP que 5-FdUrd.

Ensayo de fosforilasa en 5-FdUrd y su compuesto ProTide CPF 373 por timidina fosforilasa (TP) purificada de *Escherichia Coli*.

El nucleósido 5-FdUrd puede degradarse a su base relativa 5FU mediante una reacción fosforolítica, mediante el uso de timidina fosforilasa purificada de *Escherichia coli* así como también uridina fosforilasa purificada a partir de tumor de ascitis de Ehrlich. Se ha sugerido que esta degradación es una de las razones de la efectividad terapéutica limitada de 5-FdUrd de acuerdo con el siguiente esquema:



Esquema

15 El ensayo de la fosforilasa se llevó a cabo hacia la fosforólisis mediante *Timidina Fosforilasa* purificada de *Escherichia coli* mediante el uso de ^{19}F RMN *in situ*. La aplicación al compuesto ProTide CPF 373 fue un intento de evitar la escisión de la estructura y así eludir la acción de la enzima.

20 Se usaron dos tampones de fosfato de potasio a pH = 7.4, solución 200 nM y solución 300 nM respectivamente, como donador de fosfato. Las unidades de enzima se definieron como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar aproximadamente 0.25 mg de inosina por minuto usada como estándar. Los ensayos se llevaron a cabo durante 30 minutos.

25 Ensayo de fosforilasa en 5-FdUrd

30 Inicialmente, se registraron los espectros de ^{19}F RMN (470 MHz) de 5-FdUrd y 5FU previamente disueltos en metanol deuterado. 5-FdUrd mostró un singulete a $\sim \delta$ -167.21 ppm y 5FU a $\sim \delta$ -169.30 ppm. Así, el ensayo de fosforilasa se llevó a cabo mediante disolución de 5-FdUrd en metanol deuterado, en presencia de tampón de fosfato de potasio (solución 200 nM, pH = 7.4), lo que registró el blanco antes de la adición de la enzima timidina fosforilasa (TP) (20.7 UNI). Los espectros de ^{19}F RMN, registrados a 25 °C, mostraron el singulete de 5-FdUrd a $\sim \delta$ -165.17 ppm y un nuevo pico a $\sim \delta$ -169.50 ppm, atribuido a 5FU, como se muestra en la Figura 9 en el espectro A.

35 Después, para probar la escisión del nucleósido en la base relativa, se realizó un nuevo experimento mediante disolución de iguales moles del análogo de nucleósido 5-FdUrd y la base relativa 5FU, en la misma condición descrita anteriormente sin la enzima TS, como se muestra en la Figura 9 en el espectro B. Este espectro mostró dos singuletes con los mismos desplazamientos químicos previamente observados en el espectro A en la Figura 9. Estos datos confirmaron que 5FU tiene un desplazamiento químico a $\sim \delta$ -169.50 ppm y así, la acción fosforolítica de la enzima (TP). La conversión del nucleósido 5-FdUrd en la base libre 5FU fue de 66 %.

40 Cuando la concentración inicial de tampón de fosfato de potasio se incrementó desde 200 nM hasta 205 nM, el sustrato 5-FdUrd se convirtió completamente en la base 5-FU como se muestra en la Figura 10.

45 Ensayo de fosforilasa en el compuesto ProTide CPF 373

50 El ensayo de fosforilasa se aplicó al derivado de fenil benzil L-alanina CPF 373 para investigar la estabilidad, con el procedimiento y las condiciones descritas anteriormente. El compuesto ProTide CPF 373 demostró ser completamente estable como se muestra al comparar los desplazamientos químicos de la muestra analizada sin la enzima TP, como se muestra en el espectro A de la Figura 11, y en presencia de TP, como se muestra en el espectro B de la Figura 11. Se repitió la ^{19}F RMN después de 4 días y se demostró una vez más que el compuesto ProTide CPF 373 era estable.

55 Estos experimentos confirmaron que el nucleósido 5-FdUrd se degrada rápidamente en su base relativa 5FU por una reacción fosforolítica, en presencia de timidina fosforilasa, con una vida media de menos de 30 minutos, mientras que el compuesto profármaco CPF 373 mostró una estabilidad evidente contra la actividad enzimática de TP, a mayor tiempo de exposición hasta 3 días. Este importante resultado mostró que los derivados de ProTides 5-FdUrd que encarnan la presente invención podrían favorecer el efecto terapéutico de 5-FdUrd.

Ensayo 6. Exposición de 5-FdUrd y CPF-373 a TP codificada de *E. coli* TP codificada de humano y a UP

60 La especificidad del sustrato de timidina fosforilasa hacia timidina natural (dThd), uridina (Urd), 5-FdUrd y CPF-373 se investigó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se incubaron a temperatura ambiente mezclas de reacción que contienen 100 M de compuesto de prueba y TP o UP recombinante (TP humana: 8.6 ng/ μL ; *E. coli* TP: 3.0 ng/ μL ; UP humana: 4 ng/mL) en volumen total de 500 μL de tampón de reacción (10 mM TrisHCl; 300 μM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$). En diferentes puntos de tiempo (es decir, 0, 20, 40 min), se retiraron alícuotas de 100 μL de las mezclas de reacción y se calentaron a 95 °C durante 3 min para inactivar la enzima. Los productos de reacción resultantes se separaron en una columna RP-8 de fase inversa (Merck, Darmstadt, Alemania) y se cuantificaron por

análisis de HPLC (Alliance 2690, Waters, Milford, MA). La separación de dThd de la timina se realizó mediante un gradiente lineal de 98 % de tampón de separación (50 mM NaH₂PO₄ y 5 mM de ácido heptano sulfónico, pH 3.2) y 2 % acetoneitrilo, hasta 20 % de tampón de separación + 80 % de acetoneitrilo (8 min 98 % de tampón de separación + 2 % de acetoneitrilo; 5 min gradiente lineal de 98 % tampón de separación + 2 % acetoneitrilo hasta 20 % de tampón de separación + 80 % de acetoneitrilo; 10 min 20 % de tampón de separación + 80 % de acetoneitrilo, seguido de equilibrio en 98% de tampón de separación + 2 % de acetoneitrilo). La detección basada en radiación UV se realizó a 267 nm. La separación de Urd del uracilo se realizó mediante un gradiente lineal desde 100 % de tampón de separación (ver más arriba) hasta 60 % de tampón de separación + 40 % de acetoneitrilo (3 min 100 % de tampón de separación; 6 min de gradiente lineal de 100 % de tampón de separación hasta 60 % de tampón de separación + 40% de acetoneitrilo; 6 min 60 % de tampón de separación + 40% de acetoneitrilo, seguido de equilibrio en 100 % de tampón de separación). La detección basada en radiación UV se realizó a 258 nm.

Fosforolisis de 5-FdUrd y CPF-373 mediante timidina y uridina fosforilasas

5-FdUrd y su profármaco CPF-373 se expusieron a timidina fosforilasa purificada derivada de *E.coli* o de eritrocitos humanos, y a uridina fosforilasa purificada derivada de tumores humanos. Mientras que TP de *E.coli* y humana convirtieron rápidamente dThd y 5-FdUrd en sus bases libres, CPF-373 se mantuvo completamente estable en presencia de estas enzimas (Figura 2). En condiciones experimentales similares, uridina se convirtió en uracilo mediante UP humana, pero no por TP de *E.coli* TP, o TP humana. Cuando ambos compuestos se expusieron a UP, dThd y CPF-373 no se afectaron por la enzima, mientras que 5-FdUrd se hidrolizó ligeramente (Figura 2, panel C).

Ensayo 7. Mediciones de la actividad de la timidilato sintasa (TS)

La actividad de TS en células intactas L1210/0 y L1210/TK- se midió mediante la evaluación de la liberación de tritio a partir de [5-³H]dUMP (formado en las células a partir de [5-³H]dUrd o [5-³H]dCyd) en la reacción catalizada por TS. Este método ha sido descrito en detalle por Balzarini & De Clercq (1984). Brevemente, se prepararon cultivos celulares (500 µL de medio de cultivo DMEM) que contenían ~ 3 x 10⁶ células L1210 y cantidades apropiadas de los compuestos de prueba (5-FdUrd y CPF-373). Después de 30 min, 2 h y 4 h de preincubación de las células con los compuestos a 37 °C, se añadió 1 µCi de [5-³H]dUrd o [5-³H]dCyd a los cultivos celulares. Después de 30 minutos de incubación, se extrajeron 100 µL de las suspensiones celulares y se añadieron a una suspensión fría de 500 µL de carbón activado (VWR, Haasrode, Bélgica) (100 mg/mL en 5% de TCA). Después de 10 minutos, la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, después de lo cual se contó la radiactividad en 400 µL del sobrenadante en un sincillador líquido mediante el uso de OptiPhase HiSafe (Perkin Elmer, Waldham, MA).

Inhibición de timidilato sintasa (TS) por 5-FdUrd y CPF-373

El objetivo principal para la actividad citostática de 5-FdUrd es la timidilato sintasa (TS). La actividad de TS en células tumorales intactas puede monitorearse directamente mediante medición de la liberación de tritio en cultivos de células L1210/0 intactas que se expusieron a [5-³H]desoxiuridina ([5-³H]dUrd) o [5-³H]desoxicitidina ([5-³H]dCyd). De hecho, después de la conversión intracelular de [5-³H]dUrd o [5-³H]dCyd en [5-³H]dUMP, el átomo de tritio C-5 en la base de pirimidina se libera durante la metilación reductora catalizada por TS. La capacidad de 5-FdUrd y su profármaco CPF-373 para inhibir la liberación de tritio a partir de [5-³H]dUrd y [5-³H]dCyd se evaluó por lo tanto en cultivos de células L1210/0 en una variedad de concentraciones de compuestos. 5-FdUrd resultó ser un potente inhibidor de TS in situ. Su IC₅₀ para la liberación de tritio a partir de [5-³H]dCyd y [5-³H]dUrd fue alrededor de 0.0007 - 0.0009 µM (ver Tabla 4).

Tabla 4. Valores de IC₅₀ valores de 5-FdUrd y CPF-373 contra TS en células tumorales intactas L1210/0 (según se determina por la liberación de tritio a partir de [5-³H]dUrd y [5-³H]dCyd después de 30 minutos de exposición a los fármacos).

	IC ₅₀ ^a (μM)	
Compuesto	Liberación de tritio a partir de dUrd*	Liberación de tritio a partir de dCyd*
5-FdUrd	0.0009 ± 0.0002	0.0007 ± 0.003
CPF-373	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.08

^a Concentración inhibitoria de 50 % o concentración de compuesto requerida para inhibir la liberación de tritio a partir de [5-³H]dUrd o [5-³H]dCyd en cultivos de células L1210/0 expuestas a fármacos en un 50 %. La actividad inhibitoria de CPF-373 en la liberación de tritio fue mucho menos pronunciada (~ 200 veces) que la de 5-FdUrd, especialmente después de solo 30 min de preincubación de las células con los fármacos (IC₅₀: 0.16-0.19 μM). Sin embargo, los tiempos de preincubación más largos de las células (hasta 4 horas) con 5-FdUrd y CPF-373 antes de medir la actividad de TS en las células tumorales intactas revelaron una actividad inhibitoria mucho más pronunciada del profármaco contra TS *in situ* (Figura 3). De hecho, mientras que la inhibición de la liberación de ³H aumentó solamente 2 veces después de tiempos de preincubación más largos de 5-FdUrd, el potencial inhibitorio de CPF-373 aumentó 10 veces (Figura 3, paneles A y B, y C y D).

La preincubación de las células tumorales con 5-FdUrd y CPF-373 durante al menos 4 horas resulta en la inhibición de TS en las células tumorales intactas a concentraciones del fármaco que son muy comparables con las concentraciones de actividad citostática del 50 % de estos fármacos.

Las presentes observaciones indican así que el profármaco de 5-FdUrd necesita varias etapas de conversión metabólica antes de alcanzar a TS como la enzima objetivo para la inhibición, y respaldan la opinión de que CPF-373 actúa como un profármaco eficiente de 5-FdUrd para ejercer su actividad citostática final.

La actividad de TS en presencia de 5-FdUrd y CPF-373 se midió además en células L1210/TK- intactas mediante el uso de [5-³H]dCyd como un sustrato suministrado externamente (debido a la deficiencia de TK, [5-³H]dUrd no puede usarse). Como se demuestra en la Tabla 5 y la Figura 3 (paneles E y F), la concentración de 5-FdUrd requerida para provocar una inhibición de 50 % de TS disminuyó en un factor de 5,700 en células deficientes en TK L1210/TK- (IC₅₀: 1.4 μM) en comparación con células de tipo silvestre L1210/0 (IC₅₀: 0.0003 μM). Por el contrario, la actividad inhibitoria de CPF-373 frente a TS permaneció prácticamente inalterada en células L1210/TK- (IC₅₀: 0.053 μM en células L1210/TK- *versus* 0.013 μM en células L1210/0).

Tabla 5. Valores de IC₅₀ de 5-FdUrd y CPF-373 contra TS en células intactas L1210/0 y L1210/TK- (según se determina por la liberación de tritio a partir de [5-³H]dCyd después de 4 horas de preincubación con los productos)

	IC ₅₀ ^a (μM)	
Compuesto	L1210/0	L1210/TK-
5-FdUrd	0.0003 ± 0.00003	1.42 ± 0.09
CPF-373	0.013 ± 0.008	0.053 ± 0.0009

^a Concentración inhibitoria de 50 % o concentración de compuesto requerida para inhibir la liberación de tritio a partir de [5-³H]dCyd en células L1210 expuestas al fármaco en un 50 % tras la exposición previa de las células tumorales durante 4 horas a los fármacos.

Ensayo 8. Ensayos de estabilidad

Ensayo de carboxipeptidasa Y (EC 3.4.16.1)

La estabilidad enzimática del profármaco CPF-373 hacia la carboxipeptidasa Y se estudió mediante el uso de ³¹P RMN *in situ* (202 MHz). El experimento se llevó a cabo mediante disolución de CPF-373 (3.0 mg) en d₆-acetona (150 μL) y adición de tampón TRIZMA pH 7.6 (300 μL). La solución resultante se colocó en un tubo de RMN y se registró un experimento de ³¹P-RMN a 25 °C como experimento en blanco. La enzima Carboxipeptidasa Y (0.2 mg) se solubilizó en TRIZMA (150 μL) y se añadió a la solución del derivado de fosforamidato en el tubo de RMN. A continuación, el tubo se colocó en la máquina de RMN, que se configuró para realizar un experimento de ³¹P-RMN experiment (64 exploraciones) cada 4 minutos durante 14 horas a 25 °C. Los datos se procesaron y se analizaron con el programa Bruker Topspin 2.1. La carboxipeptidasa Y y el tampón TRIZMA se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Suero humano

La estabilidad del profármaco CPF-373 en presencia de suero humano se estudió mediante el uso de ^{31}P NMR *in situ* (202 MHz). El ProTide CPF-373 (**1**) (5.0 mg) se disolvió en DMSO (0.05 mL) y D_2O (0.15 mL). Después la muestra se transfirió a un tubo de RMN, que se insertó en la cámara de RMN a 37°C (con suficiente disolvente para obtener una lectura de RMN de control del blanco). Después se añadió rápidamente 0.3 mL de suero humano a la muestra en el tubo de RMN. Los experimentos de RMN se programaron para registrar datos cada 15 minutos durante 12 horas y 30 minutos. Debido al exceso de ruido y los pobres perfiles radiantes (muy probablemente debido a los medios biológicos y la concentración), los espectros individuales se procesaron adicionalmente. Después del procesamiento de la transformada de Fourier normal, cada espectro se desconvolucionó (desconvolución de Lorentz-Gauss) para revelar únicamente la frecuencia y el área de los picos espectrales sin la línea base. Los datos registrados se procesaron y analizaron con el programa Bruker Topspin 2.1.

Tampón a pH 1

La estabilidad del profármaco CPF-373 en relación a la hidrólisis a $\text{pH} = 1$ se estudió mediante el uso de ^{31}P RMN *in situ* (202 MHz). El ProTide CPF-373 (**1**) (2.6 mg) se disolvió en MeOD (0.1 mL) después de lo cual se añadió 0.5 mL de tampón ($\text{pH} = 1$) (preparado a partir de partes iguales de 0.2 M de HCl y 0.2 M de KCl). Después la muestra se transfirió a un tubo de RMN, y se realizó un experimento de ^{31}P RMN a 37°C cuyos datos se registraron cada 12 minutos durante 14 horas. Los datos se procesaron y analizaron con el programa Bruker Topspin 2.1.

Tampón a pH 8

La estabilidad del profármaco CPF-373 en relación a la hidrólisis a $\text{pH} = 8$ se estudió mediante el uso de ^{31}P RMN *in situ* (202 MHz). El ProTide CPF-373 (**1**) (4.9 mg) se disolvió en MeOD (0.1 mL) después de lo cual se añadió 0.5 mL de tampón ($\text{pH} = 8$) (preparado a partir de una solución de 0.1 M de Na_2HPO_4 , que se ajustó con 0.1 M de HCl). Después la muestra se transfirió a un tubo de RMN, y se realizó un experimento de ^{31}P RMN a 37°C cuyos datos se registraron cada 12 minutos durante 14 horas. Los datos se procesaron y analizaron con el programa Bruker Topspin 2.1.

Estudios de estabilidad

Se han realizado estudios de estabilidad química en el profármaco CPF-373 (**1**) mediante exposición del compuesto a suero humano y a tampones acuosos ($\text{pH} 1.0$ y 8.0) mediante el uso de ^{31}P RMN *in situ*. Cada experimento se ha llevado a cabo mediante disolución de ProTide en el disolvente deuterado adecuado y análisis de las muestras a 37°C durante aproximadamente 14 horas, mientras se adquieren escaneos en intervalos de tiempo regulares. Para una mejor resolución, se informan los espectros originales (gráficos inferiores) y desconvolucionados (gráficos superiores). El ensayo de estabilidad del fosforamidato de CPF-373 (**1**), después de la incubación en suero humano, mostró 73 % del compuesto sin cambios después de 12 horas y 30 minutos como se muestra en la Figura 6.

Los espectros mostraron un pico singulete inherente al suero humano a $\sim \delta 2.00$ y el doble pico del elemento parental a $\sim \delta 4.50$ que después de 4 horas y 15 minutos se hidrolizó al intermediario aminoacil fosforamidato que se muestra como un pico singulete a $\delta 7.20$.

Cuando se evaluó la hidrólisis química en condiciones experimentales extremas, es decir, a $\text{pH} 1.0$ y $\text{pH} 8.0$ a 37°C , se observó una estabilidad completa del profármaco CPF-373 (**1**) en condiciones de tampón tanto ácido como básico. Los espectros se registraron durante 14 horas al adquirir exploraciones cada 12 minutos a intervalos regulares como se muestra en las Figuras 7 y 8. El ProTide (**1**) examinado a $\text{pH} 1.0$ mostró picos de doblete constantes de diastereoisómeros a $\delta 4.35$; 4.50 a lo largo del tiempo del ensayo (Figura 7).

Además, a $\text{pH} 8.0$ los espectros mostraron un pico persistente del profármaco (**1**) a $\delta 4.48$ y un pico singulete a $\delta 2.55$ correspondiente a un pico del tampón (Figura 8).

Metabolismo de Fosforamidatos de 5-FdUrd

Como se muestra en la Figura 4, el mecanismo supuesto de activación de los ProTides dentro de la célula, después de la captación, implica una primera etapa de activación enzimática mediada por una enzima de tipo carboxipeptidasa que hidroliza el éster de la porción de aminoacilo (etapa a) seguido de ciclación espontánea y posterior desplazamiento espontáneo del grupo arilo (etapa b) y apertura del anillo inestable mediado por agua (etapa c). La última etapa implica una hidrólisis del enlace P-N mediado por una enzima de tipo fosforamidasa (etapa d) con liberación del nucleósido monofosfato en la célula intacta (Figura 4) (McGuigan y otros, 2009; Mehellou y otros, 2010).

Para demostrar el esquema metabólico propuesto para CPF-373 (**1**) y si el motivo éster del derivado de fosforamidato de 5-FdUrd se fragmenta o no, se llevó a cabo un experimento de incubación enzimática diseñado para imitar las primeras etapas de la supuesta activación en las células tumorales intactas. El compuesto (**1**) se incubó con carboxipeptidasa Y (conocida además como catepsina A) en tampón TRIZMA y la conversión de (**1**) se monitoreó mediante ^{31}P RMN. Los espectros se registraron durante 14 h con la adquisición de exploraciones a intervalos periódicos cada 4 minutos como

se muestra en la Figura 5. Para una mejor resolución, se muestran los espectros originales (gráficos inferiores) y desconvolucionados (gráficos superiores).

5 En la ^{31}P RMN, el profármaco CPF-373 (1) apareció como dos picos δ 4.07; 4.23 correspondiente con los dos diastereoisómeros señalados como originales con la duplicación característica del centro de fosfato quiral del fosforamidato. Después de la adición de catépsina A, el compuesto se hidrolizó rápidamente después de 4 minutos en los
10 intermediarios δ 4.95; 5.16 que carecen del motivo éster y este intermediario no persistió ya que a su vez se metabolizó rápidamente en el intermediario de aminoacil fosforamidato, producto final en este ensayo, a través de la pérdida del grupo arilo (etapas a a c en la Figura 4). El intermediario apareció como un pico singulete a δ 6.85 debido al centro de fosfato aquiral. Así, los espectros de ensayo enzimático mostraron un metabolismo rápido del original~ δ 4.00 con la conversión completa en el supuesto intermediario en 26 minutos, que además se mantuvo constantemente presente a lo largo de las 14 h del ensayo. La escisión del enlace P-N que libera el nucleósido monofosfato no se detectó en el experimento de la enzima, como se esperaba. Este experimento indica que la primera etapa de activación de ProTide CPF-373 (1) puede ser suficientemente eficiente y, por lo tanto, puede permitir el suministro final del metabolito de nucleósido monofosfato en las células tumorales intactas.
15

Conclusión

20 En conclusión, la presente invención proporciona nuevos profármacos de nucleótido fosforamidato del análogo de nucleósido anticancerígeno 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FdUrd), que se sintetizaron y evaluaron para determinar su actividad citostática. Mientras que 5-FdUrd perdió sustancialmente su potencial citostático en cultivos de células L1210 de leucemia de murino deficiente en timidina quinasa (TK) y de células CEM de linfocitos humanos, los compuestos que forman parte de esta descripción, tal como CPF-373, mantuvieron marcadamente su actividad antiproliferativa tanto en células tumorales de tipo silvestre como las deficientes en TK y, así, son en gran parte independientes de la actividad de TK intracelular para ejercer su acción citostática. Se encontró que CPF-373, por ejemplo, inhibe la timidilato sintasa (TS) en las líneas celulares deficientes en TK y de tipo silvestre a concentraciones de fármaco que se correlacionan bien con su actividad citostática en estas células. El CPF-373 no parece ser susceptible a la inactivación por enzimas catabólicas como la timidina fosforilasa (TP) y la uridina fosforilasa (UP). Estos hallazgos están en línea con las observaciones de que 5-FdUrd, pero no CPF-373, pierde sustancialmente su potencial citostático en presencia de micoplasmas que expresan TP en los cultivos de células tumorales. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son nuevos profármacos de fosforamidato de 5-FdUrd que (i) pueden eludir los mecanismos de resistencia potenciales de las células tumorales (por ejemplo, disminución de la actividad de TK) y (ii) no se degradan por enzimas catabólicas tal como TP cuya actividad frecuentemente se regula por aumento en células tumorales o se expresa en tejido tumoral infectado con micoplasmas. Ver Vande Voorde, J. y otros *Biochemical Pharmacology* 82 (2011) 441-452.
25
30
35

Ver, además, McGuigan, C. y otros *J. Med. Chem.* 2011, 54 7247-7258 (publicado el 5 de septiembre de 2011).

40 La Tabla 6 más abajo registra la actividad citostática de 5-FU, 5-FdUrd, ejemplo de referencia CPF382 y compuestos que encarnan la presente invención contra líneas celulares tumorales en términos de IC_{50} o la concentración del compuesto requerida para inhibir la proliferación de células tumorales en 50 %. Los datos son la media (\pm SD) de al menos dos a cuatro experimentos independientes. La Tabla 6 identifica el motivo fosforamidato del ejemplo de referencia CPF382 y de los compuestos que encarnan la presente invención con respecto a: "arilo", que corresponde a Ar de fórmula I y es lo mismo fenilo (Ph) o 1-naftilo (Nap); "éster", que corresponde a R_3 de Fórmula I; y "AA", que establece el aminoácido cuyo átomo de C alfa y sustituyentes en el átomo de C alfa corresponden a CR_1R_2 de Fórmula I. La Tabla 6 describe compuestos que encarnan la presente invención no mencionados previamente en la Tabla 1, así como también datos adicionales para algunos de los compuestos mencionados en la Tabla 1.
45
50
55
60
65

Tabla 6

Comp.	arilo	éster	AA	IC ₅₀ (μM)						
				L1210/0	L1210/TK-	Cem/0	CemfTK-	HeLa	HeLafTK-	
5-FU				0.33 ± 0.17	0.32 ± 0.31	18 ± 5	12 ± 1	0.54 ± 0.12	0.23 ± 0.01	
5-FdUrd				0.0011 ± 0.0002	3.0 ± 0.1	0.022 ± 0.006	3.0 ± 0.4	0.050 ± 0.011	1.4 ± 0.4	
	Ph	Me	Ala	0.022 ± 0.007	41 ± 3	0.70 ± 0.37	35 ± 12	0.28 ± 0.14	4.7 ± 0.4	
	Ph	Et	Ala	0.13 ± 0.04	0.94 ± 0.18	0.92 ± 0.11	14 ± 0	0.48 ± 0.19	9.8 ± 1.4	
	Ph	iPr	Ala	0.076 ± 0.022	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	30 ± 10	0.71 ± 0.15	25 ± 11	
	Ph	c-Hex	Ala	0.039 ± 0.001	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.07	1.2 ± 0.01	0.18 ± 0.05	5.9 ± 0.4	
	Ph	Bn	Ala	0.028 ± 0.007	13 ± 8	0.18 ± 0.03	22 ± 7	0.13 ± 0.01	19 ± 2	
	Ph	Et	Val	0.16 ± 0.05	42 ± 2	1.0 ± 0.1	>250	1.2 ± 0.3	27 ± 7	
	Ph	Bn	Leu	0.044 ± 0.025	2.0 ± 0.3	0.24 ± 0.04	16 ± 1	0.067 ± 0.042	5.6 ± 0.3	
	Ph	Bn	Ile	0.076 ± 0.022	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	30 ± 10	0.71 ± 0.15	25 ± 11	
	Ph	Bn	Phe	0.036 ± 0.010	39 ± 4	0.25 ± 0.02	11 ± 3	0.014 ± 0.007	12 ± 2	
	Ph	Pnt	Met	0.11 ± 0.06	2.2 ± 0.5	0.35 ± 0.13	13 ± 1	0.15 ± 0.00	7.1 ± 1.2	
	Ph	Bn	Met	0.073 ± 0.035	4.1 ± 1.2	0.28 ± 0.03	25 ± 0	0.15 ± 0.02	11 ± 7	
	Ph	Bn	Pro	0.35 ± 0.07	31 ± 5	0.98 ± 0.40	28 ± 8	1.1 ± 0.4	20 ± 11	
	Ph	Et	DMG	0.039 ± 0.001	4.6 ± 0.0	0.65 ± 0.16	22 ± 1	0.59 ± 0.09	17 ± 2	
	Ph	Bn	DMG	0.017 ± 0.003	0.18 ± 0.05	0.23 ± 0.04	4.8 ± 0.7	0.24 ± 0.07	3.7 ± 0.1	
	Nap	Et	Ala	0.031 ± 0.005	0.36 ± 0.01	0.25 ± 0.04	1.6 ± 0.2	0.22 ± 0.04	2.8 ± 0.0	
	Nap	Pr	Ala	0.021 ± 0.012	0.16 ± 0.07	0.14 ± 0.01	1.1 ± 0.2	0.11 ± 0.03	2.5 ± 0.1	
	Nap	Butyl	Ala	0.022 ± 0.004	0.11 ± 0.06	0.064 ± 0.007	0.84 ± 0.60	0.12 ± 0.02	2.7 ± 1.5	
	Nap	Pnt	Ala	0.0028 ± 0.0010	0.13 ± 0.13	0.015 ± 0.006	0.28 ± 0.04	0.029 ± 0.023	0.44 ± 0.35	
	Nap	Hex	Ala	0.0072 ± 0.0000	0.076 ± 0.015	0.080 ± 0.020	0.65 ± 0.34	0.039 ± 0.018	1.8 ± 0.1	
	Nap	c-Bu	Ala	0.014 ± 0.003	0.088 ± 0.038	0.073 ± 0.018	1.5 ± 0.3	0.069 ± 0.003	1.5 ± 0.6	
	Nap	c-Pnt	Ala	0.031 ± 0.010	0.13 ± 0.02	0.35 ± 0.025	0.92 ± 0.007	0.071 ± 0.036	2.2 ± 1.3	
	Nap	c-Hex	Ala	0.043 ± 0.023	0.15 ± 0.00	0.057 ± 0.055	1.0 ± 0.1	0.090 ± 0.014	ND	

continuación

Comp.	arilo	éster	AA	IC ₅₀ (µM)						
				L1210/0	L1210/TK	Cem/0	CemffK	HeLa	HeLaTK	
	Nap	CH ₂ -t-Bu	Ala	0.27 ± 0.11	1.2 ± 0.7	0.49 ± 0.05	6.7 ± 1.0	0.70 ± 0.11	32 ± 26	
	Nap	CH ₂ CH ₂ -t-Bu	Ala	0.016 ± 0.006	0.062 ± 0.009	0.053 ± 0.021	0.19 ± 0.04	0.078 ± 0.018	1.3 ± 0.9	
	Nap	CH ₂ -c-Pr	Ala	0.017 ± 0.007	0.12 ± 0.06	0.059 ± 0.017	1.1 ± 0.2	0.068 ± 0.001	1.4 ± 0.4	
	Nap	2-Ind	Ala	0.021 ± 0.002	40 ± 0	0.079 ± 0.018	1.0 ± 0.2	0.10 ± 0.06	7.1 ± 2.1	
	Nap	Bn	Ala	0.011 ± 0.007	0.045 ± 0.027	0.068 ± 0.035	0.31 ± 0.06	0.065 ± 0.013	2.5 ± 1.3	
	Nap	THP	Ala	0.038 ± 0.014	27 ± 6	0.11 ± 0.02	43 ± 12	0.13 ± 0.04	15 ± 7	
	Nap	c-Hex	Val	1.1 ± 0.5	35 ± 8	0.80 ± 0.28	46 ± 14	0.67 ± 0.03	27 ± 6	
	Nap	Pnt	Leu	0.017 ± 0.001	1.2 ± 0.4	0.071 ± 0.008	15 ± 4	0.039 ± 0.014	7.5 ± 0.4	
	Nap	Bn	Leu	0.028 ± 0.004	1.5 ± 0.6	0.13 ± 0.00	30 ± 6	0.080 ± 0.022	9.4 ± 1.4	
	Nap	Pnt	Ile	0.22 ± 0.12	12 ± 2	0.46 ± 0.11	17 ± 1	0.30 ± 0.02	11 ± 1	
	Nap	Pnt	Phe	0.026 ± 0.001	2.9 ± 1.2	0.10 ± 0.00	8.3 ± 1.0	0.040 ± 0.000	6.6 ± 0.5	
	Nap	Bn	Phe	0.012 ± 0.007	5.6 ± 1.3	0.10 ± 0.03	7.2 ± 0.1	0.16 ± 0.08	6.8 ± 1.5	
	Nap	Bn	Met	0.072 ± 0.001	1.9 ± 0.2	0.19 ± 0.10	11 ± 1	0.087 ± 0.017	8.3 ± 0.0	
	Nap	Bn	Pro	0.21 ± 0.08	25 ± 8	0.89 ± 0.35	35 ± 9	1.2 ± 0.0	26 ± 1	
	Nap	Et	DMG	0.064 ± 0.008	0.82 ± 0.16	0.36 ± 0.05	6.9 ± 1.8	0.20 ± 0.12	3.2 ± 0.0	
	Nap	Pnt	DMG	0.037 ± 0.010	0.30 ± 0.13	0.14 ± 0.00	5.4 ± 1.1	0.12 ± 0.03	2.3 ± 0.1	
	Nap	Bn	DMG	0.011 ± 0.005	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.02	2.4 ± 0.8	0.078 ± 0.020	3.1 ± 0.6	

La Tabla 7 más abajo registra la actividad citostática de 5-FdUrd, ejemplo de referencia CPF382 y compuestos que encarnan la presente invención en cultivos de células L1210 de leucemia de murino (L1210/0) y cultivos de células L1210, infectados con *Mycoplasma hyorhinis* (L1210.Hyor) en términos de IC₅₀ o la concentración del compuesto para inhibir la proliferación celular en 50 %. Los datos son la media (±SD) de al menos dos a cuatro experimentos independientes. La Tabla 7 identifica el motivo fosforamidato del ejemplo de referencia CPF382 y de los compuestos que encarnan la presente invención, como se discutió anteriormente con respecto a la Tabla 6, pero con "Naph" que representa 1-naftilo. La Tabla 7 describe compuestos que encarnan la presente invención no mencionados previamente en la Tabla 2, así como también datos adicionales para algunos de los compuestos mencionados en la Tabla 2.

10 Tabla 7.

Comp.	arilo	éster	AA	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (L1210.Hyor)/IC ₅₀ (L1210/0)
				L1210/0	L1210.Hyor	
5-FdUrd				0.0009 ± 0.0003	0.34 ± 0.13	378
	Ph	Me	Ala	0.040 ± 0.016	0.87 ± 0.28	22
	Ph	Et	Ala	0.11 ± 0.0021	0.54 ± 0.12	5
	Ph	<i>i</i> -Pr	Ala	0.050 ± 0.013	0.70 ± 0.10	14
	Ph	<i>c</i> -Hex	Ala	0.032 ± 0.0050	0.040 ± 0.016	1.25
	Ph	Bn	Ala	0.026 ± 0.008	0.15 ± 0.006	5.8
	Ph	Et	Val	0.20 ± 0.033	4.4 ± 1.1	22
	Ph	Bn	Leu	0.054 ± 0.0021	0.17 ± 0.047	3.2
	Ph	Bn	Ile	0.98 ± 0.39	2.2 ± 0.031	2.2
	Ph	Bn	Phe	0.016 ± 0.0014	0.56 ± 0.023	35
	Ph	Pnt	Met	0.13 ± 0.0078	0.41 ± 0.21	3.2
	Ph	Bn	Met	0.058 ± 0.035	0.76 ± 0.18	13
	Ph	Bn	Pro	0.35 ± 0.022	18 ± 0.71	51
	Ph	Et	DMG	0.030 ± 0.0005	0.26 ± 0.01	8.7
	Ph	Bn	DMG	0.029 ± 0.001	0.02 ± 0.002	0.69
	Naph	Et	Ala	0.028 ± 0.0021	0.095 ± 0.0028	3.4
	Naph	Pr	Ala	0.030 ± 0.00035	0.036 ± 0.0064	1.2
	Naph	butilo	Ala	0.0095 ± 0.0021	0.021 ± 0.0071	2.2
	Naph	Pnt	Ala	0.0021 ± 0.00007	0.006 ± 0.0014	2.9
	Naph	Hex	Ala	0.0032 ± 0.00035	0.0022 ± 0.00028	0.69
	Naph	<i>c</i> -Bu	Ala	0.011 ± 0.0014	0.024 ± 0.00014	2.2
	Naph	<i>c</i> -Pnt	Ala	0.016 ± 0.0007	0.024 ± 0.005	1.5
	Naph	<i>c</i> -Hex	Ala	0.036 ± 0.017	0.049 ± 0.004	1.4
	Naph	CH ₂ - <i>t</i> -Bu	Ala	0.093 ± 0.033	0.18 ± 0.069	1.9
	Naph	CH ₂ CH ₂ - <i>t</i> -Bu	Ala	0.012 ± 0.0018	0.032 ± 0.0088	2.7
	Naph	CH ₂ - <i>c</i> -Pr	Ala	0.014 ± 0.0042	0.031 ± 0.0064	2.2
	Naph	2-Ind	Ala	0.039 ± 0.019	0.042 ± 0.040	1.08
	Naph	Bu	Ala	0.011 ± 0.009	0.025 ± 0.01	2.27
	Naph	THP	Ala	0.041 ± 0.0028	0.48 ± 0.11	11.7
	Naph	<i>c</i> -Hex	Val	1.2 ± 0.17	1.29 ± 0.29	1.08

	Naph	Pnt	Leu	0.031 ± 0.0020	0.035 ± 0.010	1.13
5	Naph	Bn	Leu	0.029 ± 0.0021	0.048 ± 0.020	1.7
	Naph	Pnt	Ile	0.42 ± 0.021	0.70 ± 0.074	1.67
	Naph	Pnt	Phe	0.030 ± 0.0039	0.14 ± 0.007	4.67
10	Naph	Bn	Phe	0.021 ± 0.0061	0.23 ± 0.078	11
	Naph	Bn	Met	0.054 ± 0.013	0.20 ± 0.098	3.7
	Naph	Bn	Pro	0.26 ± 0.055	0.65 ± 0.070	2.5
	Naph	Et	DMG	0.056 ± 0.04	0.17 ± 0.03	3
15	Naph	Pnt	DMG	0.045 ± 0.0021	0.019 ± 0.0028	0.42
	Naph	Bn	DMG	0.019 ± 0.004	0.045 ± 0.004	2.4

20 La Tabla 8 más abajo registra la actividad citostática de 5-FdUrd y compuestos que encarnan la presente invención en cultivos de células CEM que contienen (Cem/hEnt-1) o que carecen (Cem/hEnt-0) el transportador hEnt1 en términos de IC₅₀ o concentración de compuesto requerida para inhibir la proliferación de células tumorales en 50 %. Los datos son la media (±SD) de al menos dos a cuatro experimentos independientes. La Tabla 8 identifica el motivo fosforamidato de los compuestos que encarnan la presente invención, como se discutió anteriormente con respecto a la Tabla 6, pero con "Naph" que representa 1-naftilo. Los datos de la Tabla 8 muestran que los compuestos que encarnan la presente invención son menos dependientes de la presencia del transportador hENT1, que 5-FdUrd, ya que pierden solamente actividad antiproliferativa de 7 a 15 veces contra las células CEM deficientes en hENT1. Estas observaciones concuerdan con una actividad citostática solo disminuida de 2 a 7 veces de compuestos que encarnan la presente invención en presencia de inhibidores de transporte (es decir, dipiridamol y NBMPR), en comparación con una pérdida de actividad antiproliferativa de 20 a 60 veces de 5-FdUrd y FdUMP en condiciones experimentales similares.

Tabla 8.

comp.	arilo	Éster	AA	IC ₅₀ (μM)			
				Cem/hEnt-1	Cem/hEnt-0	Cem/hEnt-1 dipiridamol	+ Cem/hEnt-1 NBMPR
5-FdUMP				0.05 ± 0.02	3.6 ± 0.69	1.74	1.06
5-FdUrd				0.04 ± 0.02	2.5 ± 0.65	1.36	0.80
	Ph	Bn	Ala	0.13 ± 0.05	1.4 ± 0.65	0.66	0.72
	Ph	Et	DMG	0.37 ± 0.14	5.8 ± 0.50	2.35	2.56
	Ph	Bn	DMG	0.17 ± 0.06	1.2 ± 0.11	0.26	0.61
	Naph	Bn	Ala	0.05 ± 0.02	0.6 ± 0.11	0.13	0.26
	Naph	Et	DMG	0.21 ± 0.07	1.4 ± 0.20	0.52	0.62
	Naph	Bn	DMG	0.05 ± 0.03	0.4 ± 0.13	0.16	0.28

Los estudios se realizaron en el compuesto CPF 381 de la siguiente manera:

55 Se llevó a cabo un ensayo de fosforilasa enzimática mediante el uso de timidina fosforilasa (TP, purificada de *Escherichia coli*) en presencia de tampón de fosfato de potasio (solución 300 nM, pH 7.4). El espectro de ¹⁹F RMN después de 5 min, 14 h y 72 h no mostró evidencia alguna de fosforolisis. Por el contrario de 5-FdUrd, CPF 381 es, en el mejor de los casos, un sustrato muy pobre, si existe, para la timidina fosforilasa.

60 Se evaluó una hidrólisis química en condiciones experimentales a pH 1 y pH 8 y se monitoreó mediante ³¹P RMN. Durante el ensayo (14 h) en condiciones ácidas (pH 1), solo se registraron dos picos que representaban los dos diastereoisómeros. La falta de formación de nuevas señales en el espectro ³¹P RMN indica que el compuesto CPF 381 es altamente estable en medio ácido. Se observó el mismo resultado cuando el compuesto CPF 381 se sometió al ensayo en condiciones básicas suaves (pH 8).

65 Los estudios se realizaron en el compuesto CPF 581 de la siguiente manera:

Se realizó un estudio enzimático mediante el uso de un ensayo de carboxipeptidasa Y en el que se disolvieron el compuesto CPF 581, carboxipeptidasa Y y tampón Trizma (pH 7.6) en acetona- d_6 y se registraron los espectros de ^{31}P RMN (202 MHz) a intervalos regulares (cada 7 min) más de 14 h. El compuesto CPF 581 se hidrolizó rápidamente en un primer metabolito carente de la porción éster (R_3), ambos diastereoisómeros se procesaron a una velocidad aproximadamente similar. El procesamiento adicional del primer metabolito condujo a la formación de un segundo metabolito aniónico, carente de Ar, en aproximadamente 45 min con una vida media estimada de menos de 5 min. La velocidad de la etapa de activación inicial podría así considerarse en general como uno de los requisitos para una buena actividad biológica de los fosforamidatos. La hidrólisis química del compuesto CPF 373 en presencia de trietilamina y agua produjo la sal diamónica del segundo metabolito aniónico, que se añadió a la muestra de ensayo final derivada del compuesto CPF 373, es decir, que contenía solo el segundo metabolito enzimático derivado del compuesto CPF 581 en Trizma. La muestra tenía un espectro de ^{31}P RMN que mostraba solo un único pico a δ_P 6.85 ppm, lo que sustenta fuertemente esta parte de la ruta metabólica y la activación de los compuestos de fosforamidato de la presente invención.

Los estudios se realizaron en el compuesto CPF 386 de la siguiente manera:
 La estabilidad del compuesto CPF 386 en presencia de suero humano se investigó mediante el uso de ^{31}P RMN in situ. Se registraron datos de ^{31}P RMN de control del compuesto CPF 386 en DMSO y D_2O . La muestra de RMN se trató después con suero humano y se sometió inmediatamente a experimentos adicionales de ^{31}P RMN a 37°C . Los datos de ^{31}P RMN se registraron cada 15 minutos durante 14 h. Los espectros mostraron un único pico inherente al suero humano a $\sim\delta_P$ 2.00 ppm y dos picos correspondientes al compuesto CPF 386 a $\sim\delta_P$ 4.59 y 4.84 ppm. Después de aproximadamente 6 h y 45 min, el compuesto se hidrolizó parcialmente en un intermediario, carente de R_3 (Et), como un único pico a δ_P 5.79 ppm. Después de 11 h y 30 min, se observó la formación del segundo metabolito, carente de Ar (1-naftilo), que se muestra como pico único a δ_P 7.09 ppm. Después de 13 h y 30 minutos, la mezcla de reacción contenía 96 % del compuesto original CPF 386 junto con el primer metabolito propuesto (3 %) y el segundo metabolito (1 %).

Referencias

- Agarwal RP, Han T, Fernandez M, Collateral resistance of a dideoxycytidine-resistant cell line to 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:657-60.
- Ayusawa D, Koyama H, Iwata K, Seno T, Single-step selection of mouse FM3A cell mutants defective in thymidylate synthetase. *Somatic Cell Genet* 1980;6:261-70.
- Ayusawa D, Koyama H, Seno T, Resistance to methotrexate in thymidylate synthetase-deficient mutants of cultured mouse mammary tumor FM3A cells. *Cancer Res* 1981;41:1497-501.
- Balzarini J, De Clercq E, Torrence PF, Mertes MP, Park JS, Schmidt CL, Shugar D, Barr PJ, Jones AS, Verhelst G, Walker RT, Role of thymidine kinase in the inhibitory activity of 5-substituted-2'-deoxyuridines on the growth of human and murine tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 1982;31:1089-1095.
- Balzarini J and De Clercq E, Strategies for the measurement of the inhibitory effects of thymidine analogs on the activity of thymidylate synthase in intact murine leukemia L1210 cells. *Biochim Biophys Acta* 1984;785:36-45.
- Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, Milano G, A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 1994; 30A:1517-22.
- Bronckaers A, Balzarini J, Liekens S, The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by Mycoplasma hyorhinis infection: Implications for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2008; 76:188-97.
- Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Liekens S, The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev* 2009;29:903-53.
- Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A, Prevalence of mycoplasma conserved DNA in malignant ovarian cancer detected using sensitive PCR-ELISA. *Gynecol Oncol* 1996;63:258-60.
- Charron J and Langelier Y, Analysis of deoxycytidine (dC) deaminase activity in herpes simplex virus-infected or HSV TK-transformed cells: association with mycoplasma contamination but not with virus infection. *J Gen Virol* 1981;57:245-50.
- Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM, Cassano A, La Torre G, Barone C. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology* 2006;70:366-77.
- Ciccolini J, Evrard A, Cuq P. Thymidine phosphorylase and fluoropyrimidines efficacy: a Jekyll and Hyde story. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004; 4:71-81.
- Congiatu C, Brancale A, Mason MD, Jiang WG, McGuigan C, Novel potential anticancer naphthyl phosphoramidates of BVdU: separation of diastereoisomers and assignment of the absolute configuration of the phosphorus center. *J Med Chem* 2006;49:452-5.
- de Bruin M, van Capel T, Smid K, van der Born K, Fukushima M, Hoekman K, Pinedo HM, Peters GJ, Role of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in fluoropyrimidine sensitivity and potential role of deoxyribose-1-phosphate. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004;23:1485-90.
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C, Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2002;3:415-24.
- Harris SA, McGuigan C, Andrei G, Snoeck R, De CE, Balzarini J, Synthesis and antiviral evaluation of phosphoramidate derivatives of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antivir Chem Chemother* 2001;12:293-300.
- Hatse S, De CE, Balzarini J, Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem Pharmacol* 1999;58:539-55.
- Hecker SJ and Erion MD, Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J Med Chem* 2008;51:2328-45.

- Huang S, Li JY, Wu J, Meng L, Shou CC, Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001; 7:266-9.
- Ishikawa T, Utoh M, Sawada N, Nishida M, Fukase Y, Sekiguchi F, Ishitsuka H, Tumor selective delivery of 5-fluorouracil by capecitabine, a new oral fluoropyrimidine carbamate, in human cancer xenografts. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1091-7.
- Jetté L, Bissoon-Haqqani S, Le FB, Maroun JA, Birnboim HC, Resistance of colorectal cancer cells to 5-FUdR and 5-FU caused by Mycoplasma infection. *Anticancer Res* 2008;28:2175-80.
- Kamoshida S, Shiohama K, Shimomura R, Inada K, Sakurai Y, Ochiai M, Matuoka H, Maeda K, Tsutsumi Y. Immunohistochemical demonstration of fluoropyrimidine-metabolizing enzymes in various types of cancer. *Oncol Rep*. 2005.14:1223-30.
- Kidder M, Chan PJ, Seraj IM, Patton WC, King A. Assessment of archived paraffin-embedded cervical condyloma tissues for mycoplasma-conserved DNA using sensitive PCR-ELISA. *Gynecol Oncol* 1998;71:254-257.
- Kinsella AR and Smith D, Tumor resistance to antimetabolites. *Gen Pharmacol* 1998;30:623-6.
- Koopman M, Venderbosch S, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Punt CJ. A review on the use of molecular markers of cytotoxic therapy for colorectal cancer, what have we learned? *Eur J Cancer* 2009; 45: 1935-49.
- Kosaka T, Usami K, Ueshige N, Sugaya J, Nakano Y, Takashima S. Effects of thymidine phosphorylase levels in cancer, background mucosa, and regional lymph nodes on survival of advanced gastric cancer patients receiving postoperative fluoropyrimidine therapy. *Oncol Rep* 2004; 12:1279-86.
- Liekens S, Bronckaers A, Balzarini J, Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes. *Lancet Oncol* 2009;10:628-35.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-8.
- McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* 1993,36, 1048.
- McGuigan, C.; Cahard, D.; Hendrika, D.; Sheeka, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Aryl phosphoramidate derivatives of d4T have improved anti-HIV efficacy in tissue culture and may act by the generation of a novel intracellular metabolite. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1748.
- McGuigan, C.; Tsang, H. W.; Cahard, D. Turner, K.; Velazquez, S.; Salgado, A.; Bidois, L.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Phosphoramidate derivatives of d4T as inhibitors of HIV: The effect of amino acid variation. *Antiviral Res.* 1997, 35, 195.
- McGuigan, C.; Mehellou, J.; Balzarini, J. Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells. *Chem.Med.Chem.*, 2009, 4, 11, 1779.
- McGuigan C, Gilles A, Madela K, Aljarah M, Holl S, Jones S, Vernachio J, Hutchins J, Ames B, Bryant KD, Gorovits E, Ganguly B, Hunley D, Hall A, Kolykhalov A, Liu Y, Muhammad J, Raja N, Walters R, Wang J, Chamberlain S, Henson G, Phosphoramidate ProTides of 2'-C-methylguanosine as highly potent inhibitors of hepatitis C virus. Study of their in vitro and in vivo properties. *J Med Chem* 2010;53:4949-57.
- Mehellou Y, Balzarini J, McGuigan C, Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells. *ChemMedChem* 2009;4:1779-91.
- Mehellou, Y.; Valente, R.; Mottram, H.; Walsby, E.; Mills, K. I.; Balzarini, J.; MCGUGAN, C. Phosphoramidates of 2'-β-d-arabinouridine (AraU) as phosphate prodrugs; design, synthesis, in vitro activity and metabolism. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 2439
- Moertel CG, Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1136-42.
- Murakami Y, Kazuno H, Emura T, Tsujimoto H, Suzuki N, Fukushima M, Different mechanisms of acquired resistance to fluorinated pyrimidines in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 2000;17:277-83.
- Neale GA, Mitchell A, Finch LR, Enzymes of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J Bacteriol* 1983;156:1001-5.
- Pehlivan M, Pehlivan S, Onay H, Koyuncuoglu M, Kirkali Z, Can mycoplasma-mediated oncogenesis be responsible for formation of conventional renal cell carcinoma? *Urology* 2005;65:411-414
- Peters GJ and Kohne CH, Resistance to antimetabolites. In: *Fluoropyrimidines as Antifolate Drugs in Cancer Therapy*. Jackman AL (ed). Humana Press Inc. 1999;pp101-145.
- Razin S, The mycoplasmas. *Microbiol Rev* 1978;42:414-70.
- Razin S, Yogev D, Naot Y, Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-156.
- Sasaki H, Igaki H, Ishizuka T, Kogoma Y, Sugimura T, Terada M, Presence of Streptococcus DNA sequence in surgical specimens of gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:791-4.
- Seno T, Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Takeishi K, Hori T, Thymineless death and genetic events in mammalian cells. *Basic Life Sci* 1985;31:241-63.
- Seno T, Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Takeishi K, Hori T, Thymineless death and genetic events in mammalian cells. *Basic Life Sci* 1985;31:241-63.
- Sinigaglia F and Talmadge KW, Inhibition of [3H]thymidine incorporation by *Mycoplasma arginini*-infected cells due to enzymatic cleavage of the nucleoside. *Eur J Immunol* 1985;15:692-6.
- Sotos GA, Grogan L, Allegra CJ, Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev* 1994;20:11-49.
- Tanaka F, Fukuse T, Wada H, Fukushima M, The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1:137-64.

Tham TN, Ferris S, Kovacic R, Montagnier L, Blanchard A, Identification of Mycoplasma pirum genes involved in the salvage pathways for nucleosides. J Bacteriol 1993;175:5281-5.

Walko CM and Lindley C, Capecitabine: a review. Clin Ther 2005;27:23-44.

5 Yang H, Qu L, Ma H, Chen L, Liu W, Liu C, Meng L, Wu J, Shou C, Mycoplasma hyorhinis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. BMC Gastroenterol 2010; 10

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un compuesto seleccionado del grupo que comprende:
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-iso-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(pentoxi-L-metioninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(hexoxi-L-alaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-iso-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-metioninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi- α , α -dimetilglicina)]fosfato;

o un derivado farmacéuticamente aceptable de estos, en donde dicho derivado farmacéuticamente aceptable es cualquier sal, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptables.
2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde el compuesto se selecciona del grupo que comprende:
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-iso-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(benzoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[fenil(pentoxi-L-metioninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(hexoxi-L-alaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-iso-leucinil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-fenilalaninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(benzoxi-L-metioninil)]fosfato
 - 5-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi- α , α -dimetilglicina)]fosfato.
3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde el compuesto es 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-leucinil)]fosfato o un derivado farmacéuticamente aceptable de estos, en donde dicho derivado farmacéuticamente aceptable es cualquier sal, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptables.
4. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 3 en donde el compuesto es 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(pentoxi-L-leucinil)]fosfato.
5. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde el compuesto es 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(hexoxi-L-alaninil)]fosfato o un derivado farmacéuticamente aceptable de estos, en donde dicho derivado farmacéuticamente aceptable es cualquier sal, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptables.
6. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 5 en donde el compuesto es 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-[1-naftil(hexoxi-L-alaninil)]fosfato.
7. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto es para usar en un método de profilaxis o tratamiento en homo sapiens.
8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7 en donde el cáncer se selecciona del grupo que comprende leucemia, cáncer pancreático, de próstata, de pulmón, de mamas; de cuello uterino; del esófago; gastrointestinal, que incluye cáncer gástrico, de intestino delgado, de colon y de recto; cáncer de cabeza y cuello; y cáncer de ovario.
9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para usar en un método de profilaxis o tratamiento de cáncer en un paciente seleccionado de:
 - A) un paciente que ha desarrollado o tiene el potencial para desarrollar resistencia en células tumorales con respecto a la actividad de 5-fluoracil o 5-fluoro-2'-desoxiuridina en la profilaxis o el tratamiento de cáncer;
 - B) un paciente con células con nivel reducido de proteínas transportadoras de nucleósidos;
 - C) un paciente con células deficientes en nucleósido quinasa;

D) un paciente con células infectadas con micoplasmas; y/o
E) un paciente con células con nivel elevado de timidilato sintasa (TS).

- 5 10. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para usar junto con otra terapia anticancerígena.
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 10 12. Un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende la etapa de combinar un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.

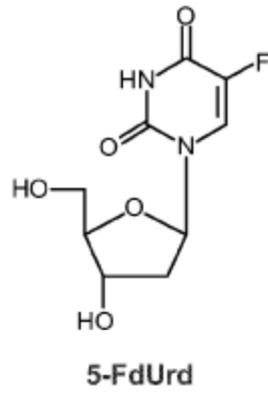


FIGURA 1

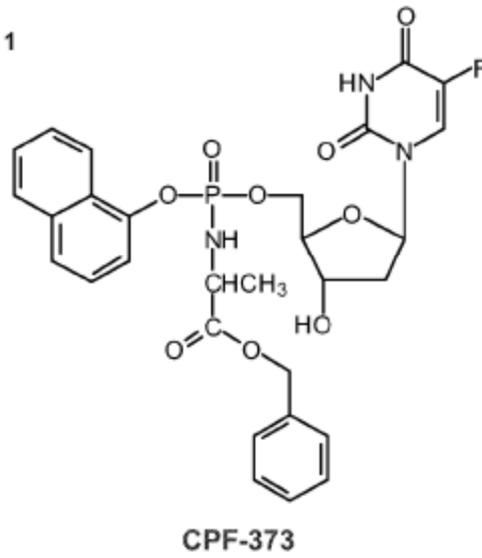


FIGURA 2(A)

Timidina Fosforilasa (TP) de *E. coli*

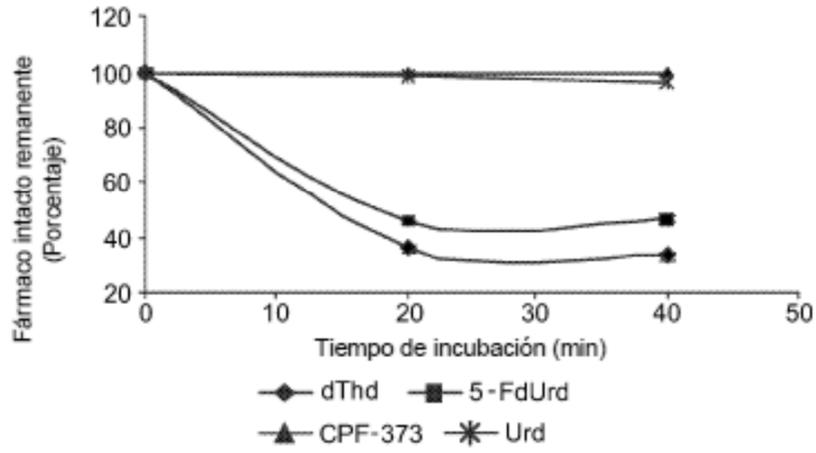


FIGURA 2(B)

Timidina Fosforilasa (TP) de humano

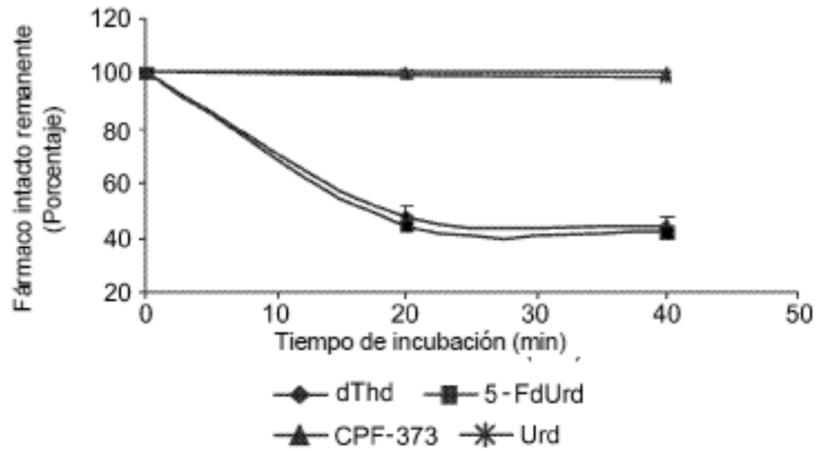


FIGURA 2(C)

Uridina Fosforilasa (UP) de humano

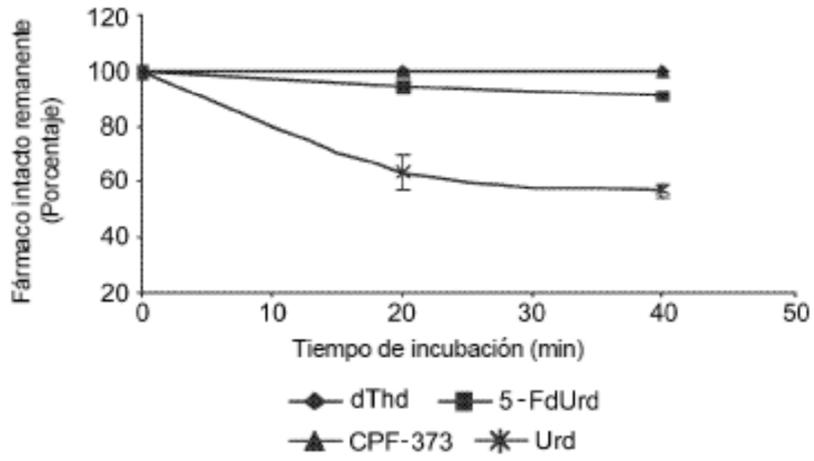


FIGURA 3(A)
Inhibición de TS en células L1210/0 por 5-FdUrd
(sustrato: [5-³H]dUrd)

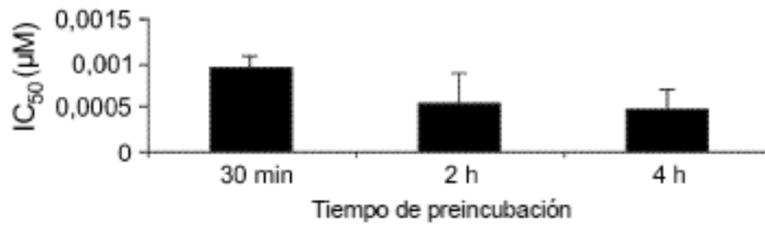


FIGURA 3(B)
Inhibición de TS en células L1210/0 por CPF-373
(sustrato: [5-³H]dUrd)

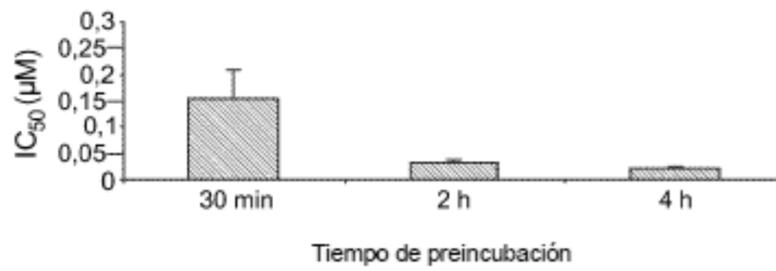


FIGURA 3(C)

Inhibición de TS en células L1210/0 por 5-FdUrd

(sustrato: [5-³H]dCyd)

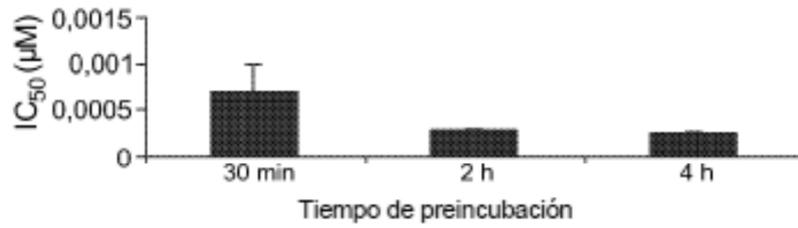


FIGURA 3(D)

Inhibición de TS en células L1210/0 por CPF-373

(sustrato: [5-³H]dCyd)

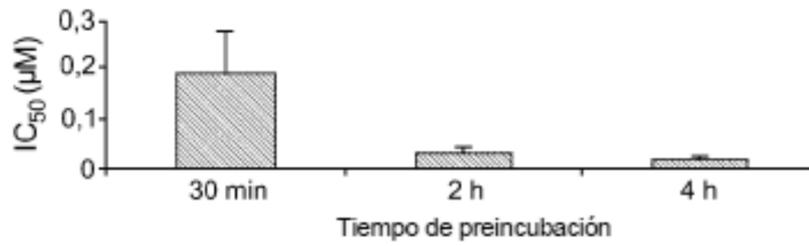


FIGURA 3(E)

Inhibición de TS en células L1210/TK por 5-FdUrd
(sustrato: [5-³H]dCyd)

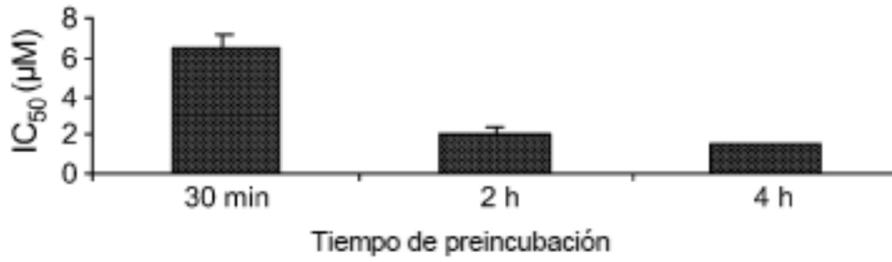


FIGURA 3(F)

Inhibición de TS en células L1210/TK por CPF-373
(sustrato: [5-³H]dCyd)

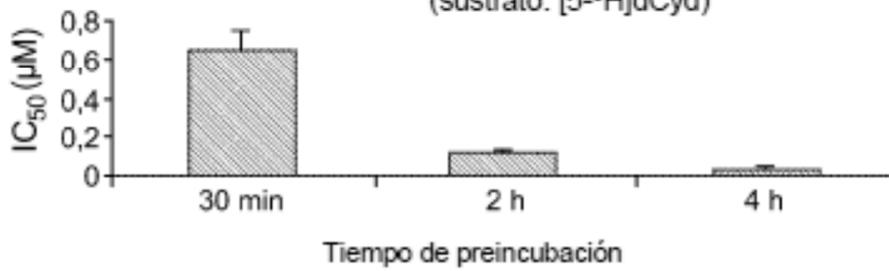
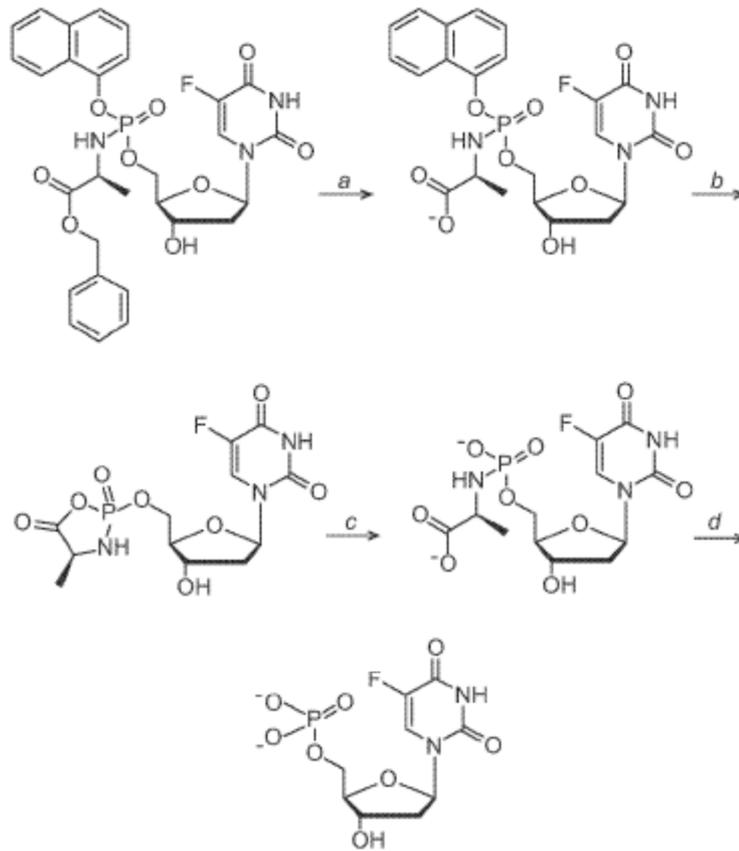


FIGURA 4



a: enzima de tipo esterasa o carboxipeptidasa b: espontáneo
 c: espontáneo d: enzima de tipo fosforamidasa

FIGURA 5

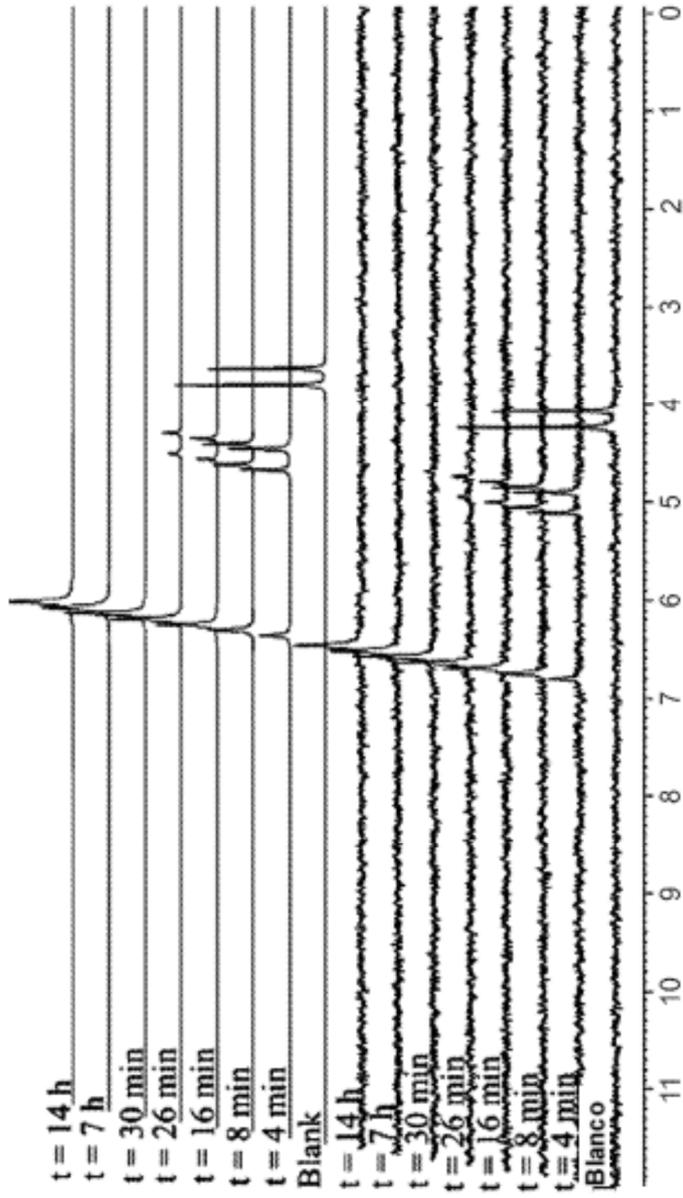


FIGURA 6

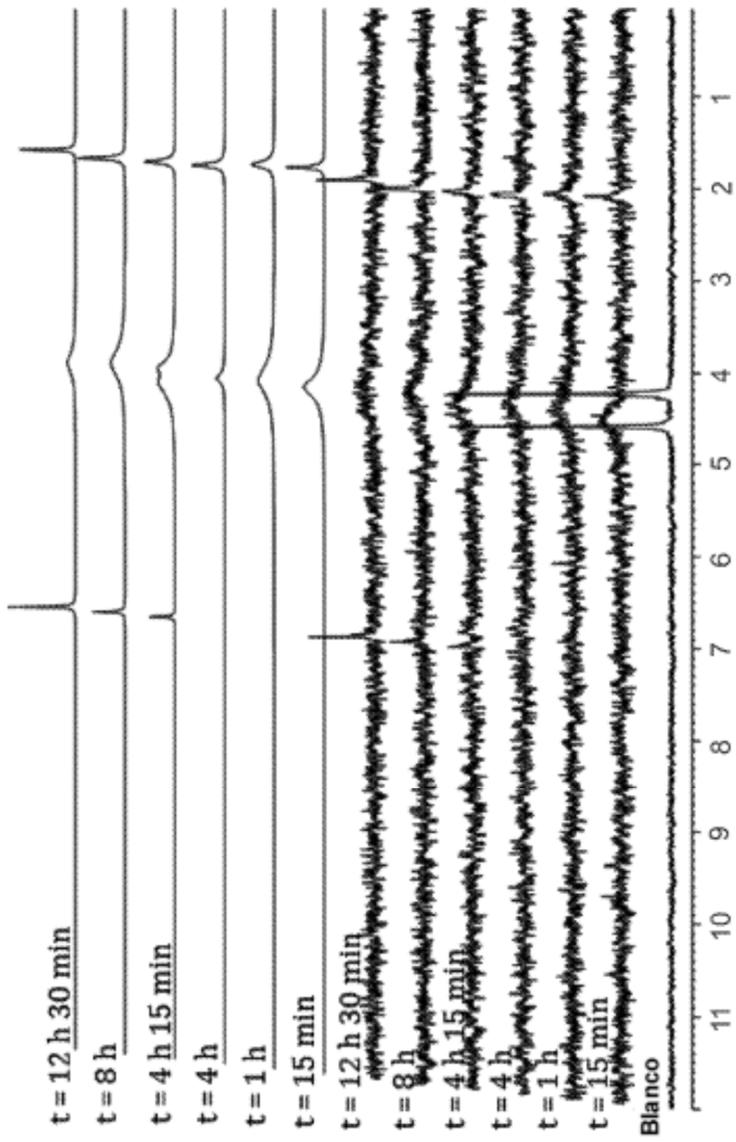
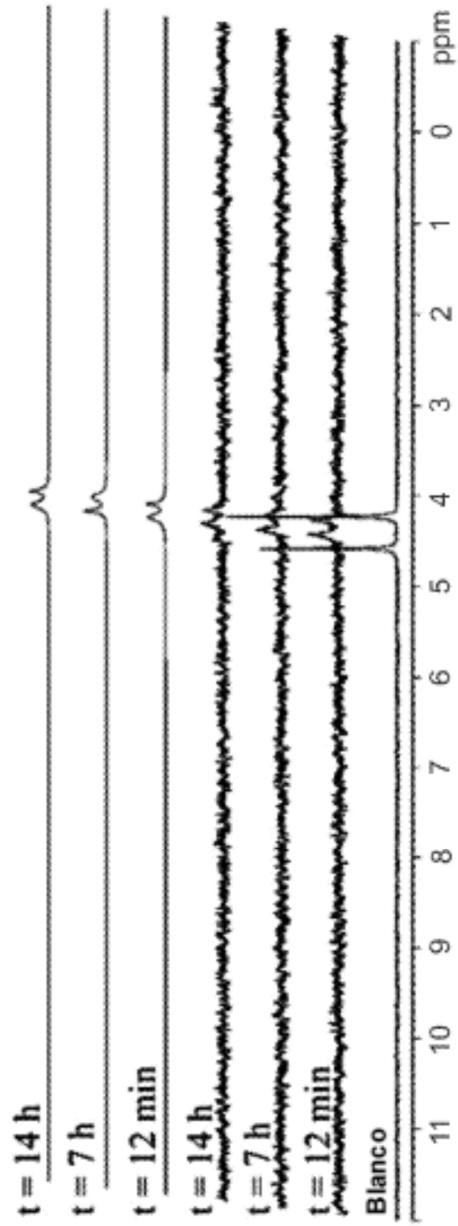


FIGURA 7



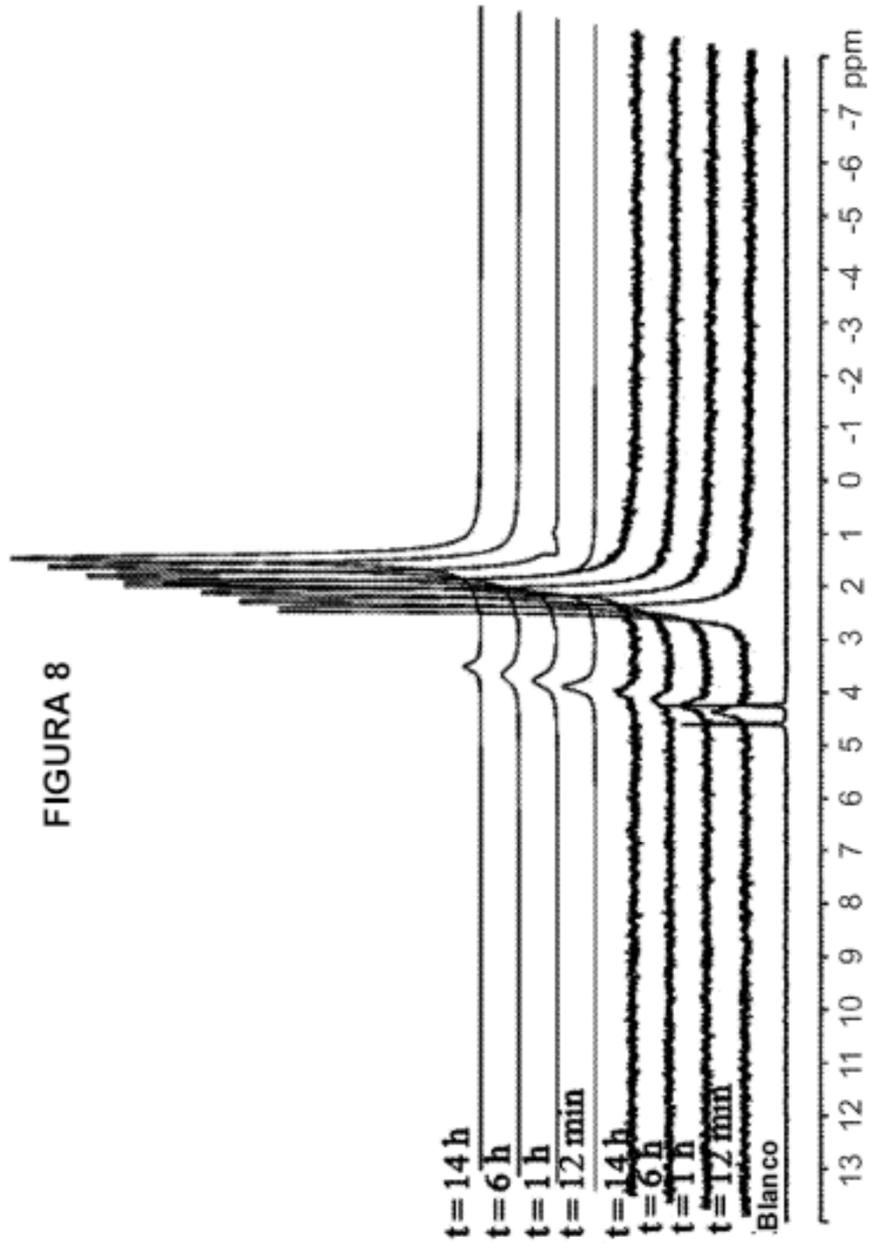


FIGURA 9(A)

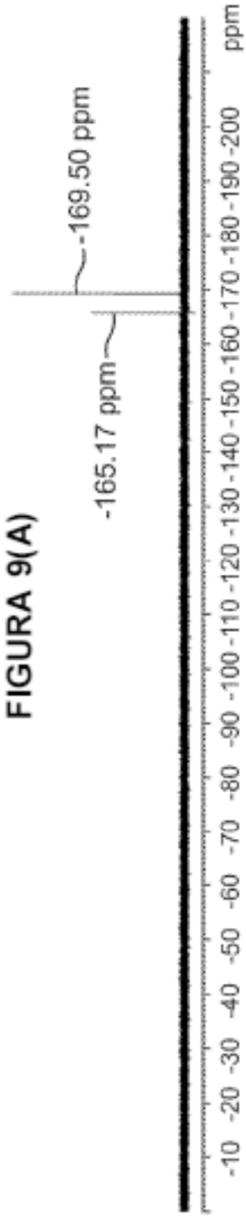


FIGURA 9(B)

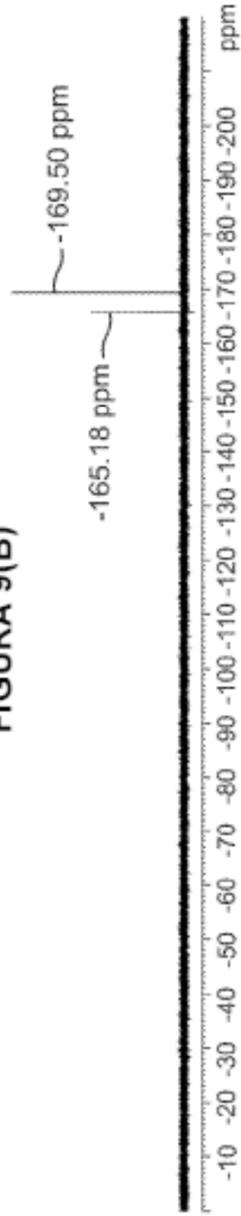


FIGURA 10(A)

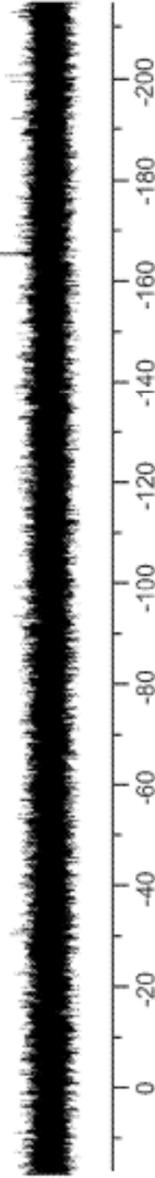


FIGURA 10(B)

