

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 573**

51 Int. Cl.:

C07C 291/04 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/136 (2006.01)
A61K 31/277 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C07C 225/36 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2013 PCT/GB2013/052106**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023956**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013 E 13763268 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2882708**

54 Título: **Nuevos compuestos y usos de estos**

30 Prioridad:

08.08.2012 GB 201214169

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

04.03.2019

73 Titular/es:

**BIOSTATUS LIMITED (100.0%)
56a Charnwood Road, Shepshed
Leicestershire LE12 9NP, GB**

72 Inventor/es:

**OGRODZINSKI, STEFAN;
SMITH, PAUL;
MCKEOWN, STEPHANIE;
PATTERSON, LAURENCE y
ERRINGTON, RACHEL, JANE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 702 573 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

Nuevos compuestos y usos de estos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos novedosos de antraquinona y los usos de estos, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

La ventaja terapéutica de un medicamento contra el cáncer depende principalmente de la medida en que el agente muestra actividad selectiva para las células tumorales y de la toxicidad limitante para los tejidos que no constituyen sus dianas. Con frecuencia, la calidad deficiente de la vasculatura dentro de la masa tumoral en crecimiento compromete el suministro de fármacos, nutrientes y oxígeno. Se reconoce que los tumores pueden tener niveles medianos de oxígeno significativamente más bajos (aproximadamente 1 % de oxígeno; pO₂ 7,5 mmHg) en comparación con los tejidos normales (~5,5 % oxígeno; 42 mmHg) (resumidos de los datos presentados por Brown y Wilson, 2004). Además, los niveles de oxigenación pueden variar a lo largo del tumor debido a la apertura y cierre intermitente de los vasos sanguíneos del tumor; la vascularización deficiente, especialmente en el núcleo del tumor, contribuye a que los niveles de oxígeno con frecuencia estén por debajo del 0,1 % de oxígeno (1 mm Hg). Las células tumorales que experimentan diversos grados de hipoxia, con relación a los tejidos perfundidos normalmente, pueden comprometer la efectividad del tratamiento y contribuir a la malignidad. Los agentes selectivos de la hipoxia (por ejemplo, los medicamentos bioreductores) comprenden una clase de agentes que pueden usarse para atacar células tumorales en ambientes con muy bajo oxígeno en virtud de una activación selectiva a una forma citotóxica en condiciones de oxigenación disminuida, lo que resuelve los problemas de la toxicidad de los tejidos que no constituyen sus dianas, la resistencia a fármaco de las células hipóxicas y la progresión del cáncer.

La oxigenación deficiente resulta en un estado de hipoxia relativo en comparación con las condiciones normóxicas en las que la oxigenación no se ha comprometido. La oxigenación deficiente dentro de los tumores puede modificar las respuestas a las modalidades de tratamiento y contribuir a la progresión del cáncer. Las células en tales áreas hipóxicas son particularmente resistentes al tratamiento con muchos de los fármacos contra el cáncer usados convencionalmente; esto se atribuye a un suministro deficiente de fármacos y/o a la falta de sensibilidad intrínseca para diferenciar las células tumorales de células viables pero inactivas. La radioterapia, además, es menos efectiva a niveles muy bajos de oxígeno ya que la citotoxicidad de las radiaciones ionizantes aumenta por la presencia de oxígeno (Radiobiology For The Radiologist, Hall EJ, Giaccia AJ, Lippincott Williams & Wilkins, (2005)). La evidencia reciente muestra que las células tumorales pueden adaptarse a condiciones de bajo oxígeno y cambiar las respuestas farmacodinámicas a los agentes contra el cáncer a través de la inducción de mecanismos protectores celulares activos (Vaupel y Mayer 2007, Cancer Metastasis Rev 26(2): 225-239). Además, se reconoce que las células tumorales que sobreviven al estrés hipóxico con frecuencia muestran un fenotipo metastásico más maligno (Vaupel P, Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression, Exp Oncol 2010; 32, 125-127); esto tiene consecuencias significativas para el paciente. Después de un tratamiento con modalidades que se dirigen predominantemente a las células mejor oxigenadas, las células hipóxicas resistentes al estrés con frecuencia producen la repoblación del tumor con células que tienen un potencial mayor para propagarse hacia tejidos distantes. El desarrollo de tumores metastásicos más malignos es, con frecuencia, el precursor de una morbilidad más significativa relacionada con la enfermedad y con la muerte del paciente.

Un enfoque atractivo es el uso de un profármaco activado por hipoxia que no es tóxico para las células adecuadamente oxigenadas que se encuentran en los tejidos sistémicos, pero que se activa o se convierte en una forma citotóxica en condiciones de oxigenación disminuida. Los derivados N-óxido de alquilaminoantraquinonas citotóxicas proporcionan profármacos de antraquinona que casi no muestran citotoxicidad. Es importante resaltar que estos profármacos son capaces de convertirse *in vivo* bajo las condiciones anaeróbicas/hipóxicas que se encuentran dentro del tejido neoplásico. La especificidad para el tumor está asegurada ya que los tejidos sistémicos, excepto para los tumores, casi nunca experimentan niveles de oxígeno suficientemente bajos para facilitar la producción del fármaco citotóxico.

El N-óxido de antraquinona AQ4N (CAS# 136470-65-0) es un profármaco que en sistemas biológicos se reduce selectivamente a AQ4, un inhibidor potente de la topoisomerasa II del ADN, en células tumorales hipóxicas. Publicaciones anteriores han enseñado las propiedades fundamentales y las características *in-vitro* / *in-vivo* del profármaco AQ4N (por ejemplo, ver el documento US 5,132,327).

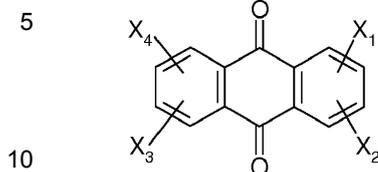
La invención trata de abordar la necesidad de tratamientos mejorados contra el cáncer al proporcionar compuestos novedosos de antraquinona con una combinación de propiedades farmacológicas y de detección de hipoxia preferidas.

Siegel MM, Hydrogen-Deuterium Exchange Studies Utilizing a Thermospray Mass Spectrometer Interface, Anat. Chem. 1988, 60, 2090-2095 describe el enriquecimiento de deuterio de diversos compuestos de interés farmacéutico para los fines de la elucidación estructural.

65

Resumen de la invención

El primer aspecto de la invención proporciona un compuesto de la Fórmula I



Fórmula I

15 en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno independientemente seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halógeno, amino, alcoxilo de C_{1-4} , alcanoiloxilo de C_{2-8} , $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$ y $-NH-A-N(O)R'R''$ en donde A es un grupo alquileo con una longitud de la cadena de al menos dos átomos de carbono (entre NH y NHR o $N(O)R'R''$),

20 en donde R, R' y R'' son cada uno independientemente seleccionados a partir de los grupos alquilo de C_{1-4} e hidroxialquilo de C_{2-4} y de los grupos dihidroxialquilo de C_{2-4} en los cuales el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y ningún átomo de carbono está sustituido por dos grupos hidroxilo, o en donde R' y R'' juntas son un grupo alquileo de C_{2-6} que, con el átomo de nitrógeno al que están unidas R' y R'' forman un grupo heterocíclico que tiene 3 a 7 átomos en el anillo,

25 en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 se seleccionan a partir del grupo que consiste en formas deuteradas de $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$ y $-NH-A-N(O)R'R''$.

Por lo tanto, la invención proporciona compuestos deuterados novedosos de antraquinona.

30 Por "deuterado" incluimos que el compuesto comprende al menos un átomo de deuterio o hidrógeno pesado (*es decir* D o 2H). Los expertos en la técnica apreciarán que el compuesto puede estar parcialmente (*es decir* selectivamente) o completamente deuterado (*es decir*, que contiene hidrógeno presente solamente en forma de deuterio).

35 En este contexto por "selectivamente", queremos decir que algunos, pero no todos, los átomos de hidrógeno 1H convencionales se reemplazan con deuterio. Por ejemplo, uno o más de los grupos sustituyentes X_1 , X_2 , X_3 y X_4 pueden ser deuterados, mientras que el anillo central de antraquinona puede estar libre de deuterio.

40 En una modalidad, el compuesto de la invención está deuterado selectivamente dentro de uno o más de los grupos sustituyentes $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$ y/o $-NH-A-N(O)R'R''$ en las posiciones X_1 , X_2 , X_3 y/o X_4 . Dentro de cada uno de dichos grupos sustituyentes, se apreciará que A, R, R' y R'' pueden estar completamente deuterados (*es decir*, que no contienen 1H) o pueden estar parcialmente deuterados.

45 En una modalidad preferida, el compuesto está deuterado solamente dentro de uno o más de los grupos terminales R, R' y R''. Por ejemplo, R, R' y/o R'' pueden representar:

- CD^3 ;
- CH_2CD^3 ;
- CD_2CD^3 ;
- $CD_2CH_2CD^3$; y
- $CD_2CD_2CD_2CD^3$.

50 El término "alquilo de C_{1-4} " pretende incluir grupos alquilo lineales o ramificados que comprenden entre uno y cuatro carbonos. Los grupos alquilo preferidos cuyas R, R' y/o R'' pueden representar independientemente incluyen alquilo de C_1 y C_2 .

El término "alquileo inferior" debe interpretarse en consecuencia.

55 Los términos "hidroxialquilo de C_{2-4} " y "dihidroxialquilo de C_{2-4} " pretenden incluir grupos alquilo lineales o ramificados que comprenden entre dos y cuatro carbonos, a los que están unidos uno o dos grupos hidroxilo, respectivamente. Por ejemplo, R, R' y/o R'' pueden representar independientemente:

- CH_2CH_2OH
- $CH_2CH(OH)CH_3$
- $CH_2CH_2CH(OH)CH_2OH$

60 El término "alcoxilo de C_{1-4} " pretende incluir grupos alquilo de C_{1-4} lineales o ramificados unidos al núcleo del anillo de antraquinona (antraceno-9,10-diona) a través de oxígeno. Por ejemplo, R, R' y/o R'' pueden representar independientemente:

- OCH₃
- OCH₂CH₃
- OCH₂CH₂CH₃
- OCH₂CH₂CH₂CH₃

5

El término "alcanoiloxilo de C₂₋₈" pretende incluir grupos alcanoilo de C₂₋₈ lineales o ramificados unidos al anillo de antraquinona central (antraceno-9,10-diona) a través del oxígeno. Por ejemplo, R, R' y/o R" pueden representar independientemente:

10

- O(O)CCH₃
- O(O)CCH₂CH₃
- O(O)CCH₂CH₂CH₃
- O(O)CCH₂CH₂CH₂CH₃
- O(O)CCH₂CH₂CH(CH₃)CH₃

15

El término "hidroxilo" pretende representar -OH.

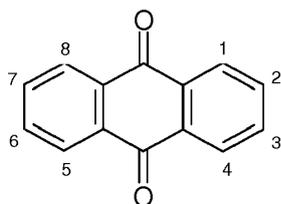
El término "halógeno" pretende representar cualquier grupo halógeno, tal como -Br, -Cl y -F.

20

El término "amino" pretende incluir grupos de aminas primarias, tales como -NH₂.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el anillo de antraquinona de los compuestos puede sustituirse por X₁, X₂, X₃ y X₄ en cualquiera de las posiciones del anillo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8:

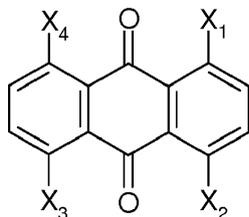
25



30

En una modalidad del primer aspecto de la invención, el compuesto está sustituido en las posiciones 1, 4, 5 y 8 del anillo, de acuerdo con la Fórmula II:

35



40

Fórmula II

45

En una modalidad, X₁, X₂, X₃ y X₄ cada una se selecciona individualmente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, -NH-A-NHR, -NH-A-NR'R", -NH-A-N(O)R'R" y las formas deuteradas de estos.

50

En una modalidad, X₁, X₂, X₃ y X₄ cada una se selecciona individualmente a partir del grupo que consiste en hidroxilo, -NH-A-NR'R", -NH-A-N(O)R'R" y las formas deuteradas de estos.

En una modalidad, X₁ y X₂ ambas son hidroxilo y X₃ y X₄ ambas son -NH-A-N(O)R'R" o las formas deuteradas de estos.

55

En una modalidad, X₁ y X₂ ambas son hidroxilo y X₃ y X₄ ambas son NH-A-NR'R" o las formas deuteradas de estos.

En una modalidad, A no es ramificado. Por ejemplo, A puede ser etileno.

60

En una modalidad, R, R' y R" cada una se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH(CH₃)CH₂OH, -CH₂CHOHCH₂OH y las formas deuteradas de estos.

En una modalidad, uno o dos de X₁, X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en -NH-(CH₂)₂-N(O)(CH₃)₂, -NH-(CH₂)₂-N(O)(CH₃)C₂H₅, -NH-(CH₂)₂-N(O)(C₂H₅)₂, -NH-(CH₂)₂-N(O) (CH₂CH₂OH)₂, -NH-

$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH})_2$ y las formas deuteradas de estos.

5 En una modalidad, uno o dos de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NCH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH})_2$ y las formas deuteradas de estos.

10 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende un grupo $-\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y un grupo $-\text{NH-A-NHR}$, el grupo $-\text{NH-A-NHR}$ se selecciona a partir de $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_3$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHC}_2\text{H}_5$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ y las formas deuteradas de estos.

15 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende un grupo $-\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y un grupo $-\text{NH-A-NHR}$, el grupo $-\text{NH-A-NHR}$ se selecciona a partir de $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_3$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHC}_2\text{H}_5$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ y las formas deuteradas de estos.

En compuestos preferidos de la invención, pero no limitantes:

- 20 (a) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{H}$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (b) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$, $X_3 = -\text{OH}$ y $X_4 = -\text{H}$;
 (c) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_2 = X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (d) $X_1 = X_4 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_2 = X_3 = -\text{OH}$;
 (e) $X_1 = X_2 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (f) $X_1 = X_3 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_2 = X_4 = -\text{OH}$;
 (g) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{H}$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (h) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$ en la posición 4, $X_3 = -\text{OH}$ y $X_4 = -\text{H}$;
 (i) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_2 = X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (j) $X_1 = X_4 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_2 = X_3 = -\text{OH}$;
 (k) $X_1 = X_2 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (l) $X_1 = X_3 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_2 = X_4 = -\text{OH}$;
 y las formas deuteradas de estos.

30 En compuestos adicionales preferidos de la invención, pero no limitantes:

- 35 (a) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{NH-A-NHR}$, y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (b) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$, $X_3 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_4 = -\text{OH}$;
 (c) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = X_3 = -\text{OH}$ y $X_4 = -\text{NH-A-NHR}$;
 (d) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{NH-A-NHR}$, y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (e) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$, $X_3 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_4 = -\text{OH}$;
 (f) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = X_3 = -\text{OH}$ y $X_4 = -\text{NH-A-NHR}$;
 y las formas deuteradas de estos.

40 En compuestos adicionales preferidos de la invención, pero no limitantes:

- (a) $X_1 = X_2 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (b) $X_1 = X_3 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ y $X_2 = X_4 = -\text{OH}$;
 (c) $X_1 = X_2 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$; y
 (d) $X_1 = X_3 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ y $X_2 = X_4 = -\text{OH}$

45 en donde

ambos $-\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ son $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$ o $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, o las formas deuteradas de estos y ambos $-\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ son $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ o $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, o las formas deuteradas de estos.

En compuestos adicionales preferidos de la invención, pero no limitantes:

- 50 (a) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$;
 (b) $X_1 = -\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$, $X_3 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_4 = -\text{OH}$;
 (c) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_3 = X_4 = -\text{OH}$; y
 (d) $X_1 = -\text{NH-A-NR}'\text{R}''$, $X_2 = -\text{OH}$, $X_3 = -\text{NH-A-NHR}$ y $X_4 = -\text{OH}$,
 en donde

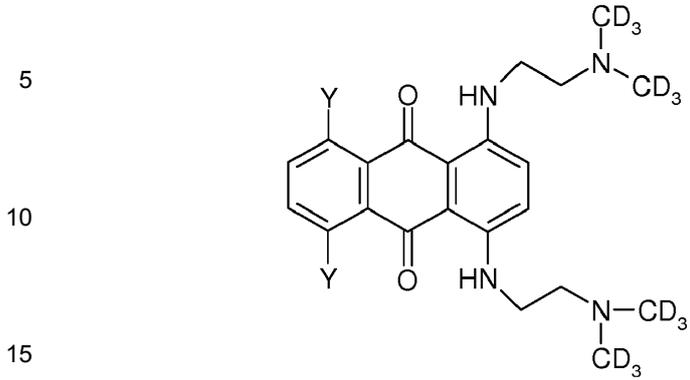
- 55 • $-\text{NH-A-N}(\text{O})\text{R}'\text{R}''$ es $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$ o $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ o una forma deuterada de estos
 • $-\text{NH-A-NHR}$ es $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_3$ o $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ o una forma deuterada de estos
 y $-\text{NH-A-NR}'\text{R}''$ es $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ o $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ o una forma deuterada de estos.

En una modalidad, el compuesto es de la Fórmula III o IV:

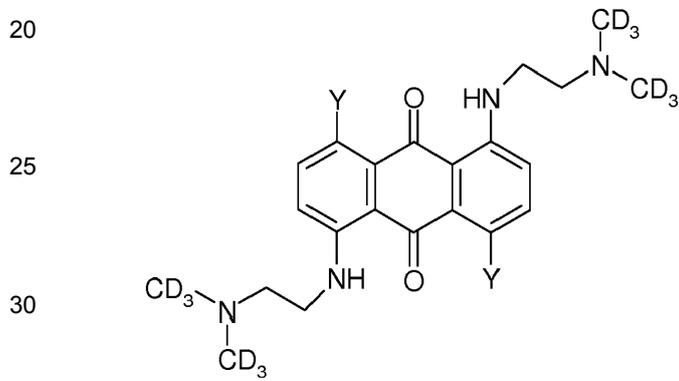
60

65

Fórmula III



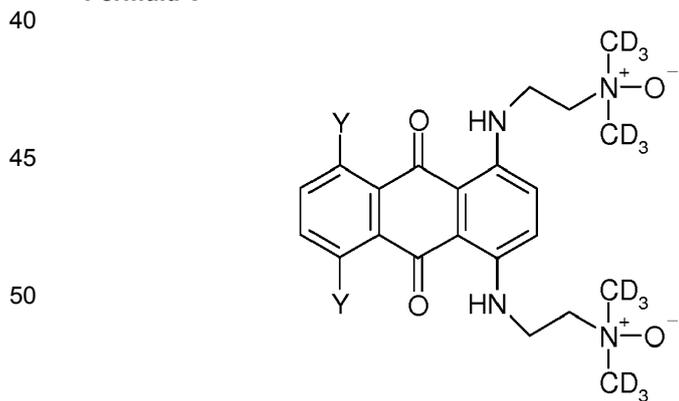
Fórmula IV



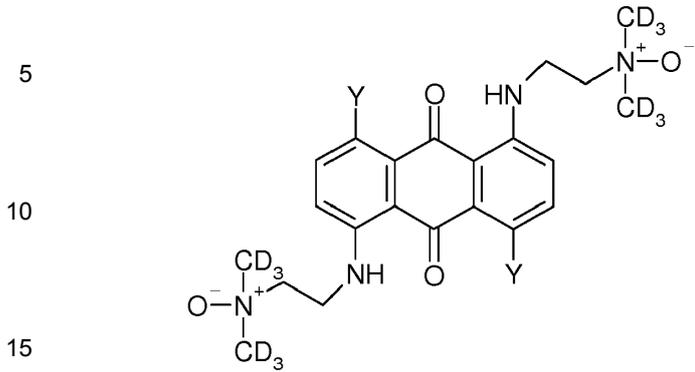
35 en donde Y son cada una independientemente seleccionadas a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halógeno, amino, alcoxilo de C₁₋₄ y alcanoxilo de C₂₋₈.

Por lo tanto, en una modalidad, el profármaco es un compuesto de la Fórmula V o VI:

Fórmula V



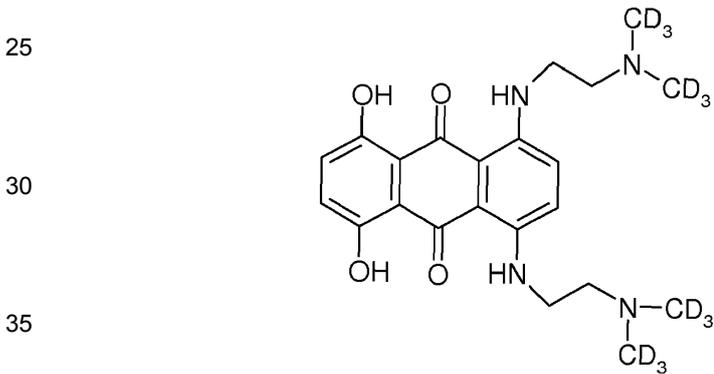
Fórmula VI



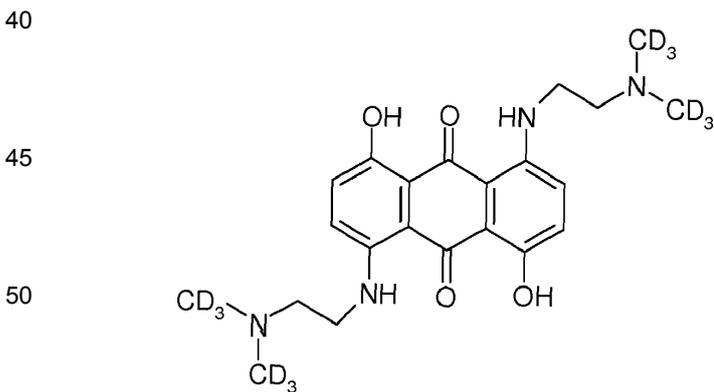
en donde Y son cada una independientemente seleccionadas a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halógeno, amino, alcoxilo de C₁₋₄ y alcanoxilo de C₂₋₈.

20 En una modalidad preferida, el compuesto es de la Fórmula VII o VIII:

Fórmula VII



Fórmula VIII

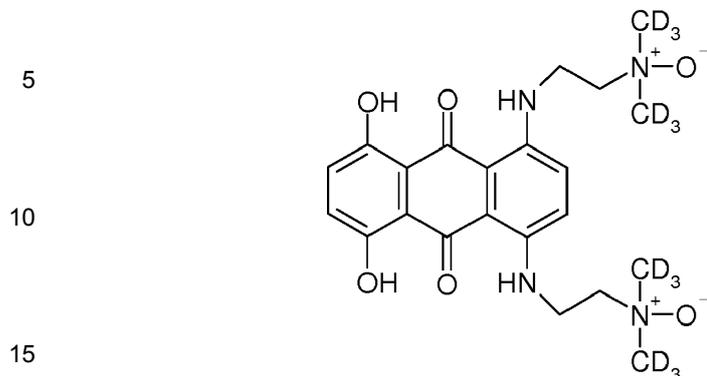


55 En una modalidad adicional preferida, el compuesto es el profármaco de la Fórmula IX o X:

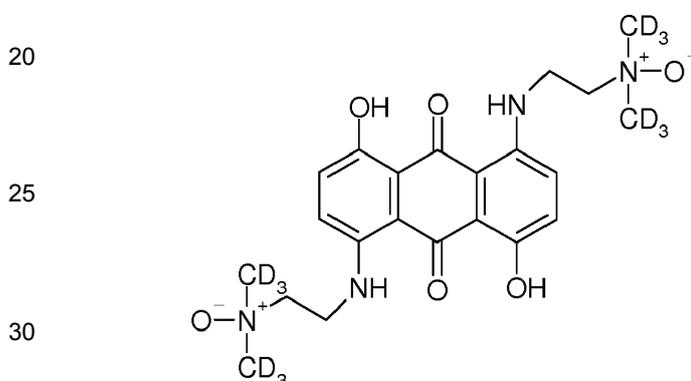
60

65

Fórmula IX



Fórmula X



35 En los compuestos de las Fórmulas III a X, se apreciará por los expertos en la técnica que uno o más de los átomos de deuterio en uno o más de los grupos metilo unidos al nitrógeno de los grupos amino terminales pueden reemplazarse por hidrógeno convencional (*es decir* ^1H), siempre y cuando el compuesto comprenda al menos un átomo de deuterio. Por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro de los grupos metilo pueden ser $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{D}$ o $-\text{CHD}_2$. En una modalidad, los grupos metilo en el compuesto son ambos, $-\text{CH}_3$ o $-\text{CD}_3$.

40 Además, se apreciará por los expertos en la técnica que ciertos compuestos de las Fórmulas I a X anteriores pueden contrarrestarse por contraaniones. Los contraaniones ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, haluros (*por ejemplo*, fluoruro, cloruro y bromuro), sulfatos (*por ejemplo*, decilsulfato), nitratos, percloratos, sulfonatos (*por ejemplo*, metanosulfonato) y trifluoroacetato. Otros contraaniones adecuados serán bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, los derivados de los compuestos de las Fórmulas I a X, aceptables farmacéuticamente y/o veterinariamente, tales como sales y solvatos, se incluyen, además, dentro del alcance de la invención. Las sales que pueden mencionarse incluyen: sales de adición de ácido, por ejemplo, sales formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, con ácidos carboxílicos o con ácidos organosulfónicos; sales de adición de bases; sales metálicas formadas con bases, por ejemplo, las sales de sodio y potasio.

50 En una modalidad, el compuesto está en la forma de una sal de haluro, por ejemplo, una sal de cloruro.

Además, se apreciará por un experto en la técnica que ciertos compuestos de las Fórmulas I a X pueden presentar tautomerismo. Todas las formas tautoméricas y las mezclas de estas se incluyen dentro del alcance de la invención.

55 Los compuestos de las Fórmulas I a X pueden contener, además, uno o más átomos de carbonos asimétricos y, por lo tanto, pueden presentar isomerismo óptico y/o diastereoisomerismo. Los diastereoisómeros pueden separarse mediante el uso de técnicas convencionales *por ejemplo* cromatografía o cristalización fraccionada. Los diversos estereoisómeros pueden aislarse mediante la separación de una mezcla racémica u otra mezcla de los compuestos mediante el uso de técnicas convencionales, *por ejemplo*, la cristalización fraccionada o HPLC. Alternativamente, los isómeros ópticos deseados pueden hacerse mediante la reacción de los materiales de partida apropiados ópticamente activos en condiciones que no causarán racemización o epimerización, o mediante la derivatización, por ejemplo, con un ácido homoquiral seguido por la separación de los ésteres diastereoméricos por medios convencionales (*por ejemplo*, HPLC, cromatografía sobre sílice). Todos los estereoisómeros se incluyen dentro del alcance de la invención.

65 Para la síntesis de los compuestos de la invención están disponibles diversas rutas. Un procedimiento muy conveniente para la preparación de compuestos que tienen un grupo $-\text{NH}-\text{A}-\text{NR}'\text{R}''$ en las posiciones 1 y 4 utiliza el 2,3-dihidro(leuco)-

1,4-dihidroxiantraceno-9,10-diona sustituido apropiadamente, que se condensa con la amina apropiada R''R'N-A--NH₂, las posiciones 1, 4 están activadas en el compuesto leuco para la reacción con la amina. Tal condensación puede efectuarse convenientemente a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 25 °C o 35 °C hasta 50 °C o 60 °C durante una o más horas mediante el uso de un disolvente tal como metanol, etanol, agua, dimetilformamida, 2-metoxietanol, acetonitrilo, nitrobenzoceno, N,N,N'N'-tetrametilendiamina o mezclas de estos. En algunos casos, pueden ser apropiados una temperatura más alta y un tiempo de reacción más corto, por ejemplo, con los compuestos que contienen grupos cíclicos NR'R''. Después, el derivado leuco se oxida a antraceno-9,10-diona totalmente aromática, mediante el uso, convenientemente, de la oxidación por aire u oxidación con peróxido de hidrógeno, cloranilo, perborato de sodio o dióxido de manganeso.

Aunque los compuestos leuco son principalmente de interés para la preparación de compuestos sustituidos por dos grupos -NH-A-NHR'R'', es posible usarlos para preparar compuestos que contienen más de dos de tales grupos. Por lo tanto, mediante el uso de 2,3-dihidro(leuco)-1,4,5,8-tetrahidroxiantraceno-9,10-diona y un gran exceso de una amina -NH-A-NHR'R'' puede prepararse un 8-hidroxiantraceno-9,10-diona que tiene tres grupos -NH-A-NHR'R'' en las posiciones 1, 4 y 5.

Los propios derivados leuco pueden obtenerse, convenientemente, mediante el tratamiento térmico de la 1,4-dihidroxiantraceno-9,10-diona correspondiente totalmente aromática, mediante calentamiento a más de 90 °C durante 1 hora o más en una corriente de nitrógeno y, si es necesario, en la presencia de un agente reductor adecuado, tal como ditionito de sodio o polvo de zinc. Diversos antraceno-9,10-dionas, particularmente hidroxiantraceno-9,10-dionas, están disponibles comercialmente y, además, diversas síntesis de tales compuestos se reportan en la literatura. Un procedimiento adecuado para su preparación involucra la reacción de un anhídrido ftálico apropiadamente sustituido con hidroquinona en la presencia de cloruro de aluminio e hidróxido de sodio a 180 °C durante una hora o más. Las antraceno-9,10-dionas que contienen una forma de grupo sustituyente pueden modificarse para proporcionar otras formas de grupo sustituyente, de manera que, por ejemplo, una diona que contiene un grupo amino puede tratarse con hidróxido de sodio/ditionita para producir el compuesto correspondiente hidroxilo sustituido.

Otros procedimientos adecuados para la preparación de productos intermedios para la oxidación de los compuestos N-óxido de la invención incluyen la reacción de la antraceno-9,10-diona apropiada sustituida con cloro o flúor con la amina apropiada R''R'N--A--NH₂, por ejemplo, mediante el calentamiento con un exceso de la amina a su temperatura de reflujo durante una o más horas. Algunas de estas antraceno-9,10-dionas -cloro y -flúor son conocidas y, además, para tales compuestos se reportan diversas síntesis en la literatura. Por lo tanto, por ejemplo, una conversión mediada por KF-NaF del anhídrido 3,6-dicloroftálico a anhídrido 3,6-difluoroftálico como un precursor para la fabricación de 1,4-difluoro-4,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona (ver Lee & Denny, 1999, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1:2755-2758. Adicionalmente, por ejemplo, el 1,5-dicloro-4,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona puede prepararse mediante cloración selectiva de 1,4,5,8-tetrahidroxiantraceno-9,10-diona mediante el uso de una cantidad estequiométrica de cloruro de sulfuro y temperatura controlada. Después, este precursor puede usarse para preparar un producto intermedio que tiene grupos -NH-A-NR'R'' en las posiciones 1 y 5 y grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 8, los grupos hidroxilo se protegen convenientemente durante la reacción con la amina R''R'N--A--NH₂. Un enfoque similar es adecuado para la preparación de otros productos intermedios de clorohidroxiantraceno-9,10-diona.

Cuando el compuesto de la invención contiene uno o más grupos -NH-A-NHR además del uno o más grupos -N-A-NR'R'' el compuesto puede producirse convenientemente mediante la reacción de un precursor adecuado, como se discutió anteriormente, con una mezcla de aminas RN--A-NH.sub.2 y R''R'N--A--NH.sub.2, después la mezcla resultante de los productos se separa, por ejemplo, mediante cromatografía. Por lo tanto, por ejemplo, el 2,3-dihidro(leuco)-1,4-dihidroxiantraceno-9,10-diona en una reacción con una mezcla de 2-(2-hidroxietilamino)etilamina y 2-(dietilamino)etilamina producirá una mezcla de 1,4-bis{[2-(dietilamino)-etil]amino}antraceno-9,10-diona, 1,4-bis{[2-(2-hidroxietil-amino)-etil]amino}-antraceno-9,10-diona y 1-(2-(dietilamino)etil]amino)-4-{[2-(2-hidroxietilamino)-etil]amino}antraceno-9,10-diona a partir del que el último compuesto mencionado puede separarse, por ejemplo, mediante cromatografía. En la oxidación, solamente el átomo de nitrógeno terciario del grupo [2-(dietilamino)etil]amino se convertirá a la forma de N-óxido.

Cuando uno o más grupos sustituyentes están presentes, puede ser apropiado, en dependencia de la ruta de síntesis, tenerlos presentes en su forma final o generar los grupos deseados en una etapa más tardía de la síntesis. Los grupos éter y éster X pueden, por supuesto, prepararse fácilmente mediante la modificación de grupos hidroxilo de acuerdo con procedimientos conocidos, los precursores que contienen un grupo hidroxilo X se describen con más frecuencia en la literatura que aquellos que contienen un sustituyente éter o éster correspondiente.

Sin embargo, se apreciará, que diversos métodos alternativos pueden usarse para la preparación de los compuestos y de los productos intermedios estos, como será evidente, en particular, a partir de la bibliografía relacionada con dichos productos intermedios. Los detalles adicionales de la preparación de los productos intermedios para la preparación de los compuestos de la presente invención se encuentran en los documentos US 4,197,249 y GB 2,004,293B.

Por lo tanto, un segundo aspecto de la invención proporciona un proceso para fabricar un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende la reacción de una antraceno-9,10-diona con una alquilendiamina deuterada en condiciones adecuadas para la producción de una alquilaminoalquilaminoantraquinona.

Opcionalmente, el proceso comprende, además, la etapa de la reacción de la alquilaminoalquilaminoantraquinona con un monoperoxifalato en condiciones adecuadas para la producción de un derivado N-óxido de la alquilaminoalquilaminoantraquinona.

5

En una modalidad, el proceso comprende la reacción de 1,4-difluoro-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona, 281-005 con N,N-dimetiletileno-diamina deuterada en condiciones adecuadas para la producción de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona.

10

En una modalidad adicional, el proceso comprende la etapa de la reacción del 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona con monoperoxifalato de magnesio en condiciones adecuadas para la producción de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona.

15

Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención junto con un tampón, diluyente, portador, adyuvante o excipiente aceptable farmacéuticamente.

20

Por "aceptable farmacéuticamente" incluimos un material no tóxico que no disminuye la eficacia terapéutica del compuesto de la invención. Tales tampones, portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente son bien conocidos en la técnica (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y el manual de Pharmaceutical Excipients, 3ra edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

25

El término "tampón" significa una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el propósito de estabilizar el pH. Los ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazol láctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

30

El término "diluyente" significa una solución acuosa o no acuosa con el propósito de diluir el agente en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

35

El término "adyuvante" significa cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del compuesto de la invención. El adyuvante puede ser uno o más de sales de zinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferentes composiciones de acilo. El adyuvante puede ser, además, polímeros catiónicos, tales como éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosán, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos, tales como poli(vinil imidazol), y polipéptidos catiónicos, tales como polihistidina, polilisina, poliarginina, y péptidos que contienen estos aminoácidos.

40

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se adicionan a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Los ejemplos de polímeros son almidón, ésteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de estos, ácido poliacrílico, polisulfonato, óxido de polietilenglicol/polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido/polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se adicionan a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión, o para la protección de los lípidos de la degradación química y proteolítica. Los ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di- y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud y saturación de la cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, huevo hidrogenado y lecitina de soja, que se adiciona a la composición por razones similares a las de los polímeros. Los ejemplos de minerales son el talco, el óxido de magnesio, el óxido de zinc y el óxido de titanio, que se adicionan a la composición para obtener beneficios tales como la disminución de la acumulación de líquido o las propiedades ventajosas de los pigmentos.

50

55

Los compuestos de la invención pueden formularse en cualquier tipo de composición farmacéutica conocida en la técnica que sea adecuada para el suministro de estos.

60

En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intracerebroventricular, intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, además, de manera intratumoral y/o peritumoral.

65

Tales composiciones farmacéuticas se usan convenientemente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con respecto a la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es

necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles puede realizarse fácilmente mediante el uso de técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con respecto a la sangre del destinatario; y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, frascos y ampulas selladas, y pueden almacenarse en una condición de sequedad inducida por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo que se describió previamente.

15 En una modalidad adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en la forma de un liposoma, en el que el agente se combina, además de otros vehículos aceptables farmacéuticamente, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en formas de agregados como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Los lípidos adecuados incluyen, además, los lípidos modificados anteriormente mediante el poli(etilenglicol) en el grupo de la cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. La preparación de tales formulaciones liposomales puede encontrarse, por ejemplo, en el documento US 4,235,871.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar, además, en la forma de microesferas biodegradables. Los poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos se han usado ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de tales microesferas pueden encontrarse en los documentos US 5,851,451 y EP 0 213 303.

30 En una modalidad adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles de polímeros, donde los polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de este, ácido poliacrílico, polivinil imidazol, polisulfonato, óxido de polietilenglicol/polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/polipropileno, polivinilalcohol/ polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se usan como espesantes de la solución que contiene el agente. Los polímeros pueden comprender, además, gelatina o colágeno.

35 Alternativamente, los compuestos pueden disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo) goma tragacanto, y/o diversos tampones.

40 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para potenciar la acción del agente activo. Adicionalmente, las composiciones pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como la esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, agentes de relleno, *etcétera*.

45 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por lo tanto, las posibles vías de administración incluyen la vía parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal y rectal. Además, es posible la administración a partir de implantes.

50 Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía intranasal o mediante inhalación (por ejemplo, en la forma de una presentación de aspersión en aerosol a partir de un contenedor presurizado, bombas, aspersor o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluoro-metano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante la provisión de una válvula para suministrar una cantidad fija. El contenedor presurizado, bomba, aspersor o nebulizador puede contener una solución o suspensión del polipéptido activo, *por ejemplo*, mediante el uso de una mezcla de etanol y el propulsor como solvente, que puede contener, además, un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y los cartuchos (por ejemplo, hechos de gelatina) para usar, en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis con eficacia farmacéutica. Una "cantidad con eficacia terapéutica", o "cantidad con eficacia", o "terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente, se refiere a una cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración dados. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, *es decir*, un portador o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para disminuir y, con la máxima preferencia prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función

5 y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad con eficacia terapéutica es suficiente para causar una mejoría en una afección clínicamente significativa en un huésped. Como se aprecia por los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar en dependencia de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de la composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y el uso para la fabricación de las composiciones de la invención, se proporciona una cantidad con eficacia terapéutica del componente activo. Una cantidad con eficacia terapéutica puede determinarse por el médico o trabajador veterinario experto basado en las características del paciente, tales como la edad, el peso, el sexo, la afección, las complicaciones, otras enfermedades, *etcétera*, como es bien conocido en la técnica. La administración de la dosis con eficacia farmacéutica puede realizarse tanto mediante la administración única en la forma de una unidad de dosis individual o de lo contrario mediante varias unidades de dosis más pequeñas y, además, mediante múltiples administraciones de dosis subdivididas a intervalos específicos. Alternativamente, la dosis puede proporcionarse como una infusión continua durante un período prolongado.

15 Se apreciará que las composiciones de la invención pueden formularse en forma de unidades de dosificación *es decir* en la forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria o una unidad o subunidad múltiple de una dosis unitaria.

20 Si bien la dosificación del compuesto usado variará de acuerdo con la actividad del compuesto particular y la afección que se trata, puede indicarse por medio de una guía que, una dosificación seleccionada en el intervalo de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal por día, particularmente en el intervalo de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal por día, a menudo será adecuado aunque dosis más altas que estas, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal por día (o posiblemente incluso tan alto como se describe en el documento US 4,197,249) pueden considerarse en vista del nivel más bajo de efectos secundarios tóxicos obtenidos con los compuestos. Este régimen de dosificación puede continuarse, no obstante, por muchos días si es apropiado para el paciente en cuestión, las dosificaciones diarias serán divididas en varias administraciones separadas, si se desea. Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de afecciones tales como el cáncer de mama avanzado, el linfoma no Hodgkin y el hepatoma, el tratamiento durante un día seguido de una dosis repetida después de un intervalo, tal como de 21 días, puede ser apropiado mientras que, para el tratamiento de la leucemia aguda no linfocítica, el tratamiento durante 5 días consecutivos puede ser más adecuado.

30 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención para usar en medicina (clínica y/o veterinaria).

Un quinto aspecto de la invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención para usar como una citotoxina, o un profármaco de esta, activado por hipoxia.

35 En una modalidad, el compuesto es para usar *in vivo* como una citotoxina, o un profármaco de esta, activado por hipoxia. Por "profármaco de esta activado por hipoxia" incluimos que el compuesto es preferentemente citotóxico en, o después de la exposición a condiciones hipóxicas, (*es decir*, presenta una mayor citotoxicidad en, o después de la exposición a condiciones hipóxicas). Por ejemplo, los compuestos de N-óxido de la invención, tales como los de las Fórmulas V, VI, IX y X, son relativamente no citotóxicos en condiciones normóxicas, pero se reducen fácilmente en condiciones hipóxicas para generar compuestos citotóxicos, tales como los de las Fórmulas III, IV, VII y VIII.

45 En este contexto, la "hipoxia" puede considerarse como un nivel de oxigenación del 4 % o inferior (o ≤ 23 mmHg) cuando se mide directamente mediante métodos de electrodo. Por ejemplo, el nivel de oxigenación puede ser menor que 3,0 %, 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 % o 0,5 o 0,1 %.

Se apreciará por los expertos en la técnica que la activación inducida por hipoxia de una actividad citotóxica de un compuesto puede determinarse ya sea *in vitro* o *in vivo*.

50 Por ejemplo, la citotoxicidad puede determinarse *in vitro* a varios niveles de oxigenación medidos mediante métodos de electrodo directo.

Alternativamente, el nivel de oxigenación en un tejido puede medirse indirectamente, por ejemplo, mediante el uso de secciones histológicas examinadas con un ensayo de detección de enzimas o mediante el análisis de expresión génica.

55 Para confirmar la citotoxicidad activada por hipoxia *in vivo*, los niveles de oxigenación en tejidos vivos pueden determinarse mediante el uso de los sistemas Helzel y OxyLite (por ejemplo, ver Wen y otros, 2008, Radiat. Res. 169:67-75).

60 Además, los resultados del flujo sanguíneo y de los análisis de perfusión pueden inferir la existencia de hipoxia en un tejido dado. La aplicación de agentes que modifican el flujo sanguíneo o comprometen la formación de vasos sanguíneos se esperarí además que, en los primeros principios, disminuya la oxigenación en los tejidos afectados.

En particular, la invención proporciona un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención para usar en el tratamiento del cáncer en mamíferos (más notablemente en humanos).

65

- 5 Por ejemplo, el compuesto puede usarse en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de huesos (primario y secundario, tal como osteosarcoma y sarcoma de Ewings), cáncer de cerebro (que incluye glioblastoma multiforme y astrocitoma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon y de recto, cáncer endometrial, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores gestacionales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón (de células renales), cáncer de laringe, leucemias (tales como leucemias ALL, AML, CLL, CML y leucemia de células pilosas), cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfomas (tales como linfoma de Hodkin y linfoma no Hodkin), melanoma, mesotelioma, cáncer bucal, mieloma, cánceres nasal y de los senos, cáncer nasofaríngeo, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva y cáncer de las trompas.
- 10 En una modalidad, el compuesto es para usar en el tratamiento de un tumor sólido, tal como diversas formas de sarcoma y carcinoma.
- 15 Los compuestos de la invención pueden ser de particular uso en el tratamiento de un tumor que es naturalmente hipóxico, al menos en parte (por ejemplo, que tiene un nivel de oxígeno medio por debajo de 3 %, *por ejemplo*, más bajo que 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 % o 0,5 %). Un ejemplo de tales tumores son el cáncer de páncreas y el cáncer de próstata, típicamente, ambos presentan bajos niveles de oxígeno y una propensión a la progresión maligna.
- 20 La citotoxicidad activada por hipoxia de los compuestos profármacos de la invención permite que la citotoxicidad se dirija a las células tumorales, lo que disminuye el riesgo de daño a las células sanas.
- 25 Se cree que la hipoxia puede jugar un papel en facilitar la progresión maligna de algunos cánceres (por ejemplo, ver Rudolfsson & Bergh, 2009, Exp. Opin. Ther. Tar. 13:219-225). Al ejercer un efecto citotóxico preferencialmente dentro de las regiones de hipoxia tumoral, los compuestos de la invención pueden ser capaces de atacar células cancerosas que de cualquier otra manera son resistentes al tratamiento, *por ejemplo*, mediante radioterapia o agentes quimioterapéuticos convencionales. La erradicación de tales células resistentes puede, a su vez, conducir a una disminución en las metástasis.
- 30 Por lo tanto, en una modalidad, los compuestos son para usar en el tratamiento o la prevención de metástasis (que pueden surgir de la etiología del cáncer o como una consecuencia del tratamiento).
- 35 Se apreciará por el experto en la técnica que los compuestos de la invención pueden usarse por sí solos o en combinación con otros tratamientos para el cáncer (tales como las modalidades radioterapéuticas, *por ejemplo*, radioisótopos y radiación de haz externo y agentes quimioterapéuticos; ver más abajo).
- 40 En una modalidad, los compuestos son para usar como una monoterapia (*es decir* sin ningún otro tratamiento para el cáncer). Sin embargo, se apreciará que el paciente con cáncer, además, puede recibir diferentes tipos de medicamentos beneficiosos (tal como analgésicos, sedantes, antidepresivos, antibióticos, *etcétera*).
- 45 Sin embargo, los compuestos de la invención pueden ser alternativamente para usar en combinación con uno o más tratamientos adicionales para el cáncer. Por ejemplo, los compuestos pueden usarse en combinación con uno, dos, tres, cuatro, cinco o más tratamientos adicionales para el cáncer.
- 50 Por "en combinación" incluimos que el compuesto se administra a un sujeto que recibe uno o más tratamientos adicionales para el cáncer en el mismo curso de la terapia. Por lo tanto, el término cubre no solo la administración concomitante del compuesto con uno o más tratamientos adicionales para el cáncer (ya sea como dosis de bolo o infusiones), sino, además, la administración separada temporalmente de estos tratamientos contra el cáncer. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse dentro de un esquema/ciclo de tratamiento según lo defina el oncólogo del paciente para incluir uno o más tratamientos adicionales para el cáncer, administrados ya sea antes, concomitantemente con, o después del compuesto; por ejemplo, dentro de diez semanas, nueve semanas, ocho semanas, siete semanas, seis semanas, cinco semanas, cuatro semanas, tres semanas, dos semanas, diez días, una semana, cinco días, cuatro días, tres días, dos días, un día, 12 horas, 10 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 45 minutos, 30 minutos, 20 minutos, 10 minutos o cinco minutos. Cada ciclo de tratamiento puede repetirse en diversas ocasiones, normalmente hasta 6 ciclos, pero podría ser más o menos que este número en dependencia de la naturaleza del cáncer y su respuesta al tratamiento.
- 55 Se apreciará por el experto en la técnica que el uno o más tratamientos adicionales para el cáncer pueden ser agentes quimioterapéuticos o modalidades radioterapéuticas.
- 60 En una modalidad, sin embargo, el uno o más tratamientos adicionales para el cáncer comprenden o consisten en una o más modalidades quimioterapéuticas y/o radioterapéuticas.
- 65 Dada la citotoxicidad activada por la hipoxia de los compuestos profármacos de la invención, es ventajoso administrar estos como parte de un tratamiento de combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos y/o modalidades radioterapéuticas capaces de disminuir (al menos, transitoriamente) los niveles de oxigenación tumoral *in vivo*. Por ejemplo, el uno o más agentes quimioterapéuticos y/o las modalidades radioterapéuticas pueden ser capaces de disminuir

el nivel mediano de oxígeno del tumor por debajo del 3 %, por ejemplo, debajo del 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o debajo del 0,1 %.

5 Se apreciará por los expertos que puede lograrse una disminución en los niveles de oxigenación del tumor mediante un número de diferentes medios, por ejemplo, mediante la interrupción de la vasculatura establecida del tumor, la prevención de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) y/o la vasoconstricción.

10 Los tratamientos adecuados contra el cáncer pueden seleccionarse del grupo que consiste en antiandrógenos (esteroideos y no esteroideos), agentes que interrumpen la vasculatura, agentes antiangiogénicos, agentes antiVEGFR, inhibidores de IL8, inhibidores de la NO sintasa, agentes vasoconstrictores, agentes vasodilatadores y radioterapia.

Por "antiandrógenos esteroideos" incluimos acetato de ciproterona.

Por "agentes antiangiogénicos" incluimos:

15 (a) anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de anticuerpos tales como bevacizumab, axitinib, pazopanib y ranibizumab, pegaptanib sódico, triptofanil-tRNA sintetasa, AdPEDF, EYLEA, AG-013958, JSM6427, TG100801, ATG3, rapamicina, endostatina;

(b) fármacos que bloquean la señalización dentro de la célula, tales como lapatinib, sunitinib, sorafenib, axitinib, pazopanib y AZ2171;

20 (c) tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol;

(d) tiazolidinedionas tales como rosiglitazona, pioglitazona y troglitazona

(e) erlotinib, imatinib, gefitinib, dasatinib, nilotinib, lapatinib; y

(f) fármacos que afectan las señales entre las células, tales como la talidomida y la lenalidomida.

25 Por "agentes que interrumpen la vasculatura" incluimos moléculas pequeñas (tales como taxanos, taxol, paclitaxel, combretastatinas, CA4P, Oxi4503, aurostatinas, dolostatinas, colchicina, azacolchicinol, ZD61261, colchicinas activadas por MMP, ICT2588, DMXAA, TZT1027 y AVE8062) y productos biológicos (tales como ADEPT, GDEPT y conjugados de anticuerpos y fármacos dirigidos a la vasculatura del tumor).

30 Por "inhibidores de IL8" incluimos repertaxina.

Por "inhibidores de la NO sintasa" incluimos clorhidrato de N^G-metil-L-arginina (546C88; L-NMMA), NG-nitro-L-arginina (L-NNA), éster metílico de L-nitroarginina (L-NAME), LG-nitro-L-arginina (L-NO-Arg) y 7-Nitro-Indazol (7-NI).

35 Por "agentes vasoconstrictores" incluimos agonistas de los receptores alfa 1 adrenérgicos (*por ejemplo*, metoxamina, fenilefrina, oximetazolina, tetrahidralazina, xilometazolina), agonistas de los receptores alfa 2 adrenérgicos (*por ejemplo*, clonidina, guanabenz, guanfacina, α -metildopa) y análogos de la vasopresina (*por ejemplo*, arginina vasopresina y triglicil lisina vasopresina).

40 Por "agentes vasodilatadores ('robo vascular') incluimos antagonistas alfaadrenérgicos (alfabloqueadores), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueadores del receptor de la angiotensina (ARB), agonistas de los receptores beta 2 adrenérgicos (β 2-agonistas) bloqueadores de los canales de calcio (CCB), simpaticolíticos que actúan centralmente, vasodilatadores que actúan directamente, antagonistas del receptor de endotelina, bloqueadores gangliónicos, nitrodilatadores, inhibidores de la fosfodiesterasa, abridores de los canales de potasio e inhibidores de la renina.

45 Por "modalidades de radioterapia" incluimos radioterapia convencional de haz externo (2DXRT), radiocirugía estereotáctica (SRS), radioterapia estereotáctica corporal (SBRT) y terapia de partículas tal como la terapia de protones; braquiterapia tal como SAVITM, MammoSiteTM, ConturaTM, ProxcelanTM, TheraSeedTM e I-SeedTM; terapia con radioisótopos tal como metaiodobenzilguanidina (MIBG), yodo-131, lutecio-177 unido a hormonas e itrio-90 (terapia con radionúclidos con receptores peptídicos).

50 En una modalidad preferida, el uno o más tratamientos para el cáncer es/son anti-andrógenos no esteroideos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, finasterida, dutasterida, bexlosterida, izonsterida, turosterida, epristerida y abiraterona.

55 Por lo tanto, en una modalidad, un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención se usa en combinación con bicalutamida en el tratamiento del cáncer, *por ejemplo*, la prevención o disminución de las metástasis.

60 Por lo tanto, en una modalidad, un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención se usa en combinación con agentes quimioterapéuticos contra el cáncer y/o modalidades radioterapéuticas y/o métodos para disminuir o aumentar el aire que respiran los pacientes, por ejemplo, carbógeno (con o sin nicotinamida).

65 Un sexto aspecto relacionado de la invención proporciona el uso de un compuesto del primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

Las modalidades preferidas del sexto aspecto de la invención se describen anteriormente en relación con el quinto aspecto de la invención.

5 Un séptimo aspecto de la invención proporciona un compuesto del primer aspecto de la invención para usar en el tratamiento del cáncer.

En una modalidad, el paciente con cáncer es mamífero (*por ejemplo*, humano).

10 Las modalidades preferidas del séptimo aspecto de la invención se describen anteriormente en relación con el quinto aspecto de la invención.

Un octavo aspecto de la invención proporciona el uso de un compuesto del primer aspecto de la invención como un marcador del nivel de oxigenación de las células *in vitro*.

15 En una modalidad, las células son de mamífero (*por ejemplo*, humanas).

20 La exposición de las formas de N-óxido de los compuestos de la invención (tales como las de la Fórmulas V y VI) a células hipóxicas provoca su reducción a la forma de amina correspondiente (tales como las de las Fórmulas III y IV), que pueden detectarse fácilmente por medios conocidos.

25 La presencia del compuesto reducido (tal como los de las Fórmulas III y IV) puede usarse para detectar células hipóxicas *in vitro* o *in vivo*. Las propiedades de fluorescencia innatas retenidas por el compuesto(s) reducido(s) y la persistencia intracelular del compuesto(s) reducido(s) son ventajosos para la discriminación, cuantificación y localización de las células que se expusieron o continúan expuestas a condiciones hipóxicas.

30 Por ejemplo, cuando actúa como un marcador celular para la hipoxia, el compuesto reducido (tal como los de las Fórmulas III y IV) puede detectarse mediante el uso de un método(s) que identifica la composición química o las propiedades físicas que incluyen, pero no se limitan a espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja, colorimetría, espectroscopía Raman, resonancia magnética nuclear o tomografía por emisión de positrones. Los métodos de captura por afinidad explotarían el potencial de unión de alta afinidad del compuesto reducido al ADN o a secuencias de polinucleótidos sintéticos.

35 Las propiedades ópticas del compuesto(s) reducido(s) pueden usarse para detectar compuestos en muestras biológicas e incluyen, pero no se limitan a citometría de flujo y la microscopía que utiliza las propiedades fluorescentes innatas del compuesto reducido. Los métodos secundarios de detección del compuesto reducido incluyen, pero no se limitan a una combinación de otros compuestos reporteros moleculares con el compuesto reducido que participa en reacciones de transferencia de energía resonante como un aceptor o un donante. Otros métodos secundarios de detección de compuestos reducidos incluyen, pero no se limitan a los métodos que usan métodos basados en anticuerpos para la detección molecular.

40 Los compuestos de la invención pueden usarse para identificar células tumorales hipóxicas *in vivo*, que después pueden visualizarse *in situ* o extirparse quirúrgicamente.

45 En una modalidad adicional, un compuesto del primer aspecto de la invención se usa como un marcador hipóxico celular en combinación con una forma no deuterada de un compuesto del primer aspecto de la invención.

50 En ese contexto "en combinación" incluye que los compuestos pueden aplicarse a las células (*por ejemplo*, administrarse a un paciente) ya sea concomitantemente o secuencialmente (por ejemplo, dentro de 24 horas, 12 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 30 minutos, 10 minutos o menos).

Por lo tanto, en una modalidad preferida, un compuesto de la Fórmulas IX o X se usa como un marcador hipóxico celular (*in vivo* o *in vitro*) en combinación con un compuesto como se describe en el documento US 5,132,327 (por ejemplo, AQ4N).

55 Un noveno aspecto relacionado de la invención proporciona un kit de partes para usar en la detección del nivel de oxigenación de las células que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

60 Opcionalmente, el kit comprende, además, una forma no deuterada de un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención (tal como un compuesto como se describe en el documento US 5,132,327, por ejemplo, AQ4N).

Preferentemente, el compuesto(s) se proporciona en una forma estéril, libre de pirógenos.

Se apreciará que los kits de la invención pueden comprender, además, uno o más reactivos, muestras de control y/o instrucciones.

65 Los ejemplos preferidos, no limitantes, que abarcan algunos aspectos de la invención se describirán ahora, con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Los metabolitos AQ4 y OCT1001 tienen acciones similares en la detención del ciclo celular, en condiciones normales de oxigenación, lo que indica que la deuteración selectiva no ha modificado la actividad biológica intrínseca.

Ver Ejemplo B

Figura 2: Similar citotoxicidad aumentada por hipoxia para AQ4N y OCT1002

5 Ver Ejemplo B

Figura 3: Ejemplificación de que la actividad biológica de AQ4N y OCT1002 es dependiente del grado de hipoxia

Ver Ejemplo B

Figura 4: La inhibición del crecimiento dependiente de hipoxia por AQ4N y OCT1002 surge de un mecanismo similar de detención del ciclo celular y es dependiente del grado de hipoxia

10 Ver Ejemplo B

Figura 5 (A & B): Ejemplificación de la actividad biológica compartida de AQ4N y OCT1002 en condiciones hipóxicas para células de linfoma de células B humanas que portan p53 funcional (DoHH2) y p53 mutante (SU-DHL-4)

Ver Ejemplo B

Figura 6: La acumulación intracelular del cromóforo fluorescente rojo lejano OCT1001 en hipoxia responde a la dosis de fármaco OCT1002 y al nivel de oxigenación

15 Ver Ejemplo B

Figura 7: La deuteración no afecta la capacidad intrínseca del metabolito (AQ4 o OCT1001) para acumularse dentro de una célula

Ver Ejemplo B

20 Figura 8: La acumulación del fármaco OCT1001 convertido se correlaciona con la detención del crecimiento

Ver Ejemplo B

Figura 9 (A & B): Demostración de la fluorescencia intracelular después de la exposición a OCT1002 en condiciones hipóxicas y de que la deuteración del fármaco disminuye la acumulación intracelular, pero aumenta la persistencia del metabolito.

25 Ver Ejemplo B

Figura 10: Efecto de la bicalutamida en la oxigenación de los tumores de próstata 22Rv1 crecidos como xenoinjertos

Ver Ejemplo C

Figura 11: Efecto de la bicalutamida sobre los vasos sanguíneos en xenoinjertos de tumores 22Rv1

Ver Ejemplo C

30 Figura 12: Efecto de la bicalutamida sola o de la dosis única de AQ4N o de la dosis única de OCT1002 en xenoinjertos 22Rv1 en ratones

Ver Ejemplo C

Figura 13: Efecto combinado de la dosis única de AQ4N o de la dosis única de OCT1002 en xenoinjertos 22Rv1 en ratones tratados diariamente con bicalutamida

35 Ver Ejemplo C

Figura 14: Efecto de OCT1002 en xenoinjertos LNCaP en ratones tratados con/sin bicalutamida

Ver Ejemplo C

Figura 15: El OCT1002 se reduce en las células tumorales LNCaP hipóxicas *in vivo*

Ver Ejemplo C

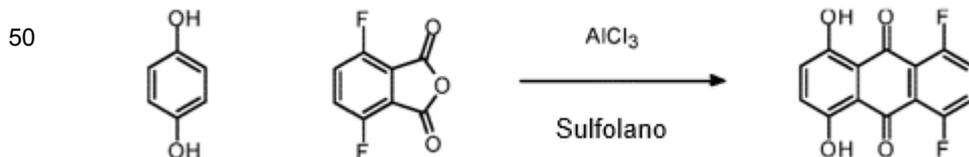
40 Figura 16: El OCT1002 disminuye la diseminación metastásica de los tumores LNCaP hacia los pulmones

Ver Ejemplo C

EJEMPLOS

45 Ejemplo A: Síntesis de alquilaminoalquilaminoantraquinonas y sus N-óxidos

(a) Preparación de 1,4-difluoro-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona



Una mezcla de 4,7-difluoroisobenzofuran-1,3-diona (8,50 g, 46,2 mmol), hidroquinona (5,64 g, 51,3 mmol), tricloruro de aluminio (36,9 g, 277 mmol) y sulfolano (10 mL) se agitó junto durante 16 horas a 165 °C. La reacción fue efectivamente una masa fundida ya que la mezcla no se convierte en un jarabe rojo viscoso hasta ~ 150 °C. Para minimizar el riesgo de una exotermia repentina y la evolución del gas HCl, la reacción se agitó en porciones, se enfrió en un baño de hielo y se agitó nuevamente hasta que el mezclado fue suficiente. Sólo entonces se calentó la mezcla.

60

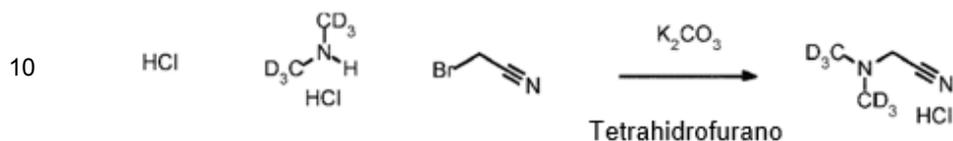
La mezcla se vertió cuidadosamente en hielo y se adicionó HCl 2M (50 mL). La mezcla se agitó, después se filtró, y se lavó la suspensión resultante con HCl 2M adicional. El sólido se volvió a suspender 3 veces más con HCl 2 M para reducir el contenido de aluminio del producto. Una suspensión final se lavó dos veces con éter; se secó en un matraz de fondo

65

redondo a 60 °C hasta que el peso constante proporcionó 1,4-difluoro-5,8-dihydroxiantraceno-9,10-diona (9,82 g, 35,6 mmol, 77 % de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) era limpio y consistente con el material deseado.

5 (b) Preparación de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino- d_6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona



Una suspensión de hidrocloreto de dimetilamina- d_6 deuterada (18,4 g, 210 mmol) y 2-bromoacetonitrilo (14,63 mL, 210 mmol) en THF anhidro (250 mL) en un matraz de fondo redondo se enfrió a -10 °C con agitación vigorosa y se trató en porciones discretas con carbonato de potasio (58,1 g, 420 mmol). Después de la adición de la base, la reacción se ajustó con un condensador de reflujo y burbujas, y se dejó calentar lentamente a 5 °C durante 2 horas. El TLC (1:1 EtOAc/Iso-Hexanos) indicó la presencia del producto. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una semana.

El residuo se diluyó con DCM (250 mL), se filtró, y se lavó con cantidades abundantes de DCM. Los licores madre se desgasificaron con N_2 durante 1 hora, después se disminuyó su volumen a la mitad en el rotavapor. Posteriormente se añadió una solución de dioxano de cloruro de hidrógeno 4 M (52,5 mL, 210 mmol), que precipitó un sólido blanco y la mezcla se dejó reposar durante 10 minutos antes de filtrarla, se lavó con DCM para proporcionar dimetilacetnitrilo- d_6 deuterado (21,73 g, 172 mmol, 82 % de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) δ : 4,47 (2H, s) fue consistente con el material deseado.

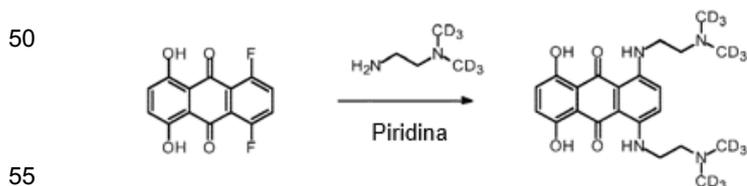
30 (c) Preparación de N,N-dimetiletilenediamina- d_6 deuterada



A una suspensión agitada de dimetilacetnitrilo- d_6 deuterada (21,72 g, 172 mmol) en Et_2O (200 mL) a 0°C se adicionó d/w una solución de éter de hidruro de litio y aluminio 1M (515 mL, 515 mmol) a través de goteo en un embudo durante 1,5 hora. Después de la adición, se eliminó el baño de enfriamiento. Después de 1,5 hora adicional, la reacción se inactivó a 15 °C (no más de 18 °C) con decahidrato de sulfato de sodio (0,5 eq. rel. a LiAlH_4 , 80 g) cuidadosamente (reacción retardada) durante 1,5 hora. La mezcla se dejó agitar durante 1 hora y posteriormente se filtró, y se lavó con éter. El filtrado se almacenó durante toda la noche en la oscuridad. El éter se eliminó en el rotavapor a ~40 °C sin vacío para proporcionar N,N-dimetiletilenediamina- d_6 deuterada (15,89 g, 160 mmol, 93 % de rendimiento, limpio y consistente con el material deseado, pero contenía ~ 0,25 eq éter).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 2,76 (2H, t), 2,33 (2H, t)

50 (d) Preparación de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino- d_6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1001")



Una solución de 1,4-difluoro-5,8-dihydroxiantraceno-9,10-diona, (4,9 g, 17,74 mmol) en piridina (35 mL) se trató con N,N-dimetiletilenediamina- d_6 deuterada, (16,57 mL, 142 mmol) como un flujo constante. La mezcla se calentó a 40 °C y se dejó agitar durante 24 horas bajo un flujo de nitrógeno. La reacción se retiró del calor y se enfrió en un baño de hielo. Se adicionó una mezcla fría de hidróxido de amonio (30 %, 30 mL) y salmuera (30 mL) y la mezcla se agitó en un baño de hielo durante 2 horas. Después de este tiempo, la mezcla se filtró, se lavó con una solución de hidróxido de amonio al 10 % (130 mL). El sólido se secó al aire durante 30 minutos, después se transfirió a un matraz tarado y se secó al vacío a 60 °C hasta un peso constante (~2 horas).

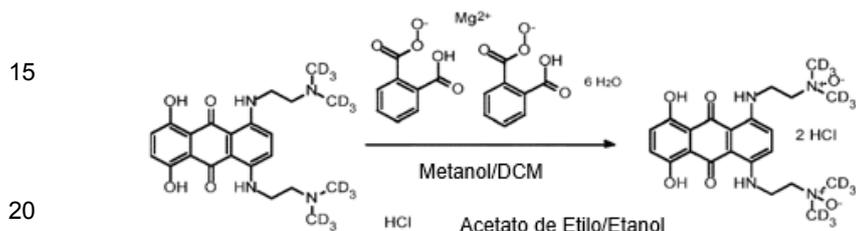
65

El material a granel se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Biotage, 120 g) se cargó en DCM (a través de un tapón de algodón) que eluyó con 6 después de MeOH 10 % (que contiene NH₃ 1 %)/DCM para proporcionar 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona (2,01 g, 4,73 mmol, 26,7 % de rendimiento).

5 El producto se analizó mediante LCMS (m/z 425,3 (M+H)⁺ (ES⁺); 423,2 (M-H)⁻ (ES⁻), a 0,90 y 1,03 min (frotis de producto en la columna), 100 %.

¹H NMR (CDCl₃) estaba limpio y consistente con el material deseado ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 13,51 (2H, s), 10,40 (2H, br t), 7,17 (2H, s), 7,11 (2H, s), 3,47 (4H, q), 2,66 (4H, t).

10 (e) Preparación de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxiantraceno-9,10-diona ("OCT1002")



Una suspensión que contiene monoperoxifitalato de magnesio, MMPP (3,10 g, 6,27 mmol) en metanol (8 mL) se adicionó en forma de gotas a una solución agitada de 281-041 (1,90 g, 4,48 mmol), AQ4 en metanol (8 mL) y DCM (30 mL) enfriado a -11 °C. Después de completar la adición, la solución de reacción se dejó calentar a 0 °C y se agitó durante toda la noche en la oscuridad (se calentó a temperatura ambiente durante este tiempo). Se adicionaron a la mezcla de reacción EtOAc (30 mL) y EtOH (6 mL) enfriados previamente a 0 °C. Esta mezcla se dejó agitar durante 30 minutos, después se adicionó una solución de cloruro de hidrógeno 4M (4,48 mL, 17,90 mmol) en dioxano en forma de gotas a aproximadamente -10 a -15 °C. La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró, se lavó con EtOH/Agua (9:1, 100 mL), MeOH/EtOAc (1:1, 100 mL) y EtOAc (60 mL) y se secó al vacío (en rotavapor) a 40 °C durante 2 horas (peso constante) para proporcionar 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido-d6 deuterado)etil]-amino]-5,8-di-hidroxiantraceno-9,10-diona (2,15 g, 3,99 mmol, 89 % de rendimiento) como un polvo azul oscuro.

El producto se analizó mediante LCMS (estándar 4min. método, agilent), m/z 458,2 (M+H)⁺ (ES⁺), a 3,07 min, 98,3 % pureza @ 254nm. ¹H NMR (400MHz, D₂O) δ: 6,73 (2H, br s), 6,43 (2H, br s), 3,76 (4H, br s), 3,58 (4H, br s).

¹H NMR (D₂O) fue consistente con el material deseado.

Ejemplo B: *Propiedades In vitro* de 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxiantraceno-9,10-diona y sus metabolitos activos

40 (a) Los metabolitos AQ4 y OCT1001 tienen similares acciones de detención del ciclo celular, en condiciones normales de oxigenación, lo que indica que la deuteración selectiva no modificó la actividad biológica intrínseca.

• Se cultivaron células de cáncer de pulmón humano A549 mediante el uso de los métodos convencionales para células adherentes y se expusieron durante 4 días a los agentes a 0, 1, 3 o 10 nM en condiciones de cultivo celular estándar de 5 % de dióxido de carbono en aire a 37 °C. Las células recolectadas se permeabilizaron y se tiñeron con el colorante para ADN bromuro de etidio fluorescente, y las distribuciones del ciclo celular se determinaron mediante citometría de flujo convencional.

• La Figura 1 (citometría de flujo) muestra aumentos similares en los picos correspondientes a G2 de las distribuciones del contenido de ADN entre 3-10 nM (que indica detención del ciclo celular) para células expuestas a metabolitos exógenos 1,4-bis-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona ("AQ4") y 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-d6 deuterado)-etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1001").

(b) *Citotoxicidad similar inducida por hipoxia para AQ4N y OCT1002*

55 • Se cultivaron células de leucemia de células T humanas (Jurkat) mediante el uso de los métodos convencionales para cultivos en suspensión en aire o en condiciones de oxígeno 1 % durante 4 días en la presencia de un intervalo de concentraciones de, ya sea AQ4N o OCT1002. El número de células relativas se determinó mediante un método convencional de conteo de partículas Coulter Counter.

60 • La Figura 2 muestra que los compuestos evaluados requieren condiciones hipóxicas para la inhibición de la proliferación celular. Por lo tanto, 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido)etil]amino]-5,8-di-hidroxiantraceno-9,10-diona ("AQ4N") y 1,4-bis-[[2-(dimetil-amino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1002") ambos presentan una actividad citostática pronunciada en condiciones de hipoxia (1 % de oxígeno).

• Como un control, se muestra que la hipoxia no modifica la acción citostática de un inhibidor que actúa directamente sobre la topoisomerasa del ADN (VP-16), que logra niveles similares de acción citostática prolongada.

(c) Ejemplificación de que la actividad biológica de AQ4N y OCT1002 es dependiente del grado de hipoxia

- 5 • Las células de cáncer de pulmón humano A549 se cultivaron mediante el uso de los métodos convencionales para células adherentes y se expusieron durante 4 días a concentraciones variables de agentes AQ4N y OCT1002 en condiciones de cultivo celular estándar de 5 % de dióxido de carbono en aire (normoxia) a 37 °C, o en condiciones de oxígeno reducido (1 % y 3 %).
- 10 • Los datos se representan como las duplicaciones relativas de la población, determinadas por el desprendimiento de células y mediante el conteo de partículas por Coulter Counter, de las densidades de células al inicio y al final del período de exposición.
- 15 • La Figura 3 muestra que para los compuestos analizados, específicamente, 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("AQ4N") y 1,4-bis-[[2-(dimetil-amino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1002"), la inhibición del crecimiento es dependiente del grado de hipoxia y de la concentración del fármaco, y los dos agentes muestran respuestas similares.

(d) Sensibilización hipóxica por AQ4N y OCT1002

- 20 • En este experimento se usaron células de cáncer de pulmón humano A549; las condiciones de cultivo fueron como se describió en (c) anteriormente.
- El análisis del ciclo celular se realizó como se describió en (a) anteriormente.
- La Figura 4 muestra que los compuestos evaluados, específicamente, 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-óxido)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("AQ4N") y 1,4-bis-[[2-(dimetil-amino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1002"), generan una detención del ciclo celular similar (determinada por citometría de flujo) dentro del intervalo de dosis del fármaco biológicamente activo.
- 25 • El grado de detención tardía del ciclo celular aumenta a medida que disminuyen los niveles de oxigenación.

(e) Ejemplificación de la actividad biológica compartida de AQ4N y OCT1002 en condiciones hipóxicas para líneas celulares de linfoma de células B humanas que portan p53 funcional y p53 mutante

- 30 • Se cultivaron células de linfoma de células B humanas mediante el uso de los métodos convencionales para cultivos en suspensión en aire, condiciones de oxigenación al 1 % o 3 % durante 4 días en la presencia de un intervalo de concentraciones de AQ4N o OCT1002. Los números de células relativas se determinaron mediante el uso de un método de conteo de partículas convencional por Coulter Counter.
- 35 • La Figura 5(A) muestra que los compuestos evaluados son igualmente y selectivamente citotóxicos en condiciones hipóxicas contra células de linfoma de células B humanas DoHH2 (que sobreexpresan bcl2; p53 wt) cultivadas en suspensión y expuestas a profármacos durante 4 días en O₂ al 21 % (círculos), al 3 % (triángulos) o al 1 % (cuadrados). Por lo tanto, 1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("AQ4N") y 1,4-bis-[[2-(dimetil-amino-N-óxido-d6 deuterado)etil]amino]-5,8-di-hidroxi-antraceno-9,10-diona ("OCT1002") ambos presentan una actividad citostática pronunciada en condiciones de hipoxia (1 % de oxígeno), donde la inhibición del crecimiento es sensible al grado de hipoxia.
- 40 • Igualmente, la Figura 5(B) muestra que los profármacos AQ4N y OCT1002 son igual y selectivamente citotóxicos en condiciones hipóxicas contra células de linfoma de células B humanas SU-DHL-4 (que sobreexpresan bcl2; mutante de p53) cultivadas en suspensión y expuestas a profármacos durante 4 días en O₂ al 21 % (círculos), al 3 % (triángulos) o al 1 % (cuadrados). Nuevamente, la inhibición del crecimiento es sensible al grado de hipoxia.

(f) Reciprocidad entre un nivel de pO₂ impuesto y el grado de generación de producto final

- 50 • OCT1002 y AQ4N muestran reciprocidad entre un nivel de pO₂ impuesto y el grado de generación de producto final en el intervalo de hipoxia biológicamente relevante con niveles bajos o indetectables de conversión bajo normoxia (y niveles indetectables de AQ4N o OCT1002 que muestran que los metabolitos son las formas primarias persistentes de antraquinona)
- 55 • En relación con AQ4N, la variante deuterada OCT1002 muestra una disminución en la capacidad general para la reducción/acumulación (análisis de HPLC) dentro de células moribundas, en condiciones de exposición prolongada que muestran una disminución del "direccionamiento redundante" en una línea celular de cáncer de pulmón humano. En este caso, el direccionamiento redundante de un profármaco se refiere a la generación excesiva de la forma citotóxica más allá de la requerida para la inactivación celular, ya que la conversión del profármaco puede continuar incluso cuando se ha producido la detención del ciclo celular. Las consecuencias de la generación excesiva aumentarán los efectos perjudiciales de la forma convertida cuando se libere de la célula diana inicial. Este efecto secundario circunstancial no deseado en el tejido cercano que no está inicialmente sujeto a condiciones hipóxicas comprenderá a células normales que no constituyen dianas y células tumorales. El daño a las células normales es claramente indeseable. La exposición subóptima de células tumorales que no constituyen dianas a través de un efecto circunstancial puede comprometer sus respuestas a otros agentes administrados en combinación o generar condiciones selectivas para el desarrollo de resistencia farmacológica.
- 60

- La Tabla 1 muestra una comparación del análisis de HPLC de la generación de metabolitos después de la exposición de células A549 humanas a AQ4N y OCT1002 en diversos grados de hipoxia y concentración (datos derivados de dos determinaciones) donde el 21 % se toma para representar las condiciones de oxigenación normal.
- Los datos muestran la disminución constante en la generación de OCT1001 en comparación con AQ4 en las células expuestas a las condiciones indicadas y que se lavaron antes del ensayo para determinar la presencia de profármacos o sus metabolitos. Los datos muestran, además, que las formas moleculares presentes en las células que experimentan hipoxia son los metabolitos y no los profármacos parentales.

Tabla 1.

Dosis del profármaco (OCT1002 o AQ4N)	Condiciones de oxigenación humidificada		pmoles del metabolito generado por 10 ⁵ células ^a				Reducción del profármaco relativa al metabolito
	nM x días	% O ₂	pO ₂ mm Hg	AQ4	OCT1001	intervalo AQ4	
30	1 %	7.1	9.25	5.64	1.46	1.20	0.61
30	3 %	21.4	0.78	0.49	0.05	0.06	0.62
30	21 %	142.2	<0,10	0.10	0.03	0.02	1.02
100	1 %	7.1	>42,95	16.17	6.59	8.16	<0,38
100	3 %	21.4	5.58	1.93	1.13	0.16	0.35
100	21 %	142.2	0.23	0.11	0.08	0.03	0.50

^a No se detectó AQ4N o OCT1002 en ninguna muestra lo que indica que, o bien todas las formas del profármaco se agotan al sufrir el metabolismo o que, mediante el método usado, tales formas no se retienen fácilmente dentro de las células.

(g) La acumulación intracelular del cromóforo fluorescente rojo lejano OCT1001 en hipoxia responde a la dosis de profármaco OCT1002 y al nivel de oxigenación

- Se cultivaron células A549 adherentes mediante métodos convencionales y se expusieron a OCT1002 0, 30 o 100 nM durante 4 días en aire, niveles de oxigenación al 1 % o al 3 %. Las células desprendidas se analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia de rojo lejano mediante el uso de la citometría de flujo convencional y la excitación de longitud de onda de 633 nm (1 x 10⁴ células analizadas).
- La Figura 6 muestra los aumentos medios de la intensidad de fluorescencia en una función lineal de la dosis del profármaco y es dependiente de los niveles de oxigenación. Esto proporciona un método fluorométrico convencional, analítico, para células individuales vivas para analizar la población celular que experimenta los niveles prevalecientes de pO₂.

(h) La deuteración no afecta la capacidad intrínseca del metabolito activo (OCT1001) para acumularse

- Se usaron células de cáncer de pulmón humano A549 en este experimento, como se describió en (g) anteriormente.
- En condiciones de normoxia, se observaron niveles similares de acumulación de OCT1001 y AQ4 dentro de las células (ver Figura 7). Por lo tanto, los histogramas superpuestos para la distribución poblacional de fluorescencia en las células expuestas a AQ4 u OCT1001 en normoxia muestran un potencial de acumulación celular similar.

(i) La acumulación de profármacos OCT1001 convertidos se correlaciona con la detención del crecimiento (cada vez más células moribundas)

- En este experimento se usaron células de cáncer de pulmón humano A549, como se describió en (g) anteriormente, con la excepción de que se recolectó la dispersión lateral de la luz (488 nm de longitud de onda) versus la intensidad de fluorescencia (> 695 nm de longitud de onda).
- La Figura 8 muestra los datos de citometría de flujo recolectados para células A549 expuestas a OCT1002 0, 30 y 100 nM al 21 %, al 3 % y al 1 % de oxígeno durante 4 días.
- El trazado de todos los puntos de los datos revela que el aumento del parámetro de dispersión lateral de la luz (que refleja la expansión del tamaño y la complejidad de la célula asociada con la detención del crecimiento) se correlaciona con el aumento de la intensidad de fluorescencia (que indica la acumulación conjunta de OCT1001).

(j) Demostración de la fluorescencia intracelular después de la exposición a OCT1002 en condiciones hipóxicas y de que la deuteración del profármaco disminuye la acumulación intracelular, pero aumenta la persistencia del metabolito.

• Las células A549 se cultivaron mediante el uso de métodos convencionales, se les permitió unirse al sustrato de vidrio en portaobjetos de cámara y se expusieron a OCT1002 bajo hipoxia. Imagen de fluorescencia de células vivas que usa microscopía de fluorescencia confocal convencional mediante el uso de excitación con láser de línea roja.

• La Figura 9a muestra que la fluorescencia roja lejana detectada en las células es intracelular (fluorescencia de fondo no detectable en cultivos de control) con evidencia de regiones de acumulación citoplásmica. Los datos ejemplifican las propiedades de detección de hipoxia de una sola célula del profármaco deuterado, a nivel de una sola célula.

• Dada la confirmación de fluorescencia intracelular asociada con la conversión de OCT1002 a OCT1001 en hipoxia, se usaron células A549 de cáncer de pulmón humano para evaluar, adicionalmente, la acumulación diferencial o la retención de los metabolitos mediante el uso de citometría de flujo como se describió en (g) anteriormente. Después de la exposición a AQ4N o OCT1002 en 1 % de oxígeno, las células se desprendieron para el análisis, o se lavaron e incubaron durante 24 horas en medio sin fármaco y se mantuvieron en condiciones normales de oxigenación antes del desprendimiento y el análisis mediante citometría de flujo

• Los datos de citometría de flujo en la Figura 9b muestran la acumulación celular disminuida (después de 4 días de exposición) pero, además, disminuye la pérdida de la fluorescencia intracelular (después de 24 horas posteriores a la recuperación de la exposición) atribuible al metabolito OCT1001, comparado con la fluorescencia atribuible al metabolito AQ4, después de la exposición de las células A549 a los profármacos OCT1001 y AQ4 en A549 en hipoxia. Por lo tanto, la deuteración cambia la carga/retención en los compartimentos intracelulares *in situ* de las formas convertidas por hipoxia de OCT1002.

Conclusiones

Los estudios anteriores demuestran las propiedades *in vitro* de un compuesto deuterado ilustrativo de la invención (el profármaco N-óxido, OCT1002 y su metabolito activo, OCT1001).

(a) Evidencia de actividad biológica primaria después de la reducción del profármaco en la hipoxia que produce como respuesta la detención del crecimiento en diferentes tipos de células tumorales;

(b) Para una toxicidad igualmente efectiva para el fármaco reducido (OCT1001), la toxicidad de OCT1002 para las células en normoxia es significativamente menor.

(c) Reciprocidad entre el nivel de pO₂ y la generación del producto final en el intervalo de hipoxia biológicamente relevante;

(d) La capacidad de la fluorescencia celular para informar la generación *in situ* de un metabolito que proporciona la detección y el reporte de ambientes hipóxicos;

(e) Una firma molecular/atómica distinta proporcionada por la deuteración sitio específica que puede usarse para rastrear la conversión de profármacos y el metabolismo mediante métodos físico-químicos; y

(f) La deuteración del profármaco resulta en la acumulación disminuida de la forma reducida en hipoxia, pero aumenta la persistencia/retención de la forma reducida al eliminar el fármaco externo y la reoxigenación. Esta propiedad demostrada en células moribundas confirma tanto la disminución del direccionamiento redundante de la forma deuterada como la persistencia conveniente de la señal para aplicaciones de detección de hipoxia.

Ejemplo C - Efecto de OCT1002 sobre el crecimiento del tumor y metástasis *in vivo*

Dada la citotoxicidad activada por la hipoxia de los compuestos profármacos de la invención, puede ser ventajoso administrarlos como parte de un tratamiento combinado con uno o más agentes quimioterapéuticos y/o modalidades radioterapéuticas capaces de disminuir (al menos, transitoriamente) los niveles de oxigenación del tumor *in vivo*. La bicalutamida (comercializada como Casodex, Cosudex, Calutide, Kalumid) es un antiandrógeno no esteroideo oral usado en el tratamiento del cáncer de próstata, que se incluye como monoterapia para el tratamiento de etapas tempranas de la enfermedad. 22Rv1 es una línea celular epitelial de carcinoma de próstata humana (Sramkoski RM, Pretlow TG 2nd, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1.. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999 Jul-Aug;35(7):403-9). La línea celular expresa antígeno prostático específico (PSA). El crecimiento es débilmente estimulado por la dihidrotestosterona y los lisados son inmunoreactivos con el anticuerpo del receptor de andrógenos mediante análisis de transferencia Western.

(i) Efecto de la bicalutamida sobre la oxigenación de los tumores de próstata 22Rv1 crecidos como xenoinjertos

• Ratones machos SCID (>8 semanas) que portan tumores de próstata 22Rv1 de 100-150mm³ se trataron diariamente durante 28 días mediante sonda oral, ya sea con el vehículo (DMSO 0,1 % en aceite de maíz) o bicalutamida (2mg/kg/día en vehículo).

• Antes del comienzo del tratamiento (día 0), se midió la pO₂ (mmHg) mediante el uso de una sonda de electrodo de oxígeno Oxylite; esto se repitió en los días indicados.

La Tabla 3 muestra los valores medios de pO₂ ± SD. Además, se muestran comparaciones estadísticas del grupo de bicalutamida en comparación con el control y los valores del día 0; ns = no significativo.

Tratamiento	Día de Tratamiento	Media de pQ± SD (mmHg)	Significación (respecto al vehículo)	Significación (respecto al día 0)
Vehículo solamente	0	15,277± 11,254		
	7	14,741± 4,290		
	14	3,165± 3,275		
	21	2,660± 1,889		
	28	3,546± 1,563		
Bicalutamida (2mg/kg/día)	0	15,277± 11,254	3	
	7	1,996± 1,989	<0,05	<0,05
	14	0,486± 0,107	ns	<0,05
	21	1,291± 0,291	ns	<0,05
	28	11,905± 0,861	<0,01	ns

- Las células 22Rv1 crecen como un tumor sólido en el dorso de ratones SCID.
- La oxigenación del tumor se midió durante 28 días en ratones tratados con vehículo y bicalutamida (2 mg/kg/día) (ver la Tabla 3 anterior).
- La bicalutamida causó una caída en la oxigenación del tumor (como se muestra en la Figura 10); desde ~15,3 mmHg (2 % de oxígeno) hasta 2,0 mmHg (0,3 % de oxígeno) en el día 7 y hasta 0,5 mmHg (0,1 % de oxígeno) en el día 14. Esta caída persiste durante aproximadamente 2 semanas antes de recuperarse a casi normal en algún punto más allá de los días 21 y 28 (en cuyo momento no es diferente significativamente del nivel de inicio de la oxigenación).
- Los controles tratados con vehículo, que crecen más rápido, no mostraron una caída significativa en los niveles de oxígeno hasta el día 7. Sin embargo, durante la semana subsiguiente (probablemente relacionado con el tamaño del tumor), los niveles medios de oxígeno cayeron a aproximadamente 3 mmHg (0,4 % de oxígeno) e indican recuperación.

Conclusión

En el modelo de tumor sólido 22Rv1 existe hipoxia. La adición de bicalutamida altera los patrones de niveles de oxígeno indicados por el tumor. La hipoxia es claramente relevante para el modelo 22Rv1 y la respuesta de tal modelo a la monoterapia (± bicalutamida); y el papel potencial de OCT1002 en un tratamiento combinado.

(ii) Efecto de la bicalutamida en los vasos sanguíneos en xenoinjertos de tumores 22Rv1

- Se aseguraron los pliegues dorsales de la piel {ut} mediante el uso de cámaras de ventana en el dorso de ratones SCID machos (>8 semanas). Se implantaron los fragmentos de tumor 22Rv1 y se dejaron vascularizar durante 7 días antes de comenzar el tratamiento.
- Los animales se trataron diariamente ya sea con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) o bicalutamida (2 mg /kg en vehículo) mediante sonda oral.
- Los ratones anestesiados se inyectaron i.v. con dextrano marcado con FITC inmediatamente antes de obtener imágenes con un microscopio confocal.
- Cada imagen es representativa de un mínimo de 5 animales por grupo de tratamiento.
- Los tumores 22Rv1 se cultivaron en cámaras de ventana/colgajos dorsales de la piel en el dorso de ratones SCID. Se tomaron imágenes de los fragmentos tumorales (ver Figura 11) antes de comenzar el tratamiento (**A**) con vehículo y (**E**) grupos de tratamiento previo con bicalutamida y después de 7, 14 y 21 días de tratamiento, (**B-D**) vehículo solamente (**F-H**) bicalutamida (aumentos 10 x).
- En 7 días, los fragmentos tumorales mostraron el desarrollo de pequeños vasos extensivos indicados como el día 0 del período experimental (ver Figura 11).
- En tumores tratados con vehículo la densidad de los vasos mostró un ligero cambio por el día 14 y por el día 21 el número de vasos pequeños disminuyó.
- En los tumores tratados con bicalutamida, se observó la pérdida de pequeños vasos en los días 7 y 14, con cierta recuperación el día 21. Esto es consistente con los datos del electrodo de oxígeno, es decir, la caída y después la recuperación de la oxigenación.

Conclusiones

- El vehículo no tiene efecto en los vasos sanguíneos durante al menos 7 días. Por el día 14 hay una ligera pérdida de vasos que se observa claramente por el día 21. Esta pérdida de los vasos, aunque no es tan dramática como se

observa en los tumores tratados con bicalutamida (en los días 7 y 14; Ming y otros., 2007), puede deberse al colapso vascular y la necrosis observada en este momento, en este tumor de crecimiento rápido tratado con vehículo. Los niveles de oxígeno caen un poco antes, es decir en algún momento entre los días 7 y 14 (ver la Figura 10).

- En los tumores 22Rv1 tratados con bicalutamida hay una pérdida marcada temprana de la vasculatura del tumor (por el día 7). Los datos proporcionan evidencia de que la bicalutamida causa una caída profunda en la oxigenación del tumor a través de un efecto antivascular; esto puede ser directo o, alternativamente, podría deberse a la inhibición de la producción de factores proangiogénicos por las células tumorales.

- Por el día 21, los vasos pequeños han regresado, lo que es consistente con el aumento del nivel de oxigenación observado en la Figura 10.

(iii) Efecto de la bicalutamida solamente, o de la dosis única de AQ4N, o de la dosis única de OCT1002 en xenoinjertos 22Rv1 en ratones.

- Los ratones SCID machos (>8 semanas) que portan tumores de xenoinjerto 22Rv1 de 100-150 mm³ se trataron durante 28 días. El tratamiento incluyó Vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) o bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo), ambos administrados diariamente por sonda oral. Alternativamente, en el día 7 del período experimental, AQ4N u OCT1002 (50 mg/kg en PBS estéril) se administraron por vía intraperitoneal como una dosis única.

- Los volúmenes tumorales se midieron en días alternos mediante el uso de calibradores.

- Se realizó un análisis de los datos para determinar el efecto de los tratamientos en el volumen tumoral dependiente del tiempo. El volumen tumoral se normalizó hasta el día 6 (es decir, previo a la adición del profármaco). Se realizaron series de tiempo y análisis de regresión.

- El crecimiento del tumor se normalizó el día 6, de manera que el crecimiento global del tumor, y los patrones pueden compararse en la Figura 12 (A y B).

- A pesar de la falta de sensibilidad a la bicalutamida *in vitro*, los tumores 22Rv1 muestran un pequeño, pero significativo enlentecimiento del crecimiento. La comparación clásica en sección transversal del retraso del crecimiento mostró que los ratones tratados con vehículo requirieron $14,0 \pm 0,3$ días para alcanzar cuatro veces el volumen al inicio del tratamiento. El tratamiento con bicalutamida (2 mg/kg/día) aumentó esto a $18,5 \pm 0,8$ días; por lo tanto, esto fue un retraso del crecimiento de 4,5 días.

- Los ajustes de regresión gráfica indican que los tumores 22RV1 tratados solamente con bicalutamida muestran un retraso en el crecimiento (durante los días 10-20), a pesar de la exposición diaria continua a bicalutamida; los tumores exhiben un patrón de crecimiento exponencial general ($R^2 = 0,9915$) hasta el día 24.

- La adición del AQ4N administrado como una dosis única (50 mg/kg) en el día 7, se observó un patrón de crecimiento diferente en comparación con el tratamiento con bicalutamida solamente, el ajuste de regresión mostró un patrón de crecimiento polinómico no lineal ($R^2 = 0,9948$).

- La adición del OCT1002 administrado como una dosis única (50 mg/kg) en el día 7; los tumores tratados con esta dosis única fueron capaces de mantener un patrón de velocidad de crecimiento polinómico (x^2) este fue, además, un patrón no lineal ($R^2 = 0,9978$).

- Los tumores tratados con OCT1002 mostraron una velocidad de crecimiento global disminuida durante el período restante del experimento (más allá del día 22) en comparación con los tumores tratados solamente con bicalutamida y solamente con AQ4N. El crecimiento acumulativo durante todo el período (área progresiva bajo la curva) indica esta diferencia (Figura 12B).

(iv) Efecto combinado de la dosis única de AQ4N o de la dosis única de OCT1002 en xenoinjertos 22Rv1 en ratones tratados diariamente con bicalutamida

- Durante 28 días se trataron ratones SCID machos (>8 semanas) que portan tumores de xenoinjerto 22Rv1 de 100-150mm³. Los tratamientos con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) y bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo) se administraron diariamente a través de sonda oral.

- Se administró por vía intraperitoneal AQ4N u OCT1002 (50 mg/kg en PBS estéril) como una dosis única en el día 7.

- Los volúmenes tumorales se midieron en días alternos mediante el uso de calibradores.

- Los animales se seleccionaron una vez que la expansión del tumor alcanzó $\geq 800\text{mm}^3$.

- El crecimiento del tumor se normalizó al día 6, de manera que el crecimiento global del tumor, y los patrones pueden compararse (Figura 13 (A y B)).

- El tratamiento con bicalutamida solamente (2 mg/kg/día) se discutió anteriormente; exhibe un patrón de crecimiento exponencial general ($R^2 = 0,9915$) hasta el día 24.

- El tratamiento con bicalutamida se combinó con una dosis única de AQ4N (50 mg/kg) administrada el día 7, se observó un patrón de crecimiento modificado en comparación con el tratamiento con bicalutamida solamente, el ajuste de regresión mostró un patrón de crecimiento polinómico no lineal ($R^2 = 0,9982$), con divergencia de crecimiento para bicalutamida sola aparente más allá del día 20.

- El tratamiento con bicalutamida se combinó con una dosis única de OCT1002 (50 mg/kg) administrada el día 7; se observó un patrón de crecimiento modificado diferente, el ajuste de regresión mostró una respuesta de crecimiento tumoral lineal ($R^2 = 0,9955$), con divergencia de crecimiento para bicalutamida solamente aparente más allá del día 14.

Conclusiones

- El tratamiento combinado indica dos características críticas.
- 5 (i) la primera es una inhibición del crecimiento tumoral efectiva más temprana de OCT1002 en los tumores tratados con bicalutamida en comparación con AQ4N;
- (ii) la segunda indica una inhibición sostenida del crecimiento tumoral (indicada por una respuesta lineal mantenida); que refleja una persistencia de OCT1002 y la inhibición del crecimiento tumoral.
- Por lo tanto, con OCT1002 administrado en el momento en que se alcanzaron los niveles de hipoxia/oxígeno bajo; se obtuvo un efecto temprano y sostenido. La combinación de OCT1002 con bicalutamida fue más efectiva para inhibir el crecimiento tumoral en comparación con AQ4N con bicalutamida.
- 10 (v) Efecto de OCT1002 sobre xenoinjertos LNCaP en ratones tratados con/sin bicalutamida
- 15 • Durante 28 días se trataron ratones SCID (>8 semanas) que portan tumores de xenoinjerto LNCaP de 100-150mm³.
- Los tratamientos con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) y bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo) se administraron diariamente a través de sonda oral. En el día 7 se administró OCT1002 (50 mg/kg en PBS estéril) por vía intraperitoneal como una dosis única.
- 20 • Los volúmenes tumorales se midieron en días alternos mediante el uso de calibradores.
- Las curvas de crecimiento son la media de ≥5 animales en los grupos de tratamiento con bicalutamida y vehículo; grupo bicalutamida + OCT1002 (n=5 hasta el día 14; después n=3) y vehículo + OCT1002 (n=5 hasta el día 13; n=1) ± s.e.
- La Tabla 6 más abajo muestra los retrasos en el crecimiento calculados para el tiempo en alcanzar el doble del tamaño del tratamiento.
- 25 • La bicalutamida causó un retraso de 5,1 días en el crecimiento del tumor LNCaP en comparación con el vehículo.
- Cuando se administró OCT1002 (dosis única de 50 mg/kg en el día 7) en combinación con el vehículo (administración diaria) no hubo un efecto apreciable sobre el crecimiento del tumor (Tabla 6 más abajo).
- La bicalutamida (diariamente durante 28 días) inicialmente retrasa el crecimiento del tumor hasta el día 12-14. Después, el crecimiento del tumor se recupera y los tumores son del mismo tamaño que los tumores tratados con el vehículo en el día 28 (Tabla 6 más abajo).
- 30 • Los tumores tratados con una dosis única de OCT1002 disminuyeron la tasa de crecimiento en combinación con bicalutamida y esto fue significativamente diferente del control en todos los tiempos entre el día 14 y el día 28 al final del experimento (Figura 15).

Conclusiones

- La administración de OCT1002 en el día 7 no tuvo un efecto significativo en el crecimiento del tumor LNCaP. Esto muestra que los tumores mejor oxigenados (es decir, en comparación con los tumores tratados con bicalutamida) tienen una baja toxicidad de OCT1002 y que esta fracción de células mejor oxigenadas es predominante para contribuir al crecimiento en los tumores de control tratados con vehículo.
- La combinación de una dosis única de OCT1002 con bicalutamida bloqueó el aumento en la tasa de crecimiento observado en el grupo tratado con bicalutamida. El OCT1002 es muy eficaz para bloquear el crecimiento del tumor desde los 12 días y en adelante, donde, con bicalutamida solamente, hay un retraso y después una recuperación.
- 45 • El enlentecimiento inicial y después la recuperación después del día 14 del crecimiento del tumor LNCaP, durante el tratamiento diario con bicalutamida, es consistente con la caída y luego la recuperación de la oxigenación del tumor y los vasos sanguíneos (Ming y otros., 2012, *más arriba*).

Tabla 6

Tratamiento	Tiempo para 2x el volumen inicial (días)	Retardo en el crecimiento (días)
Vehículo solamente	11,2 ± 1,88	
Bicalutamida	16,2 ± 1,94	5±3,82
OCT1002 solamente	13 ±0,89	1,8 ±2,77
OCT1002 + Bicalutamida	25,5±3,22	14,3±5,1

(vi) El profármaco OCT1002 se convierte en metabolitos en células tumorales LNCaP hipóxicas in vivo

Métodos

- Se unió un colgajo dorsal de piel (cámara de ventana) al dorso de ratones SCID machos y se insertó un fragmento de tumor LNCaP-Luc de 1mm³; esto se dejó vascularizar durante 7 días.
- 5 • Después los ratones se trataron por vía oral durante 21 días ya sea con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) o bicalutamida (2 mg/kg/día).
- Siete días después de la inducción de (a) vehículo o (b) bicalutamida, los ratones se dosificaron por vía intraperitoneal con OCT1002 (50 mg/kg).
- 10 • Dos horas después de la inyección de OCT1002 los ratones se inyectaron por vía intravenosa con FITC-dextrano.
- Se capturaron imágenes mediante el uso de un microscopio confocal de exploración con láser para mostrar los vasos sanguíneos (verde) y los patrones OCT1001 (azul) en el tumor. (Aumentos 10x con foco digital 3x) (resolución de píxeles).
- Las imágenes se adquirieron, además, en los días 0 (es decir, 7 días después de la implantación del fragmento de tumor), 14 y 21.
- 15 • Solamente se administró FITC-dextrano los días 0, 14 y 21. (c) Panel completo de imágenes a los 0, 7, 14 y 21 días.
- Los ratones control se trataron por vía oral durante 21 días con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz): la vascularización se mantuvo durante todo el proceso. A los 7 días, el fragmento del tumor estaba vascularizado (el día 0 del experimento se muestra en la Figura 15C, verde).
- 20 • En los ratones tratados con vehículo + OCT1002 en el día 7: el compuesto convertido OCT1001 (azul) se encuentra en unas pocas áreas donde la vascularización es deficiente (Figura 15A).
- En los ratones tratados con bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo): la vascularización estaba disminuida a los 7 días. En el día 7, dos horas después de la inyección intraperitoneal de una dosis única de OCT1002 (50 mg/kg), pueden verse grandes cantidades del compuesto convertido (OCT1001; azul) en todo el fragmento tumoral (Figura 15B).
- 25 • En los ratones tratados con bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo): la vascularización estaba disminuida en los días 7 y 14, esta se recuperó por el día 21 (Ming y otros., 2012, *más arriba*).
- Los tumores se reexaminaron nuevamente en los días 14 y 21.
- En el día 14 el OCT1001 (azul) aún se localizaba en el tumor; en el día 21 la cantidad de compuesto fue considerablemente menor (Figura 15C).

30

Conclusiones

- El OCT1002, administrado por vía intraperitoneal, se distribuye ampliamente en todos los fragmentos tumorales localizados en el pliegue de la piel del dorso de los ratones.
- 35 • La distribución fue extensiva incluso cuando la vasculatura disminuyó significativamente (*es decir* por el tratamiento con bicalutamida en los días 7 y 14).
- El OCT1001 se encontró predominantemente donde los niveles de oxígeno eran bajos (*es decir*, en las áreas de vascularización deficiente); además, se observaron áreas pequeñas en el control (lo que indica que la hipoxia puede ocurrir en tumores no tratados, pero en menor medida).
- 40 • La localización extensiva del OCT1001 aún se observó en el día 14 del tratamiento con bicalutamida, lo que demuestra que el compuesto permanece por al menos 7 días.
- Por el día 21, los vasos sanguíneos del tumor muestran alguna recuperación y los niveles de OCT1001 son más bajos, aunque aún están por encima del fondo.
- 45 • La persistencia del producto reducido, OCT1001, durante > 7 días muestra que la vida media del compuesto convertido es larga.
- Sin embargo, esta puede ser menor que AQ4 ya que en el día 21 la señal de OCT1001 está mucho más disminuida.
- Esto puede deberse a las diferentes propiedades de unión celular de OCT1001 en comparación con AQ4 y potencialmente proporcionará un fundamento para una menor toxicidad sistémica acumulativa que podría causarse por la persistencia de una pequeña cantidad del compuesto reducido en tejidos periféricos marginalmente hipóxicos. Esto no debería afectar la eficacia primaria de OCT1002/OCT1001 en el sitio predominante del metabolismo (*es decir* las células hipóxicas en los tumores) ya que se observan grandes cantidades en todo el fragmento hipóxico del tumor que persiste durante más de 7 días.
- 50
- 55 (vii) El OCT1002 disminuye la diseminación metastásica de los tumores LNCaP a los pulmones

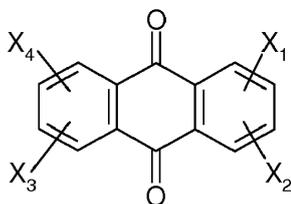
Métodos

- Durante 28 días se trataron ratones SCID machos (>8 semanas) con tumores de xenoinjerto LNCaP-luc de 100-150mm³ (las células que expresan luciferasa tenían características similares a las células LNCaP parentales; Ming y otros., 2012, *más arriba*).
- 60

- Los tratamientos con vehículo (DMSO al 0,1 % en aceite de maíz) y bicalutamida (2 mg/kg/día en vehículo) se administraron diariamente a través de sonda oral.
 - En el día 7 se administró OCT1002 (50 mg/kg en PBS estéril) por vía intraperitoneal como una dosis única.
 - El día 28 de tratamiento, los animales se inyectaron i.p. con una solución de D-luciferina (150 mg/kg en PBS) 15 minutos antes de la obtención de las imágenes.
 - Después los animales se sacrificaron y se extrajo una gama de tejidos para la detección de bioluminiscencia mediante el uso del sistema de imágenes IVIS (Xenogen, EE.UU.).
 - Las imágenes se tomaron durante 5 minutos y se logró la cuantificación de la bioluminiscencia mediante el dibujo de una región de interés alrededor del área y a través de la medición del flujo total en fotones/segundo (f/s).
 - Se extirparon una gama de tejidos, sin embargo, solo los pulmones y el tumor mostraron una bioluminiscencia medible. La media \pm s.e de la bioluminiscencia en los pulmones se muestra en la Figura 16; grupos de tratamiento con bicalutamida y vehículo (n=10); grupo bicalutamida + OCT1002 (n=3) y vehículo + OCT1002 (n=1). * Bicalutamida vs bicalutamida + OCT1002 ($p = 0,024$). Los ratones tratados con vehículo mostraron alguna diseminación metastásica al pulmón. El OCT1002, a dosis única en el día 7, no tuvo efecto en esta diseminación.
 - La bicalutamida pareció aumentar la extensión de la diseminación metastásica, aunque el resultado no alcanzó significación.
 - La combinación de OCT1002 con bicalutamida mostró que el OCT1002 disminuye significativamente la diseminación metastásica a los pulmones causada por bicalutamida. ($P= 0,024$)
- 20 Conclusiones
- El OCT1002 administrado como una dosis única en el día 7 fue capaz de disminuir significativamente la diseminación metastásica a los pulmones causada por el tratamiento con bicalutamida.

Reivindicaciones

1. Un compuesto de la Fórmula I



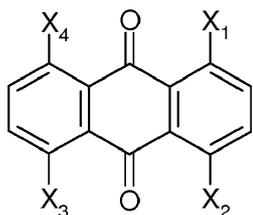
en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son cada uno independientemente seleccionados a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halógeno, amino, alcoxilo de C_{1-4} , alcanoiloxilo de C_{2-8} , $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$ y $-NH-A-N(O)R'R''$

en donde A es un grupo alquileo con una longitud de la cadena de al menos dos átomos de carbono (entre NH y NHR o $N(O)R'R''$),

en donde R, R' y R'' son cada una independientemente seleccionadas a partir de los grupos alquilo de C_{1-4} e hidroxialquilo de C_{2-4} y grupos dihidroxialquilo de C_{2-4} en los cuales el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y ningún átomo de carbono está sustituido por dos grupos hidroxilo, o en donde R' y R'' juntas son un grupo alquileo de C_{2-6} que, con el átomo de nitrógeno al que están unidas R' y R'' forman un grupo heterocíclico que tiene 3 a 7 átomos en el anillo,

en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 se seleccionan a partir del grupo que consiste en formas deuteradas de $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$ y $-NH-A-N(O)R'R''$

2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de la Fórmula II:



3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 cada una se selecciona individualmente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, $-NH-A-NHR$, $-NH-A-NR'R''$, $-NH-A-N(O)R'R''$ y las formas deuteradas de estos.

4. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde X_1 y X_2 ambas son hidroxilo y X_3 y X_4 ambas son $-NH-A-N(O)R'R''$ o $-NH-A-NR'R''$ o las formas deuteradas de estos.

5. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde A es etileno.

6. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde R, R' y R'' son cada uno independientemente seleccionadas a partir del grupo que consiste en $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2OH$, $-CH(CH_3)CH_2OH$, $-CH_2CHOHCH_2OH$ y las formas deuteradas de estos.

7. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde uno o dos de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son independientemente seleccionadas a partir del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_2-N(O)(CH_3)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)(CH_3)C_2H_5$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)(C_2H_5)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)(CH_2CH_2OH)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)(CH_2CH_2CH_2OH)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)CH(CH_3)OH$, $-NH-(CH_2)_2-N(O)(CH_2CHOHCH_2OH)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_3)C_2H_5$, $-NH-(CH_2)_2-N(C_2H_5)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_2CH_2OH)_2$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$, $-NH-(CH_2)_2-NCH(CH_3)OH$, $-NH-(CH_2)_2-N(CH_2CHOHCH_2OH)_2$ y las formas deuteradas de estos.

8. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- (a) $X_1 = -NH-A-N(O)R'R''$, $X_2 = -H$ y $X_3 = X_4 = -OH$;
 (b) $X_1 = -NH-A-N(O)R'R''$, $X_2 = -OH$, $X_3 = -OH$ y $X_4 = -H$;
 (c) $X_1 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_2 = X_3 = X_4 = -OH$;
 (d) $X_1 = X_4 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_2 = X_3 = -OH$;
 (e) $X_1 = X_2 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_3 = X_4 = -OH$;
 (f) $X_1 = X_3 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_2 = X_4 = -OH$;

- (g) $X_1 = -NH-A-NR'R''$, $X_2 = -H$ y $X_3 = X_4 = -OH$;
 (h) $X_1 = -NH-A-NR'R''$, $X_2 = -OH$ en la posición 4, $X_3 = -OH$ y $X_4 = -H$;
 (i) $X_1 = -NH-A-NR'R''$ y $X_2 = X_3 = X_4 = -OH$;
 (j) $X_1 = X_4 = -NH-A-NR'R''$ y $X_2 = X_3 = -OH$;
 (k) $X_1 = X_2 = -NH-A-NR'R''$ y $X_3 = X_4 = -OH$;
 (l) $X_1 = X_3 = -NH-A-NR'R''$ y $X_2 = X_4 = -OH$;
 y las formas deuteradas de estos.

5

10

9. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado a partir del grupo que consiste en:

(a) $X_1 = X_2 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_3 = X_4 = -OH$;

(b) $X_1 = X_3 = -NH-A-N(O)R'R''$ y $X_2 = X_4 = -OH$;

(c) $X_1 = X_2 = -NH-A-NR'R''$ y $X_3 = X_4 = -OH$; y

(d) $X_1 = X_3 = -NH-A-NR'R''$ y $X_2 = X_4 = -OH$

15

en donde

ambos $-NH-A-N(O)R'R''$ son $-NH-(CH_2)_2N(O)(CH_3)_2$ o $-NH-(CH_2)_2N(O)(CH_2CH_2OH)_2$, o las formas deuteradas de estos y

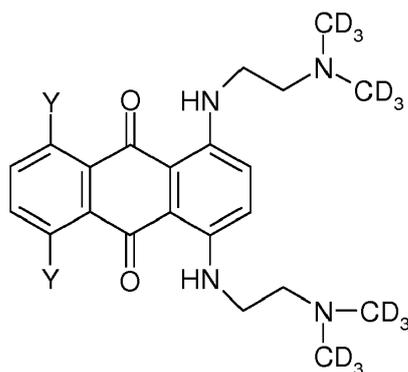
ambos $NH-A-NR'R''$ son $-NH-(CH_2)_2N(CH_3)_2$ o $-NH-(CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)_2$, o las formas deuteradas de estos.

20

10. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde el compuesto es de la Fórmula III, IV, V, VI, VII, VIII, XI o X:

Fórmula III

25



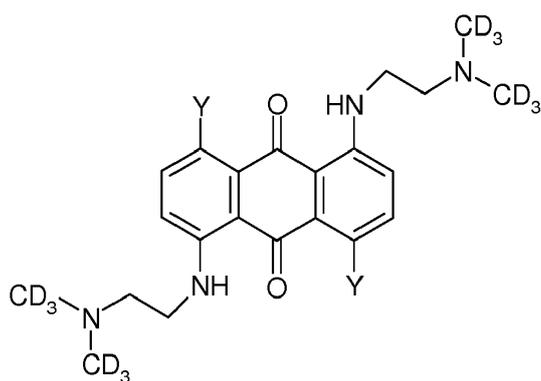
30

35

40

Fórmula IV

45



50

55

60

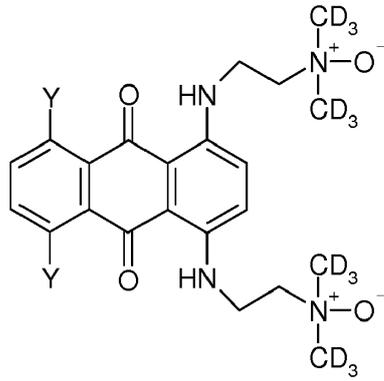
65

Fórmula V

5

10

15

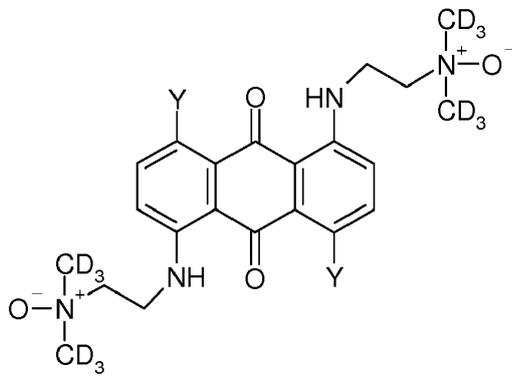


Fórmula VI

20

25

30

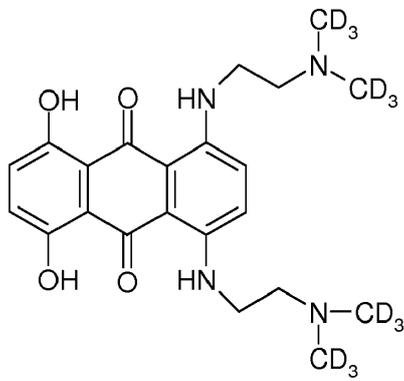


Fórmula VII

35

40

45



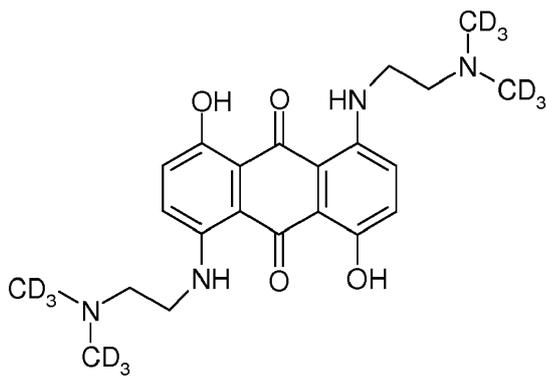
Fórmula VIII

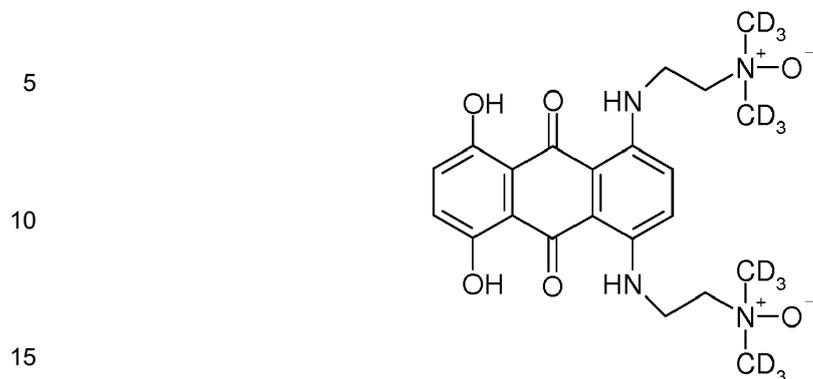
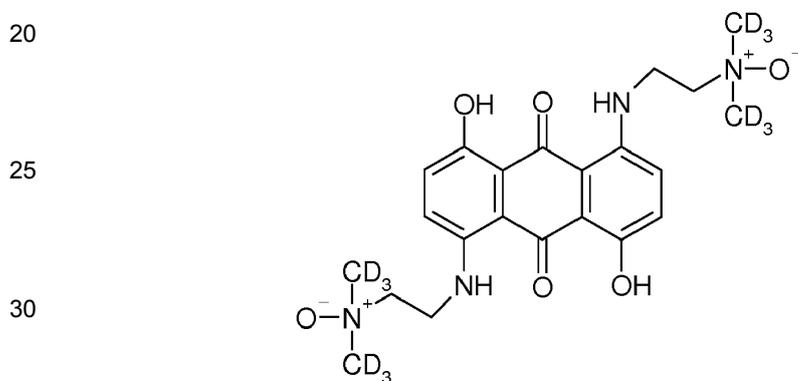
50

55

60

65



Fórmula IX**Fórmula X**

35 en donde Y son cada una independientemente seleccionadas a partir del grupo que consiste en hidrógeno, hidróxilo, halógeno, amino, alcoxilo de C₁₋₄ y alcanoxilo de C₂₋₈.

- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con un tampón, diluyente, portador, adyuvante o excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 45 12. Un proceso para fabricar un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende la reacción de una antraceno-9,10-diona con una alquilendiamina deuterada en condiciones adecuadas para la producción de una alquilaminoalquil-aminoantraquinona.
- 50 13. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el tratamiento del cáncer.
- 55 14. Un compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el tratamiento de un cáncer que es un tumor sólido, en donde el tumor, o parte de este, es hipóxico de manera natural, o para usar en el tratamiento o la prevención de metástasis.
- 60 15. Un compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 a 10 para usar en combinación con uno o más tratamientos adicionales para el cáncer seleccionados a partir del grupo que consiste en antiandrógenos (esteroideos y no esteroideos), agentes que interrumpen la vasculatura, agentes antiangiogénicos, agentes antiVEGFR, inhibidores de IL8, inhibidores de la NO sintasa, agentes vasoconstrictores, agentes vasodilatadores y agentes/modalidades radioterapéuticos.
- 65 16. El uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una forma no deuterada de este, como un indicador del nivel de oxigenación de las células *in vitro*.
17. Un kit de partes para usar en la detección del nivel de oxigenación de las células que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
18. Un kit de conformidad con la reivindicación 17 que comprende, además, una forma no deuterada de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

Figura 1

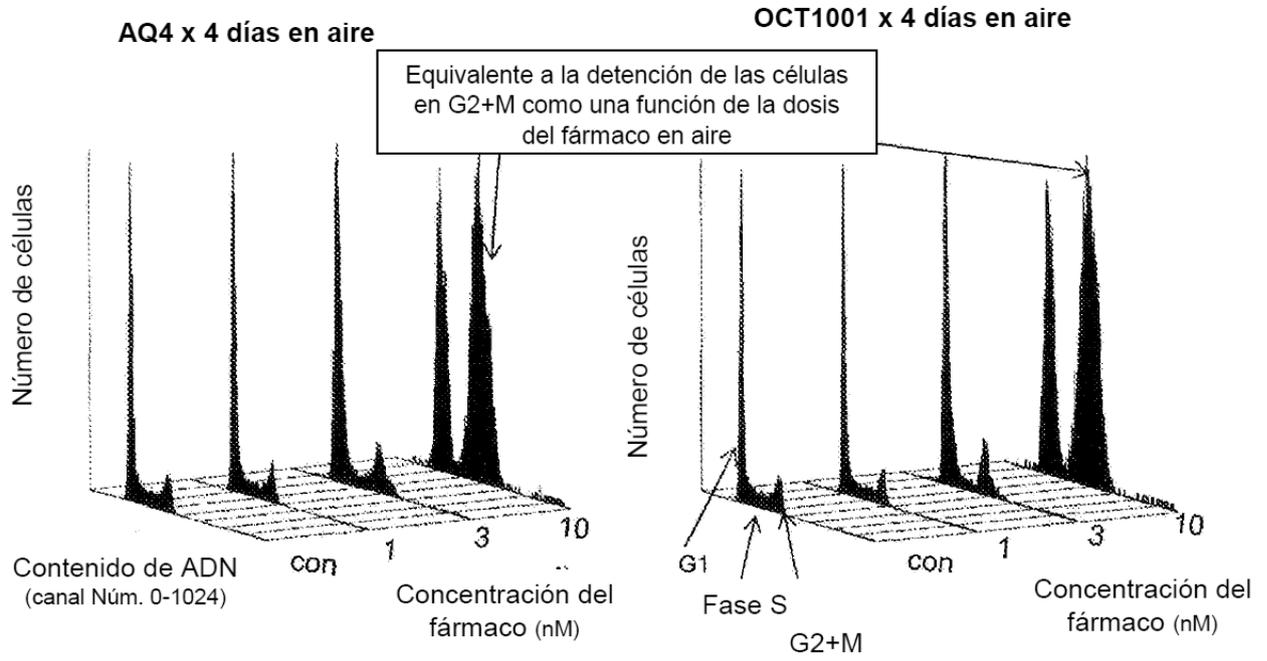


Figura 2

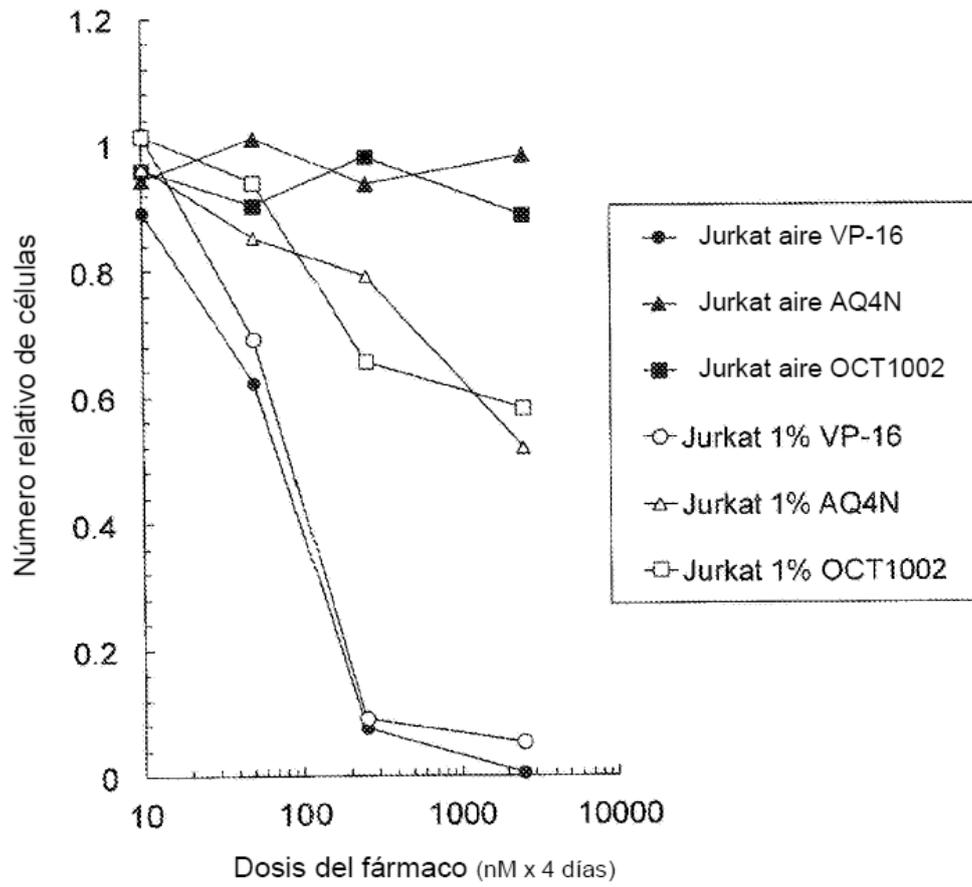


Figura 3

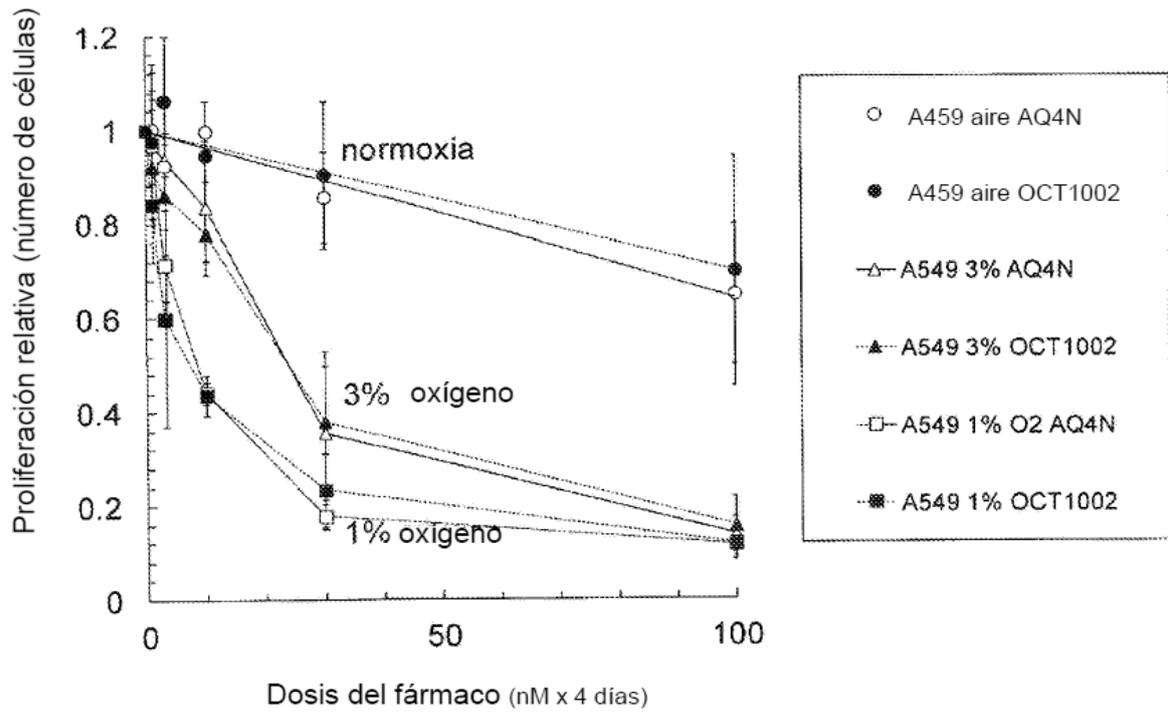


Figura 4

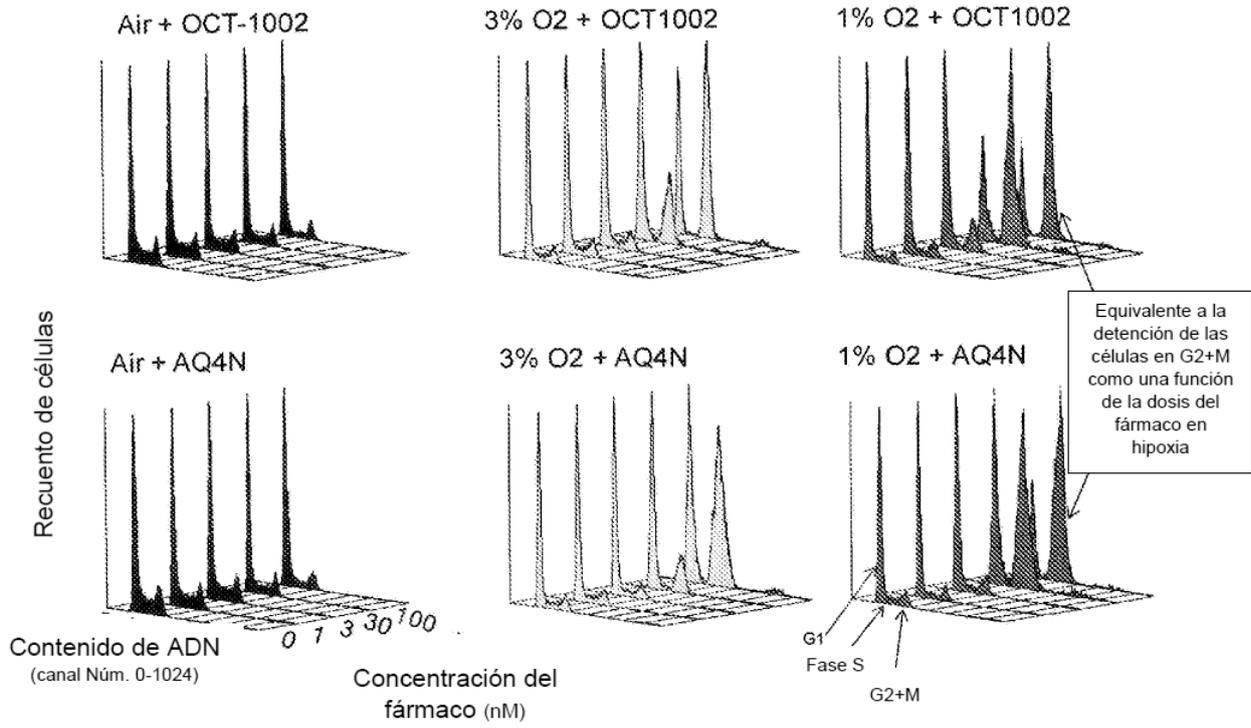


Figura 5(A)

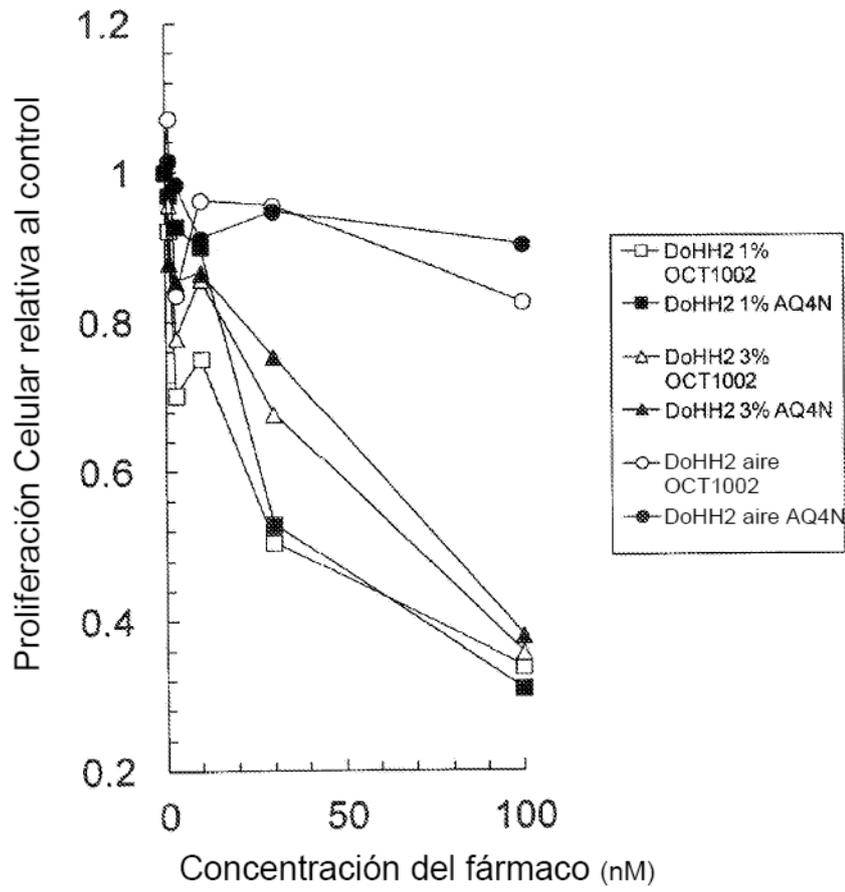


Figura 5(B)

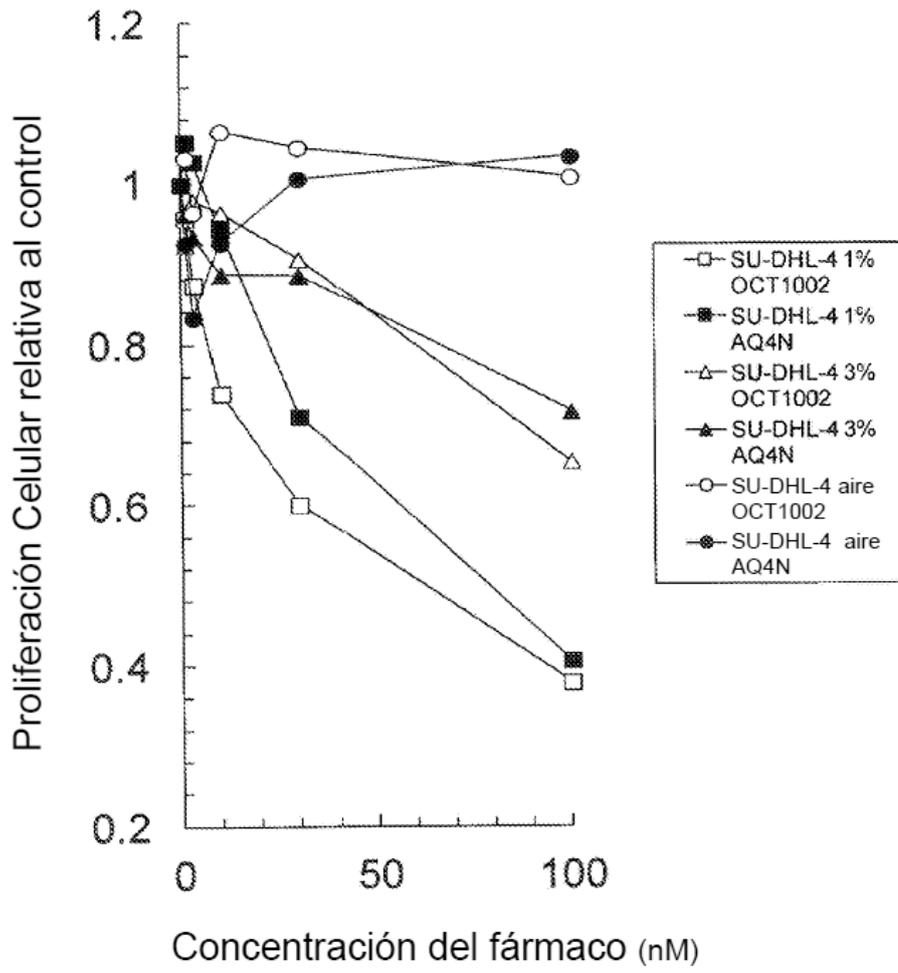


Figura 6

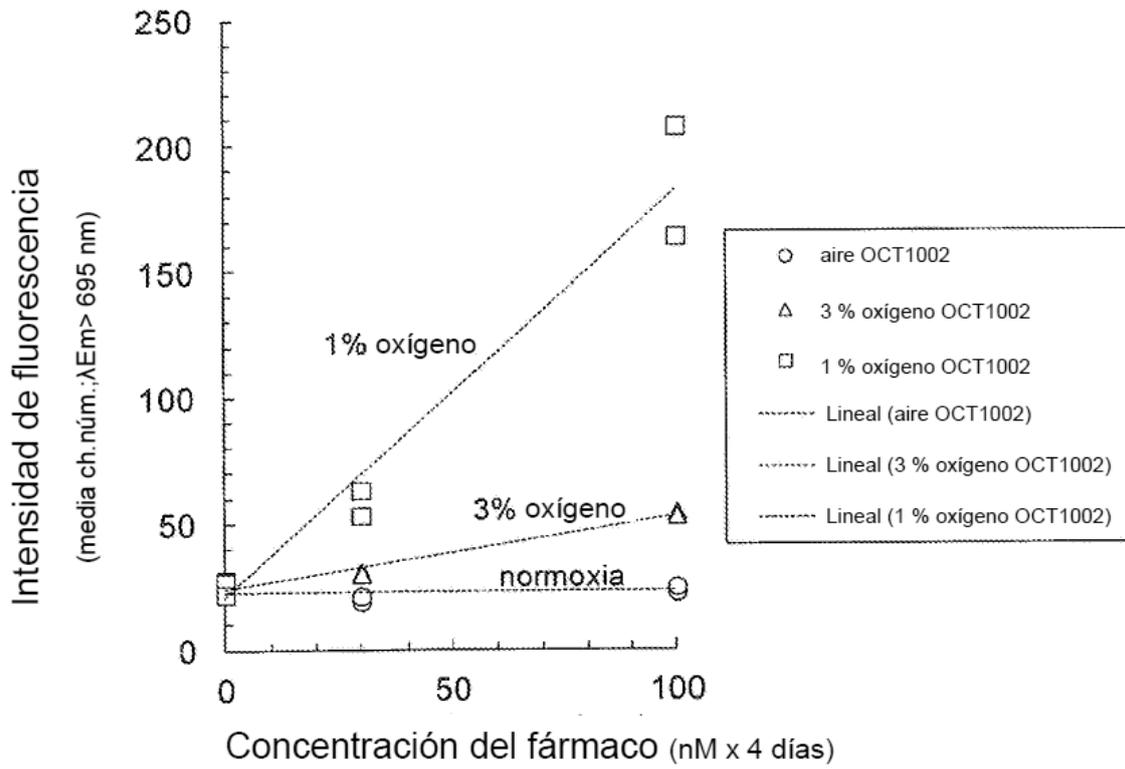


Figura 7

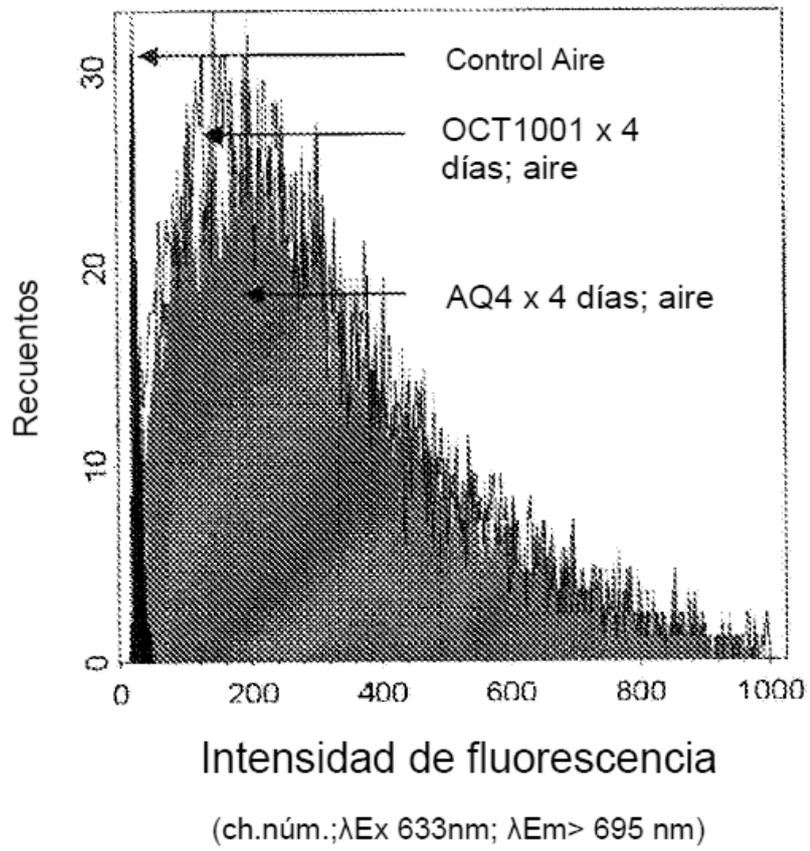


Figura 8

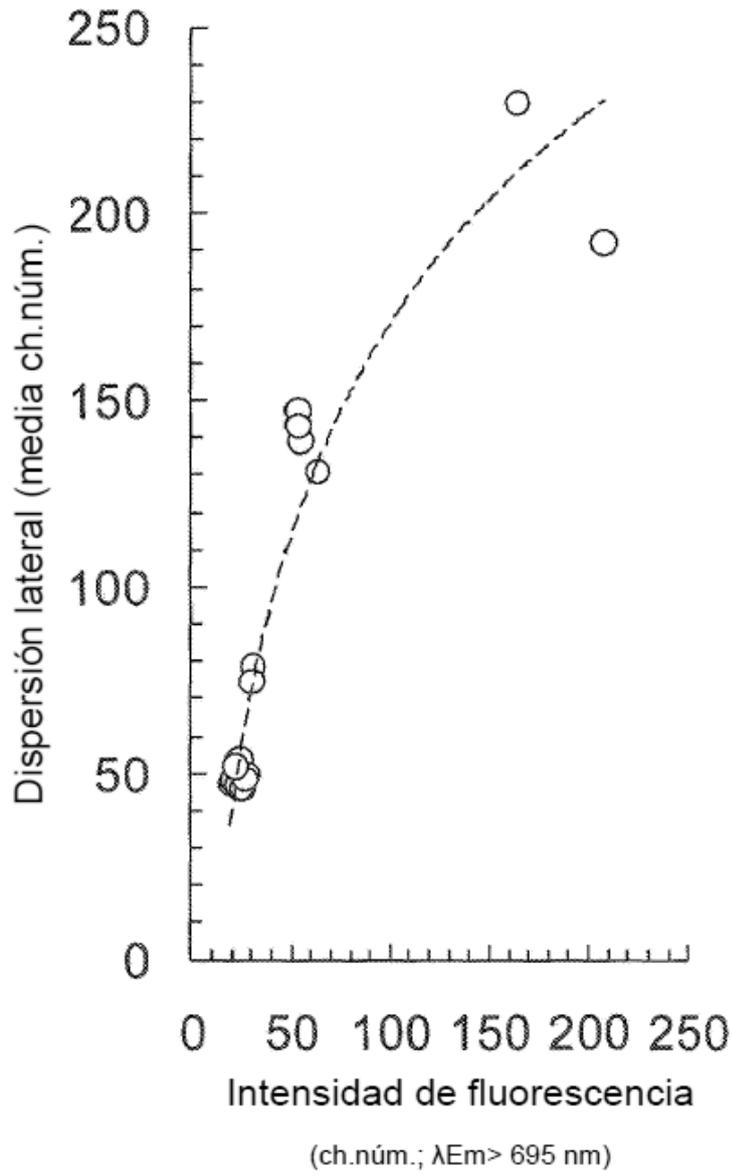


Figura 9(A)

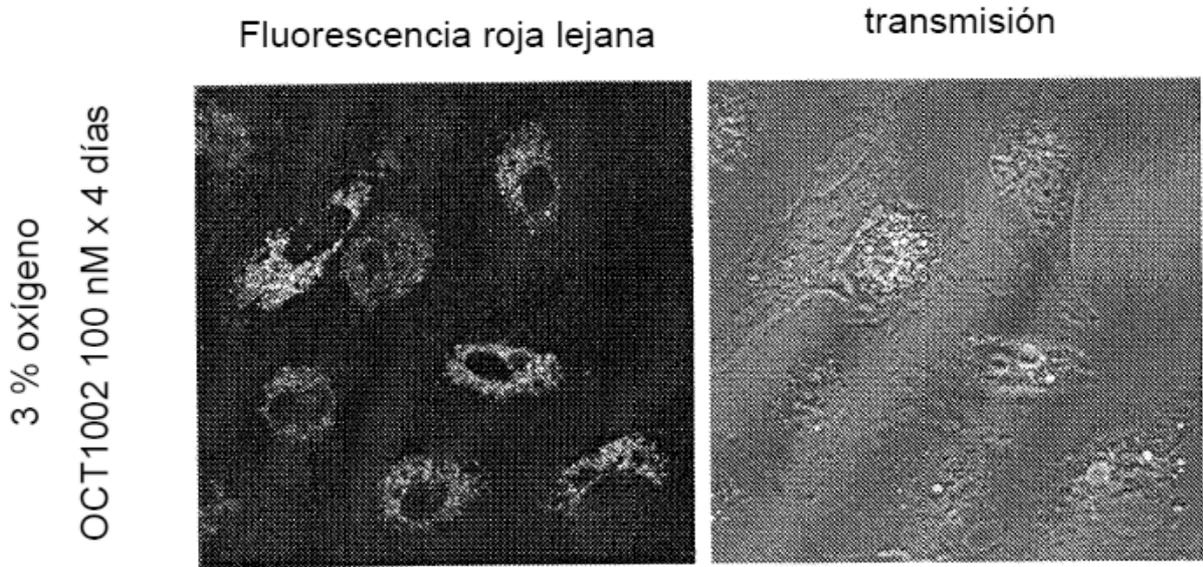


Figura 9(B)

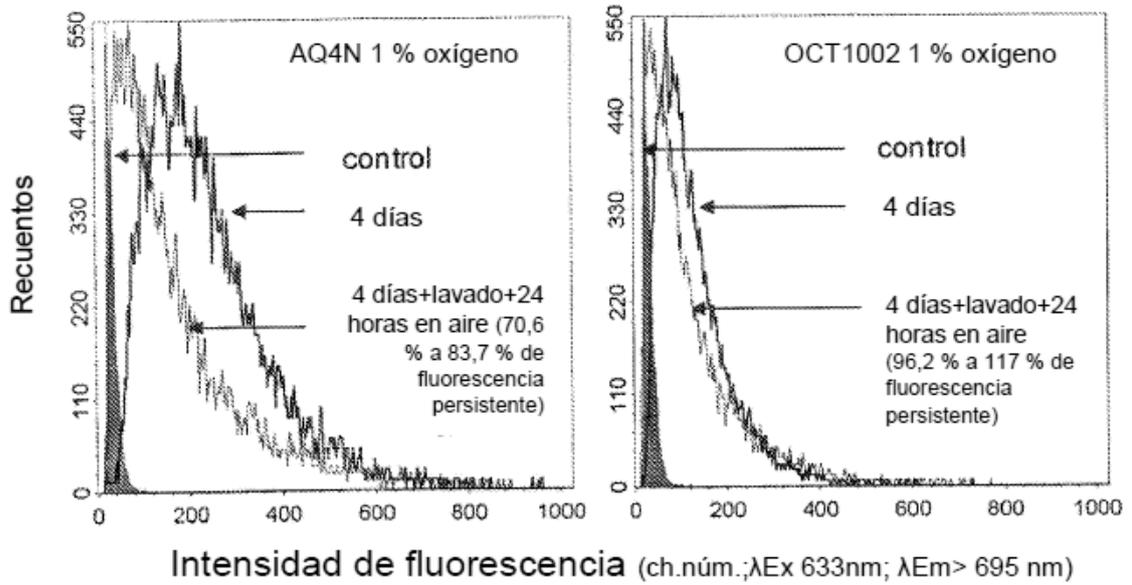


Figura 10

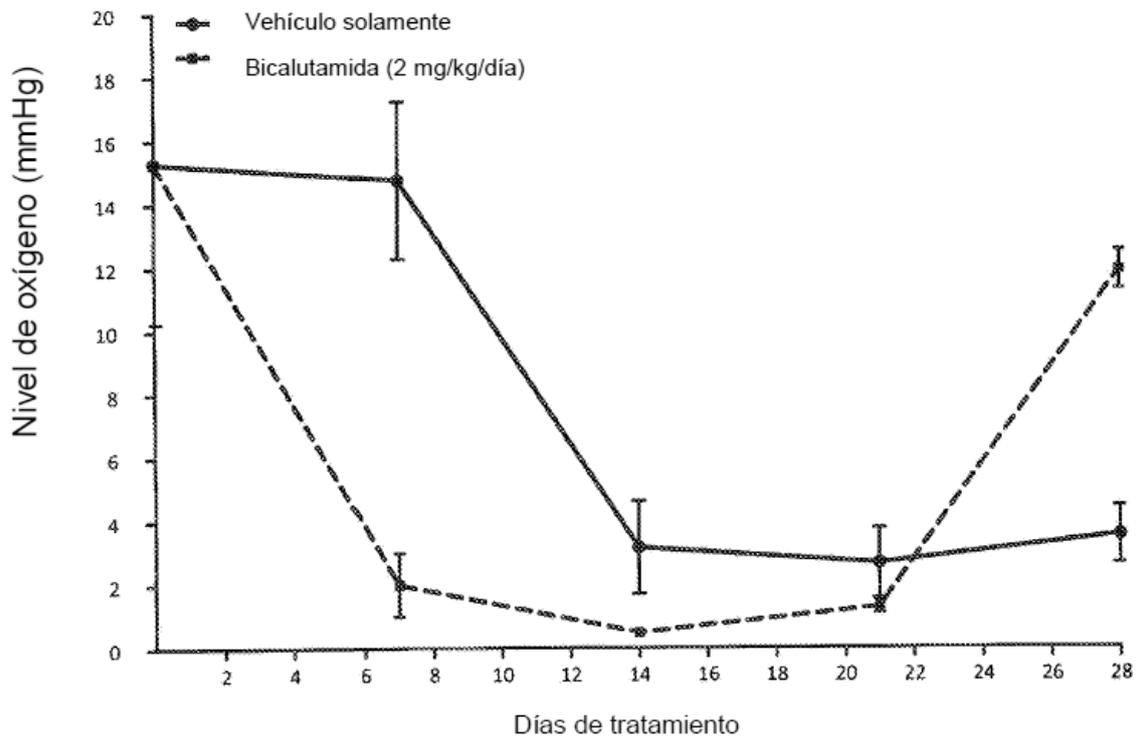


Figura 11

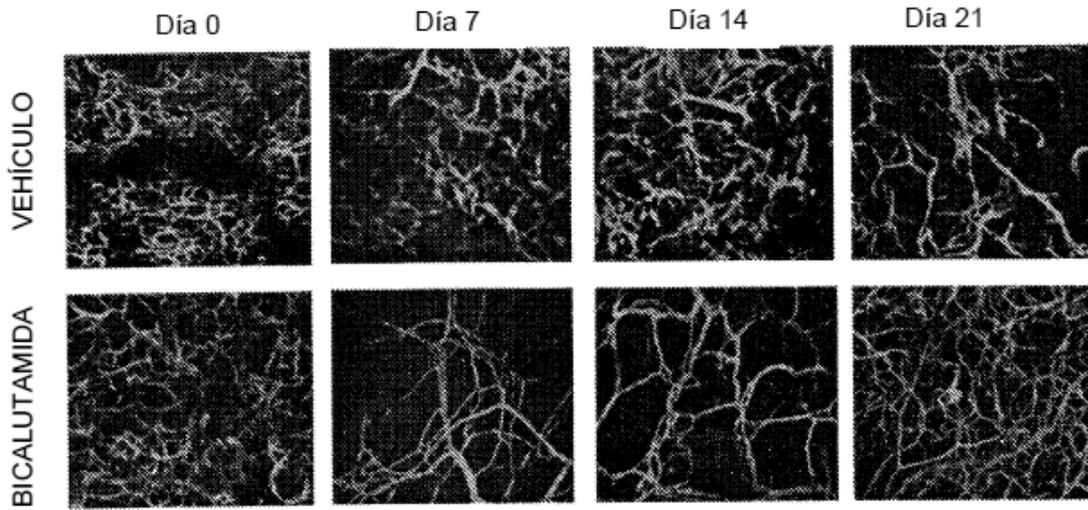


Figura 12(A)

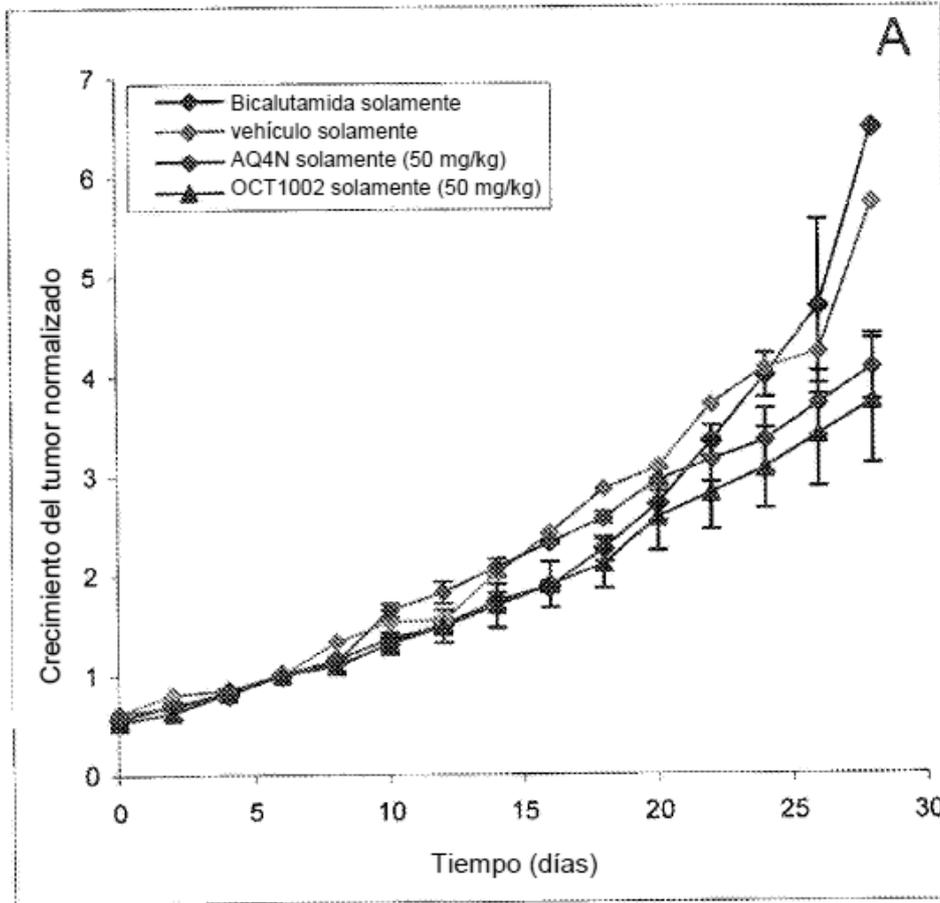


Figura 12(B)

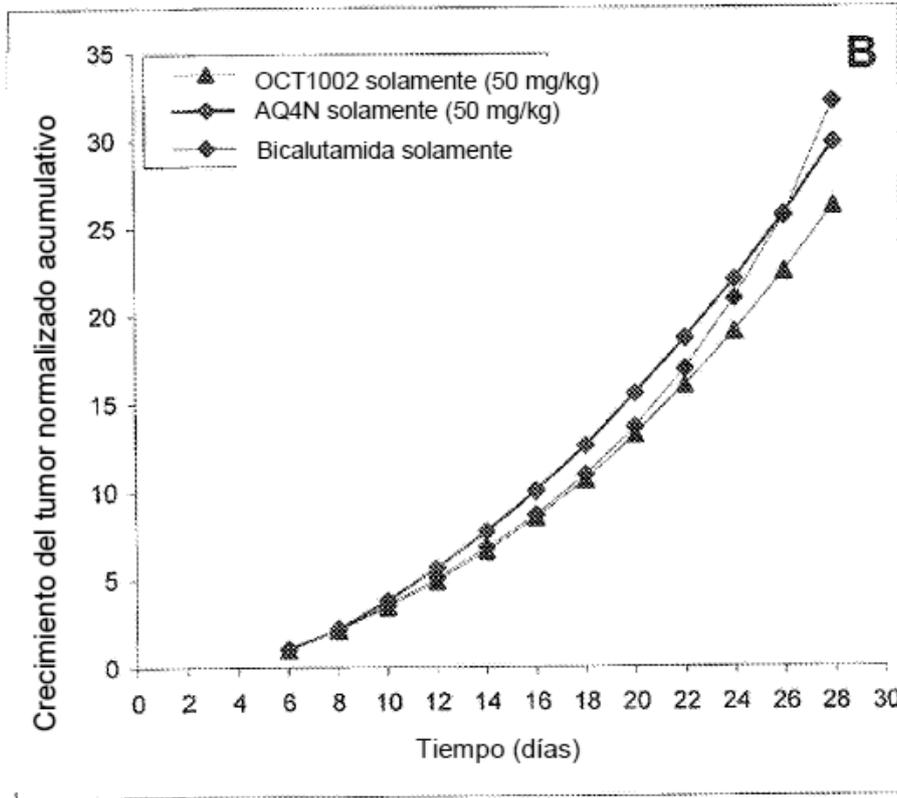


Figura 13(A)

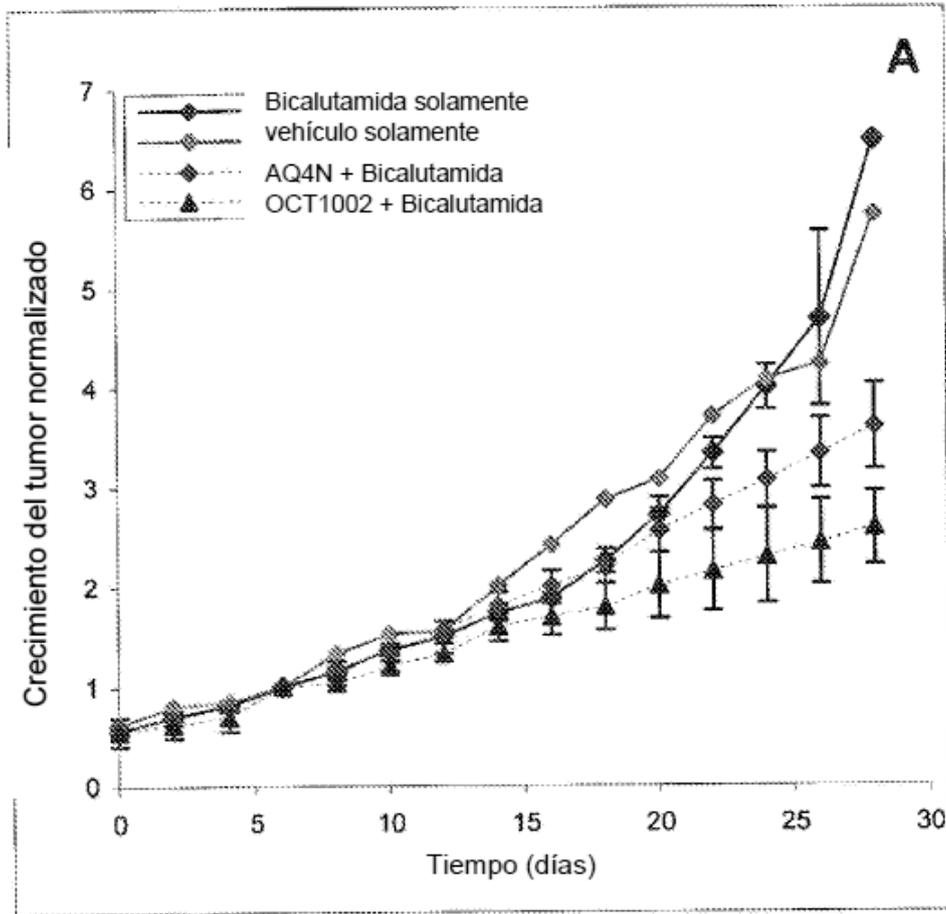


Figura 13(B)

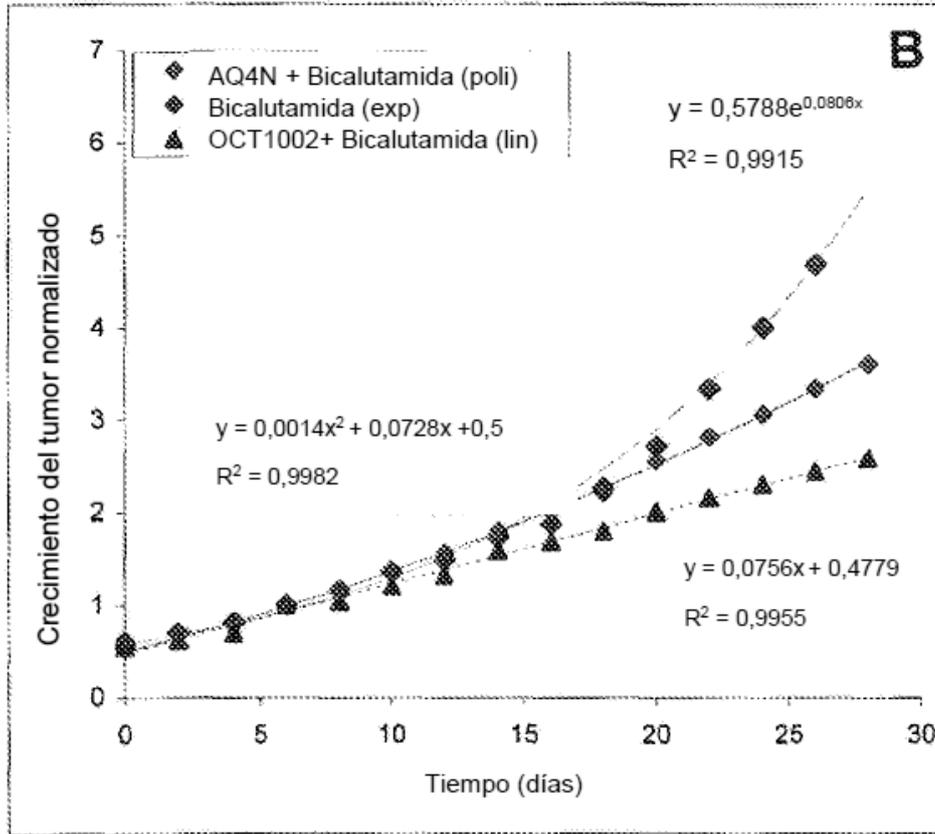


Figura 14

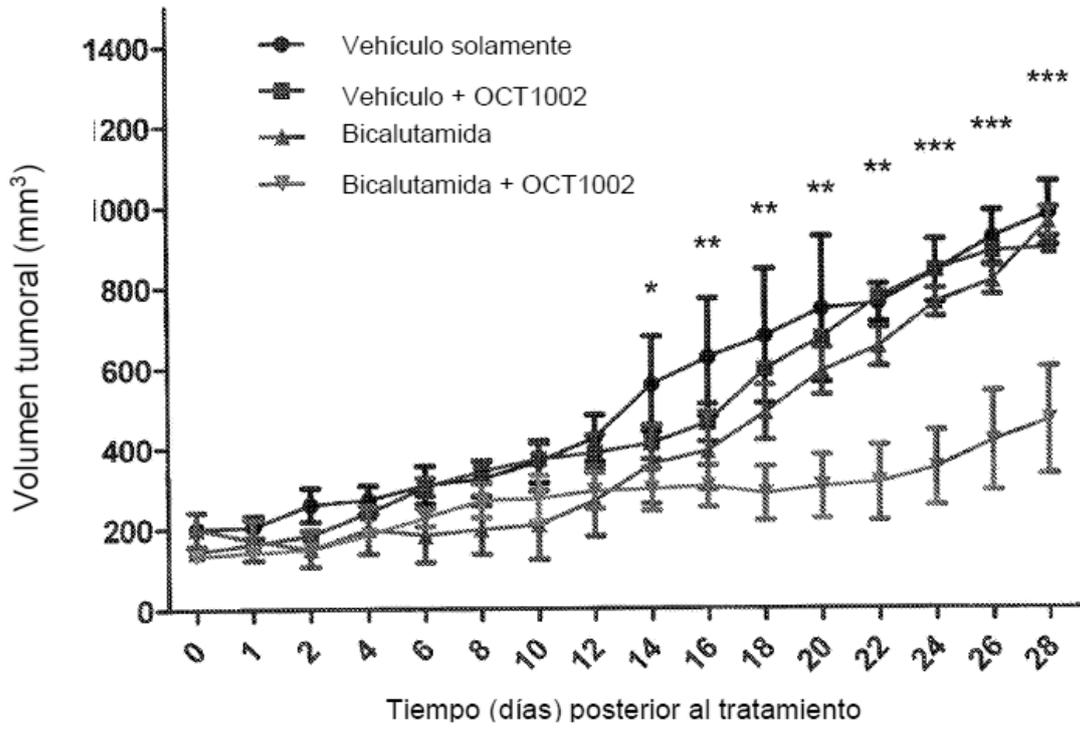
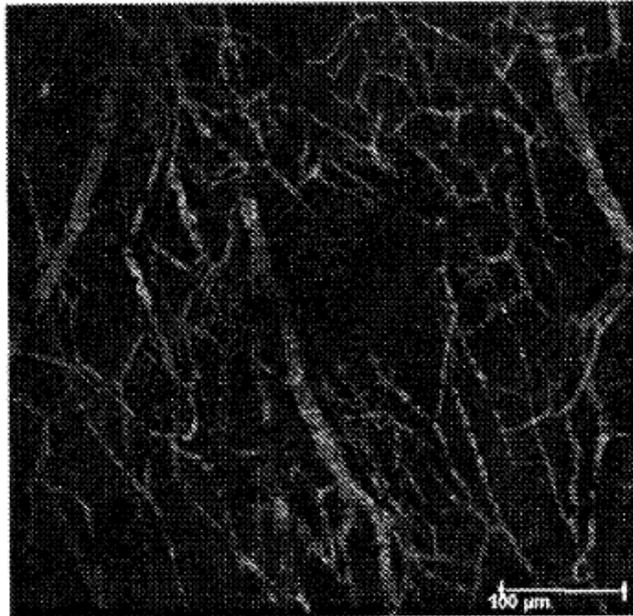


Figura 15

(A) Vehículo + OCT1002 (día 7)



(B) Bicalutamida + OCT1002 (día 7)

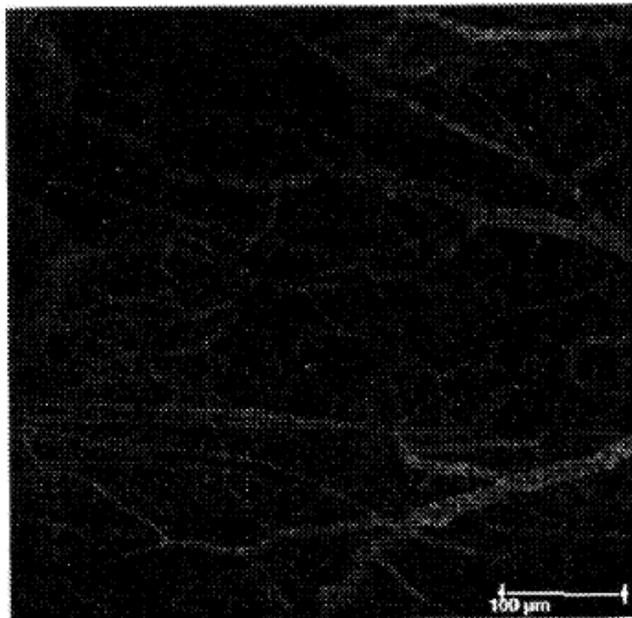


Figura 15 (continuación)

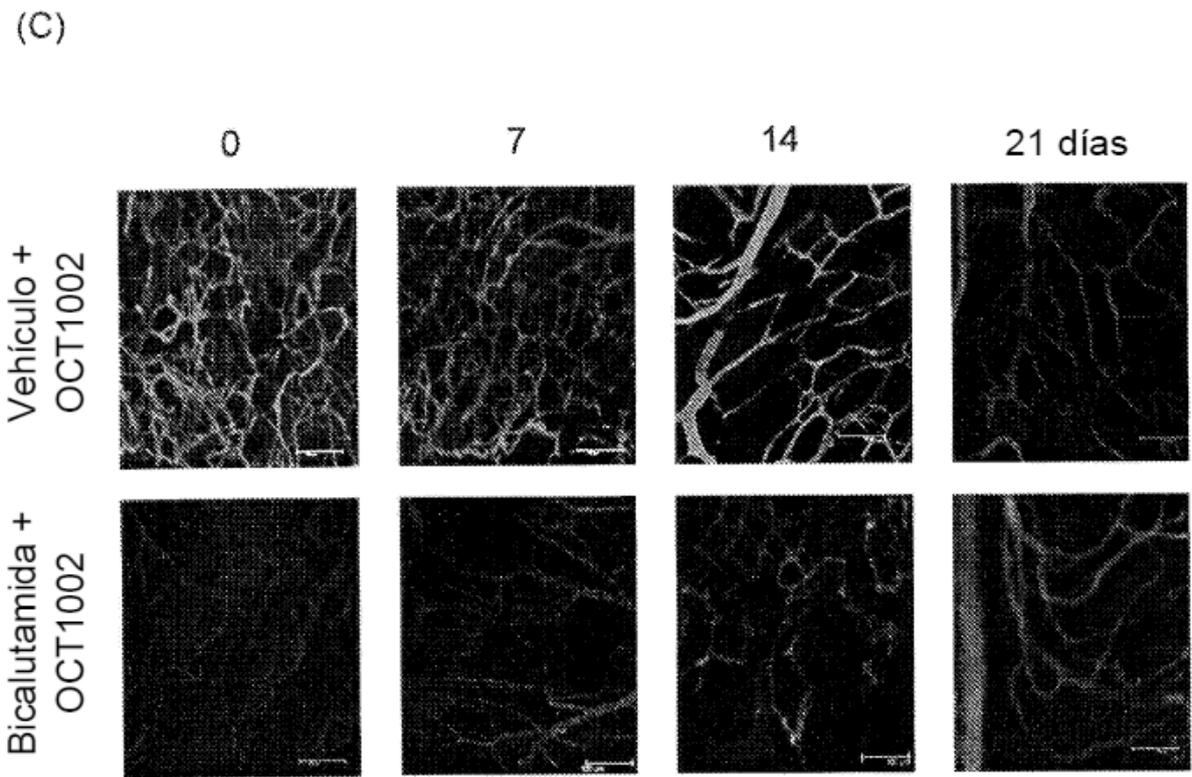


Figura 16

