(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 781 398**

(51) Int. CI.:

C07F 9/564 (2006.01)
C07F 9/22 (2006.01)
C07B 55/00 (2006.01)
A61K 31/664 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2016 PCT/US2016/062114**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17087428**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2016 E 16866977 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3390415**

(54) Título: **(R)- y (S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis (etilen)fosforamidato, composiciones y métodos para sus usos y preparación**

(30) Prioridad:

16.11.2015 US 201562255905 P
18.04.2016 US 201662324259 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2020

(73) Titular/es:

OBI PHARMA, INC. (100.0%)
7F., No. 369, Sec. 7, Zhongxiao E. Rd.
Nangang Dist., Taipei City 115, TW

(72) Inventor/es:

DUAN, JIAN-XIN;
CAO, YEYU;
CAI, XIAOHONG;
JIAO, HAILONG;
MA, JING YUAN y
MATTEUCCI, MARK

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

(R)- y (S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis (etilen)fosforamidato, composiciones y métodos para sus usos y preparación

Campo de la invención

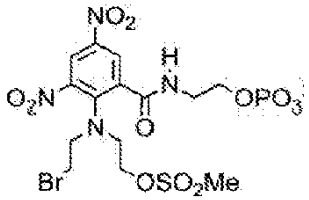
La presente invención proporciona formas ópticamente activas del compuesto 1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato adecuadas como agentes terapéuticos, composiciones farmacéuticas de tales compuestos y sus usos para el tratamiento del cáncer, así como un proceso para su resolución o enriquecimiento en uno de sus enantiómeros, de la mezcla racémica del compuesto (R,S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato, o estereoselectivo sintetiza el (R) y (S)-1(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato ópticamente puro.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad humanas. El tratamiento del cáncer representa un reto ya que es difícil destruir las células cancerosas sin dañar o destruir las células normales. El daño o la destrucción de células normales durante el tratamiento del cáncer es una causa de efectos secundarios adversos en los pacientes y puede limitar la cantidad de fármaco contra el cáncer administrada a un paciente con cáncer.

El miembro C3 de la familia 1 de las aldoceto reductasas (AKR1C3) es una enzima que, en seres humanos, está codificada por el gen AKR1C3. Este gen codifica un miembro de la superfamilia de las aldoceto reductasas, que consta de más de 40 enzimas y proteínas conocidas. Estas enzimas catalizan la conversión de aldehídos y cetonas en sus correspondientes alcoholes utilizando NADH y/o NADPH como cofactores.

Muchas células cancerosas sobreexpresan AKR1C3 reductasa en relación con las células normales (véase, por ejemplo, Cancer Res. 2010; 70:1573-1584; Cancer Res. 2010; 66: 2815-2825). Se ha demostrado que PR 104 es un sustrato débil para AKR1C3 y se analizó en ensayos clínicos.



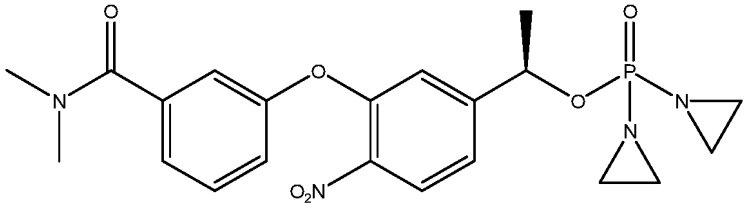
PR 104

Este compuesto no es un profármaco selectivo activado por AKR1C3, ya que también puede activarse en condiciones hipóxicas. PR 104 fue ineficaz en ensayos clínicos. En el documento US 2014/0170240 A1 se desvelan profármacos alquilantes de fosforamidato.

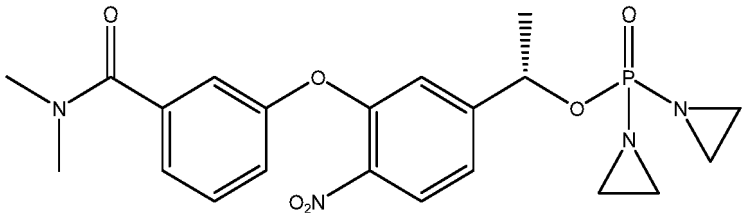
Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de compuestos adecuados para el tratamiento de pacientes con cáncer, incluidos los profármacos selectivos activados por la AKR1C3 reductasa para el tratamiento de pacientes con cáncer. La presente invención satisface esta necesidad.

Sumario de la invención

En un aspecto, se proporcionan en el presente documento compuestos de fórmulas Ia y Ib:



Ia; y



Ib

o una variante isotópica, solvato o hidrato del mismo.

Los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen enantiómeros individuales, así como mezclas de enantiómeros enriquecidos.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto proporcionado en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una dosis unitaria de la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un compuesto para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o de una composición farmacéuticamente aceptable como se proporciona en el presente documento. En una realización, el cáncer es uno en el que los niveles de la AKR1C3 reductasa son altos o más altos de lo normal en dicho cáncer. En una realización, el cáncer es cáncer de hígado y más específicamente, carcinoma hepatocelular (CHC). En una realización, el cáncer es cáncer de pulmón o melanoma no microcítico. En una realización, el cáncer es cáncer de próstata. En una realización, el cáncer es cáncer de mama. En una realización, el cáncer es una leucemia. En una realización, el cáncer es cáncer de esófago. En una realización, el cáncer es renal, gástrico, de colon, de cerebro, de vejiga, de cuello uterino, de ovario, de cabeza y cuello, de endometrio, pancreático, un sarcoma o cáncer rectal. En un aspecto adicional, el compuesto para su uso en un método que comprende determinar el nivel de la AKR1C3 reductasa del cáncer mediante métodos que utilizan un anticuerpo contra AKR1C3, y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o de una composición farmacéuticamente aceptable proporcionada en el presente documento, si dicho nivel es igual a, o mayor que, un valor predeterminado. En un aspecto, antes de la administración, el compuesto para su uso en un método comprende, determinar un nivel de AKR1C3 reductasa intratumoral en una muestra aislada del paciente y seleccionar al paciente para la terapia si el nivel es igual a, o mayor que, un nivel predeterminado. En algunas realizaciones, si el nivel no supera dicho valor predeterminado, o es inferior al mismo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer que no sea un tratamiento que comprenda la administración de un compuesto o composición farmacéuticamente aceptable proporcionada en el presente documento. Los métodos para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, el modo apropiado de administración de los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento serán obvios para el experto en la materia al leer esta divulgación y basándose en otros métodos conocidos por ellos. Los niveles de AKR1C3 se miden siguiendo métodos habituales bien conocidos por el experto en la materia.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa un cromatograma LC para la resolución de los dos enantiómeros de 1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato por cromatografía quiral líquida de alta presión en un CHIRALPAK OZ-H 6x250 mm, columna quiral 5 um (Daicel) eluyendo con 65/35 CO_2/metanol.

La FIG. 2 ilustra la activación de TH 2870 por la aldoceto reductasa, AKR1C3 en comparación con la progesterona.

La FIG. 3 ilustra la expresión de la AKR1C3 en líneas celulares de cáncer de hígado.

La FIG. 4 ilustra la expresión de la AKR1C3 en líneas celulares de cáncer de próstata.

La FIG. 5 ilustra el peso corporal promedio en cada grupo.

La FIG. 6 ilustra imágenes de fluorescencia típicas de la carga tumoral en cada grupo.

La FIG. 7 ilustra las curvas de crecimiento tumoral en cada grupo.

La FIG. 8 ilustra imágenes de fluorescencia de la carga tumoral en cada grupo.

La FIG. 9 ilustra el peso promedio del tumor en diferentes grupos.

La FIG. 10 ilustra cambios de peso corporal en diferentes grupos.

La FIG. 11 ilustra la curva de crecimiento de la carga tumoral en sangre periférica.

La FIG. 12 ilustra el porcentaje positivo de anticuerpos humanos CD45 en sangre, bazo y médula ósea en el punto de terminación en diferentes grupos.

Descripción detallada

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar al lector. A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos o terminología científica o médica utilizados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por los expertos en las materias químicas y médicas. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una referencia inmediata, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse como una diferencia sustancial sobre la definición del término como se entiende generalmente en la técnica.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso, incluyendo intervalos de cada uno de los mismos, son aproximaciones que normalmente pueden variarse (+) o (-) mediante incrementos de 0,1, 1,0 o 10,0, según sea apropiado. Todas las designaciones numéricas pueden entenderse precedidas por el término "aproximadamente". Los reactivos descritos en el presente documento son a modo de ejemplo y sus equivalentes pueden conocerse en la técnica.

"Un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos a un compuesto. Como tal, los términos "un" (o "uno/a"), "uno o más" y "al menos uno" se usan indistintamente en el presente documento.

El término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa un error aceptable para el valor particular como el determinado por un experto en la materia, que depende en parte de cómo se mida o determine el valor. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro de 1, 2, 3 o 4 desviaciones convencionales. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro del 50 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,05 % de un valor o intervalo dado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Consistente esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la composición o método. "Consistente en" significará excluir más que elementos traza de otros ingredientes para las composiciones reivindicadas y las etapas sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención. Por consiguiente, se pretende que los métodos y las composiciones puedan incluir etapas y componentes adicionales (que comprenden) o, alternativamente, que incluyan etapas y composiciones sin importancia (consistente esencialmente en) o, alternativamente, que pretendan solo las etapas o composiciones del método establecidos (consistente en).

"Grupo saliente" se refiere a un resto que puede desplazarse en condiciones de desplazamiento nucleófilo bien conocidas por el experto en la materia. Los grupos salientes incluyen, sin limitación, halo y $-OSO_2-R^{20}$, donde R^{20} es arilo, cicloalquilo, heterociclilo, heteroarilo o alquilo opcionalmente sustituido.

El término "administrar" o la expresión "administración de" un fármaco a un paciente (y sus equivalentes gramaticales) se refieren a una administración directa, que puede ser una administración a un paciente por un profesional médico o puede ser una autoadministración y/o administración indirecta, que puede ser el acto de prescribir un fármaco. Por ejemplo, un médico que enseña a un paciente a autoadministrarse un fármaco y/o que proporciona al paciente una receta de un fármaco, está administrando el fármaco al paciente.

"Cáncer" se refiere a leucemias, linfomas, carcinomas y otros tumores neoplásicos, incluyendo tumores sólidos, de crecimiento posiblemente ilimitado que pueden expandirse localmente por invasión y sistémicamente por metástasis. Los ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitación, cáncer de la glándula suprarrenal, hueso, cerebro, mama, bronquios, colon y/o recto, vesícula biliar, cabeza y cuello, riñones, laringe, hígado, pulmón, tejido nervioso, páncreas, próstata, paratiroides, piel, estómago y tiroides. Otros ejemplos determinados de cánceres incluyen, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, adenocarcinoma, adenoma, carcinoma de células basales, displasia cervicouterina y carcinoma *in situ*, sarcoma de Ewing, carcinomas epidermoides, tumor de células gigantes, glioblastoma multiforme, tumor de células pilosas, ganglioneuroma intestinal, tumor hiperplásico de nervio corneal, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, leiomioma, leucemias, linfomas, carcinoide neoplásico,

melanomas neoplásicos, hipercalcemia neoplásica, tumor de hábito marfanoide, carcinoma medular, carcinoma de piel metastásico, neuroma mucoso, mieloma, micosis fungoide, neuroblastoma, osteosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, tumor de ovario, feocromocitoma, policitemia vera, tumor cerebral primario, tumor de pulmón microcítico, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, hiperplasia, seminoma, sarcoma de tejidos blandos, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, tumor de células renales, lesión cutánea tópica, sarcoma de células reticulares y tumor de Wilm.

El término "contacto" o la expresión "poner en contacto", se refieren a la unión de un agente terapéutico y una célula o tejido de manera que se produce un efecto fisiológico y/o químico como resultado de dicho contacto. El contacto puede tener lugar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En una realización, un agente terapéutico se pone en contacto con una célula en cultivo celular (*in vitro*) para determinar el efecto del agente terapéutico en la célula. En otra realización, la puesta en contacto de un agente terapéutico con una célula o tejido incluye la administración de un agente terapéutico a un sujeto que tiene la célula o tejido con el que se va a establecer el contacto.

Las expresiones "ópticamente activo" y "enantioméricamente activo" se refieren a un conjunto de moléculas, que tiene un exceso enantiomérico de no menos de aproximadamente 10 %, no menos de aproximadamente 20 %, no menos de aproximadamente 30 %, no menos de aproximadamente 40 %, no menos de aproximadamente 50 %, no menos de aproximadamente 60 %, no menos de aproximadamente 70 %, no menos de aproximadamente 80 %, no menos de aproximadamente 90 %, no menos de aproximadamente 91 %, no menos de aproximadamente 92 %, no menos de aproximadamente 93 %, no menos de aproximadamente 94 %, no menos de aproximadamente 95 %, no menos de aproximadamente 96 %, no menos de aproximadamente 97 %, no menos de aproximadamente 98 %, no menos de aproximadamente 99 %, no menos de aproximadamente 99,5 %, no menos de aproximadamente 99,8 %, o no menos de aproximadamente 99,9 %. En determinadas realizaciones, el exceso enantiomérico para un compuesto ópticamente o enantioméricamente activo es de no menos de aproximadamente 90 %, no menos de aproximadamente 95 %, no menos de aproximadamente 98 %, o no menos de aproximadamente 99 %.

En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos R y S se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los (+) y (-) se usan para denotar la rotación óptica del compuesto, es decir, la dirección en la que el compuesto ópticamente activo gira un plano de luz polarizada. El prefijo (-) indica que el compuesto es levógiro, es decir, el compuesto gira el plano de luz polarizada hacia la izquierda o en sentido antihorario. El prefijo (+) indica que el compuesto es dextrógiro, es decir, el cuesto gira el plano de la luz polarizada hacia la derecha o en sentido horario. Sin embargo, el signo de rotación óptica, (+) y (-), no está relacionado con la configuración absoluta de la molécula, R y S.

Las expresiones "ópticamente puro" y "enantioméricamente puro" se refieren a una colección de moléculas, las cuales tienen un exceso enantiomérico (ee) de no menos que aproximadamente el 80 %, no menos que aproximadamente el 90 %, no menos que aproximadamente el 91 %, no menos que aproximadamente el 92 %, no menos que aproximadamente el 93 %, no menos que aproximadamente el 94 %, no menos que aproximadamente el 95 %, no menos que aproximadamente el 96 %, no menos que aproximadamente el 97 %, no menos que aproximadamente el 98 %, no menos que aproximadamente el 99 %, no menos que aproximadamente el 99,5 %, no menos que aproximadamente el 99,8 % o no menos que aproximadamente el 99,9 %. En ciertas realizaciones, el exceso enantiomérico para un compuesto óptica o enantioméricamente puro no es menos que aproximadamente el 90 %, no menos que aproximadamente el 95 %, no menos que aproximadamente el 98 % o no menos que aproximadamente el 99 %. Un exceso enantiomérico de un compuesto se puede determinar por cualquier método convencional usado por un experto en la materia, que incluye, pero sin limitarse a, cromatografía quiróptica (cromatografía de gases, cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía de capa fina) usando una fase estacionaria ópticamente activa, dilución isotópica, electroforesis, calorimetría, polarimetría, métodos de resolución de RMN con derivatización quiral y métodos de RMN con un agente de solvatación quiral o reactivo de cambio quiral.

Las expresiones "sustancialmente puro" y "sustancialmente homogéneo" significan suficientemente homogéneo para parecer libre de impurezas fácilmente detectables según lo determinado por los métodos analíticos convencionales usados por un experto en la materia, que incluye, pero sin limitarse a, cromatografía de capa fina (TLC), electroforesis en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases (GC), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM); o suficientemente puro para que una purificación adicional no altere de manera detectable las propiedades físicas, químicas, biológicas, farmacológicas y/o, tales como las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. En ciertas realizaciones, "sustancialmente puros" o "sustancialmente homogéneo" se refiere a una colección de moléculas, en donde al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % o al menos aproximadamente el 99,5 % por peso de las moléculas son un estereoisómero individual de un compuesto, según se determina mediante métodos analíticos convencionales.

La expresión "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene una proporción no natural de un isótopo en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto contiene proporciones no naturales de uno o más isótopos, que incluye, pero sin limitarse a,

hidrógeno (1H), deuterio (^{2}H), tritio (^{3}H), carbono-11 (^{11}C) carbono-12 (^{12}C), carbono-13 (^{13}C), carbono-14 (^{14}C), nitrógeno-13 (^{13}N), nitrógeno-14 (^{14}N), nitrógeno-15 (^{15}N), oxígeno-14 (^{14}O), oxígeno-15 (^{15}O), oxígeno-16 (^{16}O), oxígeno-17 (^{17}O), oxígeno-18 (^{18}O), flúor-17 (^{17}F), flúor-18 (^{18}F), fósforo-31 (^{31}P),fósforo-32 (^{32}P), fósforo-33 (^{33}P), azufre-32 (^{32}S), azufre-33 (^{33}S), azufre-34 (^{34}S), azufre-35 (^{35}S), azufre-36 (^{36}S), cloro-35 (^{35}Cl), cloro-36 (^{36}Cl), cloro-37 (^{37}Cl), bromo-79 (^{79}Br), bromo-81 (^{81}Br), yodo-123 (^{123}I), yodo-125 (^{125}I), yodo-127 (^{127}I), yodo-129 (^{129}I) y yodo-131 (^{131}I). En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto está en una forma estable, es decir, no radioactiva. En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto contiene proporciones no naturales de uno o más isótopos, que incluye, pero sin limitarse a, hidrógeno (^{1}H), deuterio (^{2}H), carbono-12 (^{12}C), nitrógeno-13 (^{13}C), nitrógeno-14 (^{14}N), nitrógeno-15 (^{15}N), oxígeno-16 (^{16}O), oxígeno-17 (^{17}O), oxígeno-18 (^{18}O), flúor-17 (^{17}F), fósforo-31 (^{31}P), azufre-32 (^{32}S), azufre-33 (^{33}S), azufre-34 (^{34}S), azufre-36 (^{36}S), cloro-35 (^{35}Cl), cloro-37 (^{37}Cl), bromo-79 (^{79}Br), bromo-81 (^{81}Br) y yodo-127 (^{127}I). En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto está en una forma inestable, es decir, radioactivo. En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto contiene proporciones no naturales de uno o más isótopos, que incluye, pero sin limitarse a, tritio (^{3}H), carbono-11 (^{11}C), carbono-14 (^{14}C), nitrógeno-13 (^{13}N), oxígeno-14 (^{14}O), oxígeno-15 (^{15}O), flúor-18 (^{18}F), fósforo-32 (^{32}P), fósforo-33 (^{33}P), azufre-35 (^{35}S), cloro-36 (^{36}Cl), yodo-123 (^{123}I), yodo-125 (^{125}I), yodo-129 (^{129}I) y yodo-131 (^{131}I). Se entenderá que, en un compuesto como el proporcionado en el presente documento, cualquier hidrógeno puede ser ^{2}H, por ejemplo, o cualquier carbono puede ser ^{13}C, como ejemplo, o cualquier nitrógeno puede ser ^{15}N, como ejemplo y cualquier oxígeno puede ser ^{18}O, cuando sea factible de acuerdo con el juicio de un experto. En ciertas realizaciones, una "variante isotópica" de un compuesto contiene proporciones no naturales de deuterio.

La frase "una variante isotópica del mismo; o una sal, solvato, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo" tiene el mismo significado que la frase "una variante isotópica del compuesto al que se hace referencia en el mismo; o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del compuesto al que se hace referencia en él o una variante isotópica el compuesto al que se hace referencia en el mismo".

"Paciente" y "sujeto" se usan indistintamente para referirse a un mamífero que necesita tratamiento para el cáncer. Generalmente, el paciente es un ser humano. Generalmente, el paciente es un ser humano diagnosticado con cáncer. En ciertas realizaciones, un "paciente" o "sujeto" puede referirse a un mamífero no humano utilizado en la detección, caracterización y evaluación de fármacos y terapias, tales como un primate no humano, un perro, gato, conejo, cerdo, ratón o una rata.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", "excipiente farmacéuticamente aceptable", "vehículo fisiológicamente aceptable", o "excipiente fisiológicamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, disolvente o material de encapsulación. En una realización, cada componente es "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de una formulación farmacéutica, y adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Véase, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, Pa., 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3ª ed.; Ash and Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; y Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2ª ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Ratón, Fla., 2009.

"Profármaco" se refiere a un compuesto que, después de la administración, se metaboliza o se convierte de otro modo en un compuesto (o fármaco) biológicamente activo o más activo con respecto a al menos una propiedad. Un profármaco, en comparación con el fármaco, se modifica químicamente de una manera que lo hace, en comparación con el fármaco, menos activo o inactivo, pero la modificación química es tal que el fármaco correspondiente se genera mediante procesos metabólicos u otros procesos biológicos después de administrar el profármaco. Un profármaco puede tener, en comparación con el fármaco activo, características de estabilidad metabólica o de transporte alteradas, menos efectos secundarios o menor toxicidad, o mejor sabor (por ejemplo, véase la referencia Nogrady, 1985, Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392). Un profármaco puede sintetizarse usando reaccionantes distintos del fármaco correspondiente.

"Tumor sólido" se refiere a tumores sólidos que incluyen, aunque sin limitación, tumores metastásicos en hueso, cerebro, hígado, pulmones, ganglio linfático, páncreas, próstata, piel y tejidos blandos (sarcoma).

El término "solvato" se refiere a un complejo o agregado formado por una o más moléculas de un soluto, por ejemplo, un compuesto proporcionado en el presente documento, y una o más moléculas de un disolvente, que está presente en cantidad estequiométrica o no estequiométrica. Los disolventes adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y ácido acético. En determinadas realizaciones, el disolvente es farmacéuticamente aceptable. En una realización, el complejo o agregado está en forma cristalina. En otra realización, el complejo o agregado está en una forma no cristalina. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato. Los ejemplos de hidratos incluyen, aunque sin limitación, un hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato y pentahidrato.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco, se refiere a una cantidad de un fármaco que,

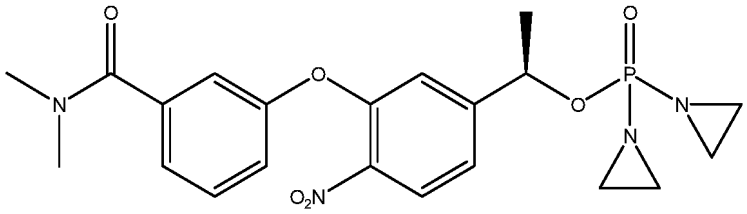
cuando se administra a un paciente con cáncer, tendrá el efecto terapéutico esperado, por ejemplo, alivio, mejoría, alivio o eliminación de una o más manifestaciones de cáncer en el paciente. Un efecto terapéutico completo no tiene que producirse necesariamente tras la administración de una dosis, y se puede producir tras la administración de una serie de dosis. Por tanto, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones.

"Tratamiento, "tratamiento de," o "terapia de" una afección o paciente se refiere a realizar etapas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, el alivio o la mejoría de uno o más síntomas de cáncer; la disminución del grado de la enfermedad; el retraso o la ralentización de la evolución de la enfermedad; mejoría, alivio o estabilización de la patología; u otros resultados beneficiosos. En algunos casos, el tratamiento del cáncer puede producir a una respuesta parcial o enfermedad estable.

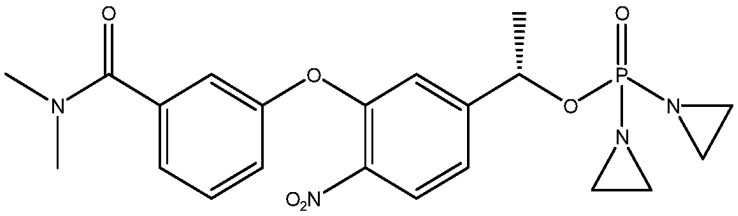
La expresión "células tumorales" se refiere a células tumorales de cualquier especie apropiada, por ejemplo, de mamífero tal como de murino, canino, felino, equino o ser humano.

Realizaciones descriptivas

Se proporcionan en el presente documento compuestos de fórmulas Ia e Ib:



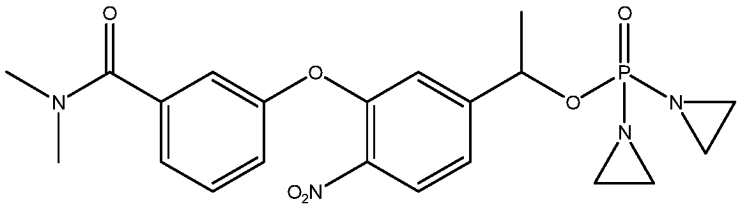
Ia; y



Ib

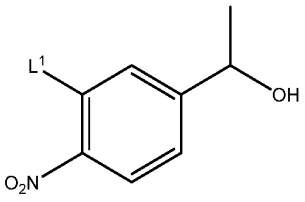
o una variante isotópica, solvato o hidrato del mismo.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un proceso de preparación de un compuesto de fórmula I:



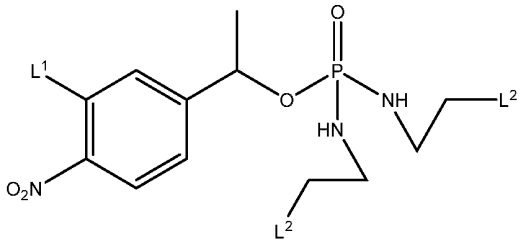
I

que comprende poner en contacto un compuesto de fórmula II:



II

con $POCl_3$ y $H_2NCH_2CH_2L^2$ o una sal del mismo, para proporcionar un compuesto de fórmula III,



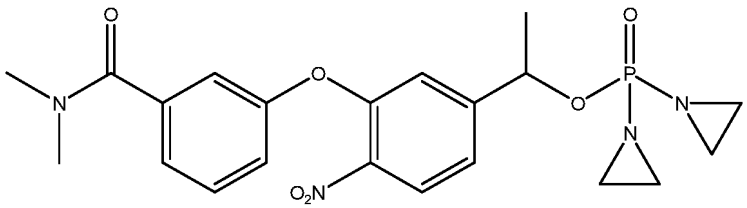
III

en donde L^1 y L^2 son independientemente un grupo saliente, y después, se toma el compuesto de fórmula III para proporcionar un compuesto de fórmula I.

Se proporciona en el presente documento ciertos métodos para sintetizar compuestos. Otros métodos para sintetizar estos y otros compuestos proporcionados en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica basados en la adaptación y el reemplazo de reactivos y reactivos en métodos sintéticos bien conocidos por ellos. Véase, por ejemplo, Hay et al., J. Med. Chem. 2003, 46, 2456-2466 y Hu et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21 (2011) 3986-3991. Los materiales de partida útiles para preparar los compuestos proporcionados en el presente documento están disponibles comercialmente o pueden prepararse siguiendo métodos de rutina. Las reacciones se llevan a cabo comúnmente en un disolvente inerte y se calientan si es necesario. El experto en la materia apreciará fácilmente que ciertas reacciones pueden requerir el uso de un grupo protector. Los grupos protectores son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. Peter G. M. Wuts and Theodora W. Greene, 4ª Edición o una edición posterior, John Wiley & Sons, Inc., 2007. Los productos de reacción pueden separarse siguiendo métodos de rutina, tales como cristalización, precipitación, destilación y/o cromatografía. La pureza de un compuesto o un intermedio se puede determinar utilizando métodos bien conocidos como RMN ^1H, HPLC, TLC, y similares.

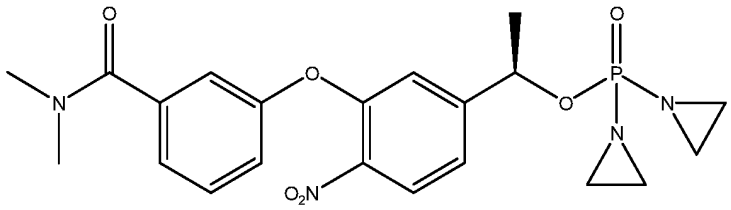
En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso para la resolución óptica de un compuesto de fórmula I. En vista de la importancia farmacéutica de los compuestos de fórmula Ia y Ib de la presente invención, ha sido imperativo resolver el compuesto de fórmula I usando un proceso industrial efectivo y, especialmente, con un buen rendimiento y con excelente pureza química y enantiomérica.

El solicitante ha desarrollado un proceso para la resolución óptica del compuesto de fórmula I, que permite obtener el compuesto de fórmulas Ia y Ib con buenas características de rendimiento y pureza química y enantiomérica. El proceso de la invención hace posible obtener cualquiera de los enantiómeros del compuesto de fórmula I en un excelente exceso enantiomérico, con alta productividad y con un excelente rendimiento al tiempo que se ahorra en los solventes usados. Más específicamente, la presente invención se refiere a un proceso para la resolución óptica de un compuesto de fórmula I:

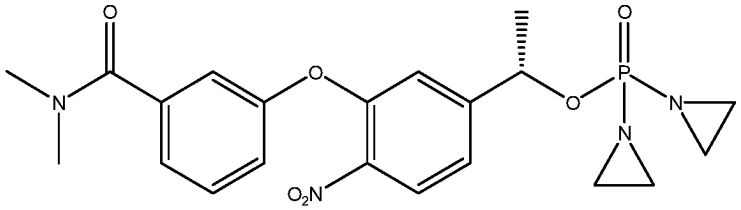


I

para producir sus enantiómeros de configuración absoluta (R) y (S), respectivamente de fórmulas (Ia) y (Ib):



Ia: y



Ib

en donde una mezcla racémica o enriquecida enantioméricamente del compuesto de fórmula I se separa en sus dos enantiómeros, (R)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato de fórmula (Ia) y (S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato de fórmula (Ib), mediante cromatografía quiral.

Se entiende que la resolución óptica significa la separación de los dos enantiómeros de una mezcla racémica o de cualquier mezcla de esos dos enantiómeros.

Se entiende que una mezcla racémica significa una mezcla de dos enantiómeros en una relación de 55:45 a 45:55, preferentemente en una relación de 50:50.

Se entiende que una mezcla enriquecida enantioméricamente significa una mezcla de dos enantiómeros que contienen significativamente más de uno de los enantiómeros en una proporción que varía entre 55:45 y 90:10.

Se entiende por cromatografía quiral la disposición que hace posible la separación de los enantiómeros de una mezcla por medio de una fase estacionaria quiral y una fase móvil compuesta de un disolvente o de una mezcla de disolventes y gases.

De acuerdo con una de las realizaciones de la invención, la fase estacionaria usada para la cromatografía quiral comprende un gel de sílice impregnado con un polisacárido funcionalizado.

La fase móvil usada para la cromatografía quiral en una realización, comprende una mezcla de un alcohol y un gas orgánico. Entre los alcoholes que pueden usarse para la cromatografía quiral se pueden mencionar, sin implicar ninguna limitación, isopropanol, etanol y metanol. En una realización, el alcohol usado para la cromatografía quiral es metanol.

Entre los gases orgánicos que se pueden usar para la cromatografía quiral se pueden mencionar, sin implicar ninguna limitación, los gases orgánicos que se pueden usar a alta presión. Un gas orgánico usado preferentemente es CO_2. En una realización, la fase móvil usada para la cromatografía quiral comprende una mezcla de metanol y CO_2. En una realización de la invención, la fase móvil usada para la cromatografía quiral comprende una mezcla de metanol y CO_2 en una relación que varía de 50:50 a 2:98.

En una realización de la invención, la fase móvil usada para la cromatografía quiral se recicla. En una realización de la invención, la cromatografía quiral se realiza a una temperatura de 15 ºC a 40 ºC inclusive. En una realización de la invención, la resolución óptica se lleva a cabo en una mezcla racémica de 1:1 de fórmula (I). En una realización de la invención, se usa el enantiómero (R) de 1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato. De acuerdo con una realización de la invención, se usa el enantiómero (S) de 1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato.

De acuerdo con una realización de la invención, se usa un proceso continuo de separación de múltiples columnas.

De acuerdo con otra realización de la invención, se usa un proceso de cromatografía de lecho móvil simulado. Se entiende por cromatografía de lecho móvil simulado un proceso de cromatografía continua que permite simular el

movimiento de la fase estacionaria en la dirección opuesta al movimiento de la fase móvil. Tal proceso hace posible separar compuestos que son difíciles o imposibles de separar mediante técnicas de cromatografía convencionales. Cuando se usa una fase estacionaria quiral, tal proceso es especialmente útil para la separación de enantiómeros. El uso de la cromatografía de lecho móvil simulada permite llevar a cabo la resolución continua de una mezcla de enantiómeros con alta productividad, al tiempo que reduce la cantidad de fases estacionarias y móviles utilizadas en comparación con los procesos de cromatografía discontinua.

Lista de abreviaturas usadas

DMF: dimetilformamida

TEA: Trietilamina

TA: Temperatura ambiente

IPM.: Mostaza de isofosforamida

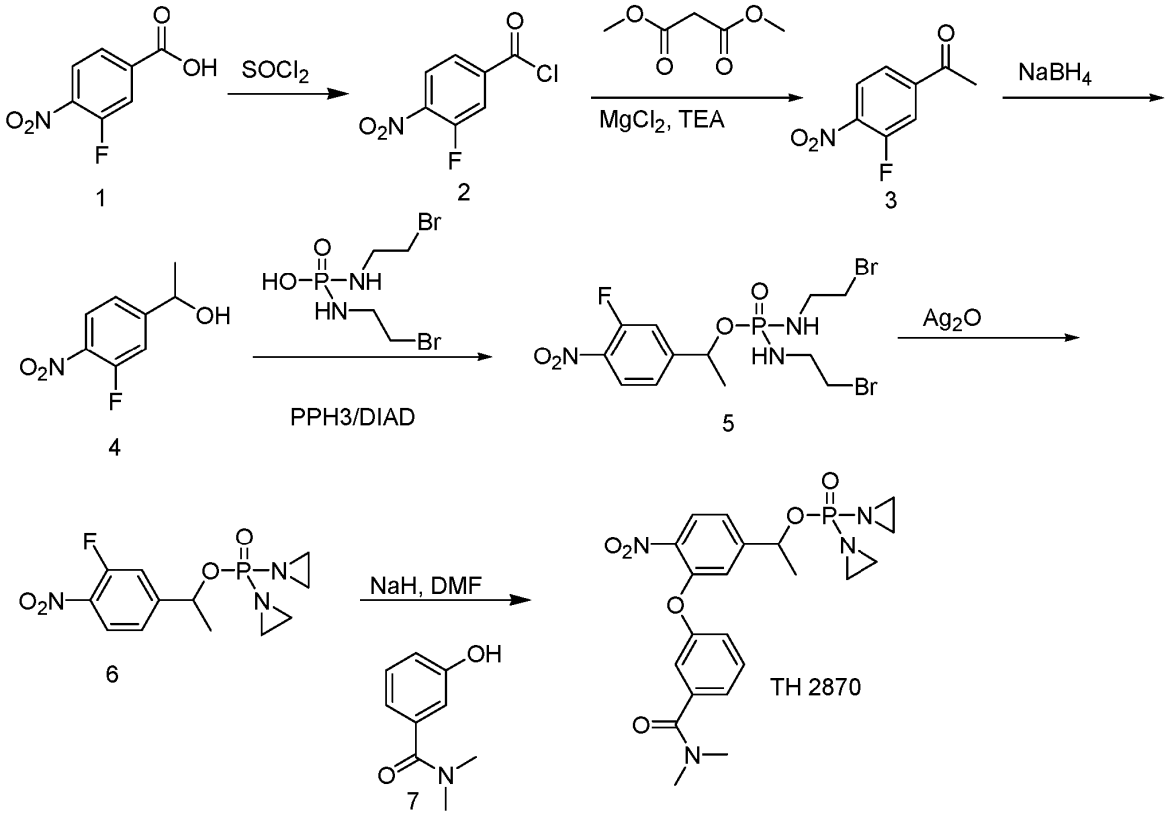
THF: tetrahidrofurano

DIAD: Azodicarboxilato de diisopropilo

Los Ejemplos a continuación en el presente documento ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación del compuesto TH 2870.



Los compuestos 2-6 se sintetizaron como se describe a continuación.

a. Síntesis del compuesto 3:

El compuesto **1** (3 g, 16,2 mmol) se calentó a reflujo en $SOCl_2$ (10 ml) con DMF (3 gotas) durante 3 h y después se retiró $SOCl_2$ al vacío. El residuo se diluyó con tolueno (5 ml) y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una mezcla de $MgCl_2$ (930 mg, 9,8 mmol), TEA (4,7 ml, 33,4 mmol) y malonato de dimetilo (1,9 ml, 16,6 mmol) se

agitó a TA durante 1,5 h seguido de la adición de la solución de tolueno anteriormente mencionada del compuesto 2. La mezcla resultante se agitó a TA durante 1,5 h más, después se añadió HCl conc. (4 ml) y se agitó durante 5 minutos. La mezcla se extrajo con EtOAc (30 ml x 3), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida. Al residuo se le añadió HCl 6 N (30 ml y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla se extrajo con EtOAc (30 ml x 3), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó a través de FCC (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para proporcionar el compuesto 3 en forma de un sólido de color amarillo claro (1,9 g, rendimiento del 63 %).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (t, d = 9,2 Hz, 2H), 2,68 (s, 3H) ppm.

*b. Síntesis del compuesto **4***

A una mezcla del compuesto **3** (1,9 g, 10,4 mmol) en MeOH (20 ml) a -10 ºC se le añadió $NaBH_4$ (418 mg, 11 mmol) en porciones. La mezcla se agitó entre -10 ºC a 0 ºC durante 20 minutos, se diluyó con EtOAc (300 ml), se lavó con una solución acuosa, sat. de NH_4Cl, salmuera, se secó (Na_2SO_4). Se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó a través de FCC (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para proporcionar el compuesto 4 en forma de un aceite de color amarillo claro (1,44 g, rendimiento del 75 %).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,06 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 7,30 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,01-4,99 (m, 1H), 1,52 (d, J = 6,4 Hz, 3H) ppm.

*c. Síntesis del compuesto **5***

A una mezcla del compuesto **4** (1,44 g, 7,78 mmol), Br-IPM (2,88 g, 9,34 mmol), PPh_3 (3,06 g, 11,67 mmol) en THF (60 ml) a 0 ºC se le añadió DIAD (2,34 g, 11,67 mmol). La mezcla se agitó a 0 ºC durante 1,5 h, se concentró a presión reducida y se purificó a través de FCC (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para proporcionar el compuesto 5 en forma de un aceite de color amarillo claro (1,0 g, rendimiento del 27 %).

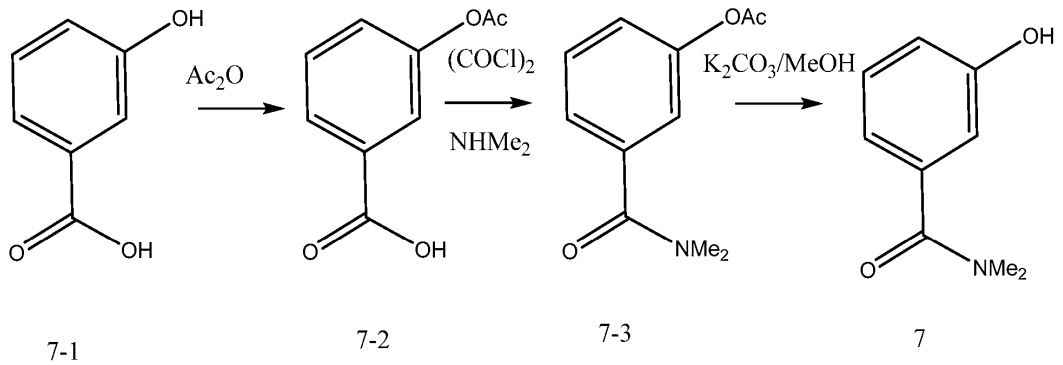
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,09 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 8,31 (dd, *J* = 2,4, 13,6 Hz, 2H), 5,52-5,60 (m, 1H), 3,54-3,19 (m, 8H), 1,63 (d, J = 6,4 Hz, 3H) ppm.

*d. Síntesis del compuesto **6***

Una mezcla del compuesto **5** (1 g, 2,1 mmol) y Ag_2O (3 g) en THF (50 ml) se agitó a 65 ºC durante 3 h. Se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó a través de FCC (gel de sílice, Acetona/Hexano) para proporcionar el compuesto 6 en forma de un sólido de color amarillo (0,6 g, rendimiento del 90 %).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,08 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,36 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,70-5,67 (m, 1H), 2,25-2,08 (m, 8H), 1,64 (d, J = 6,4 Hz, 3H) ppm.

e. Preparación del compuesto 7



7-1 7-2 7-3 7

Preparación del compuesto 7-2

Se añadió gota a gota Ac_2O (562 ml, 1,5 equiv.) a una solución del compuesto 7-1 (150 g, 1,08 mol) en piridina (700 ml) a 0 ºC, se agitó a t.a. durante 6 h. Se evaporó, se vertió en agua enfriada con hielo, se filtró, la torta de filtro se secó para dar el compuesto 7-2 en forma de un sólido de color blanco (150 g, rendimiento del 74 %).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 8,00~7,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,51~7,47 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,36-7,34 (dd, J = 8,0 Hz 1,2 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H).

Preparación del compuesto 7-3

A una solución del compuesto 7-2 (150 g, 833 mmol) en DCM (1500 ml), se le añadió DMF (15 ml), se enfrió hasta 0 ºC seguido de la adición de cloruro de oxailo (225 ml, 2,50 mol), se agitó a t.a. durante 4 h. Se evaporó, el residuo se disolvió en DCM (1000 ml), se enfrió hasta 0 ºC seguido de la adición de una solución 2 M de dimetilamina en THF (900 ml, 1,8 mol), se agitó a t.a. durante 20 h. Se inactivó con H_2O (1500 ml), se extrajo con DCM (2000 ml x 3), se evaporó para dar el compuesto 7-3 en bruto en forma de un líquido amarillo pálido (137 g, rendimiento del 80 %). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 7,43~7,39 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,29-7,28 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,17-7,13 (m, 2H), 3,00 (s, 6H), 2,32 (s, 3H).

Preparación del compuesto 7

A una solución de compuesto 7-3 (137 g, 661 mmol) en MeOH (1000 ml), se le añadió K_2CO_3 (276 g, 2 mol), se agitó a t.a. durante 5 h. Se filtró, el filtrado se evaporó. El residuo se disolvió en H_2O (1000 ml), se acidificó mediante HCl 4 N a pH 6,0, se filtró, la torta de filtro se secó para dar el compuesto 7 en forma de un sólido de color blanco (60 g, rendimiento del 55 %).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 8,25 (s, 1H), 7,19~7,15 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,96~6,95 (t, J = 2,0 Hz, 1H), 6,84~6,81 (s, 2H), 3,11 (s, 3H), 2,96 (s, 3H).

f. Síntesis de TH 2870

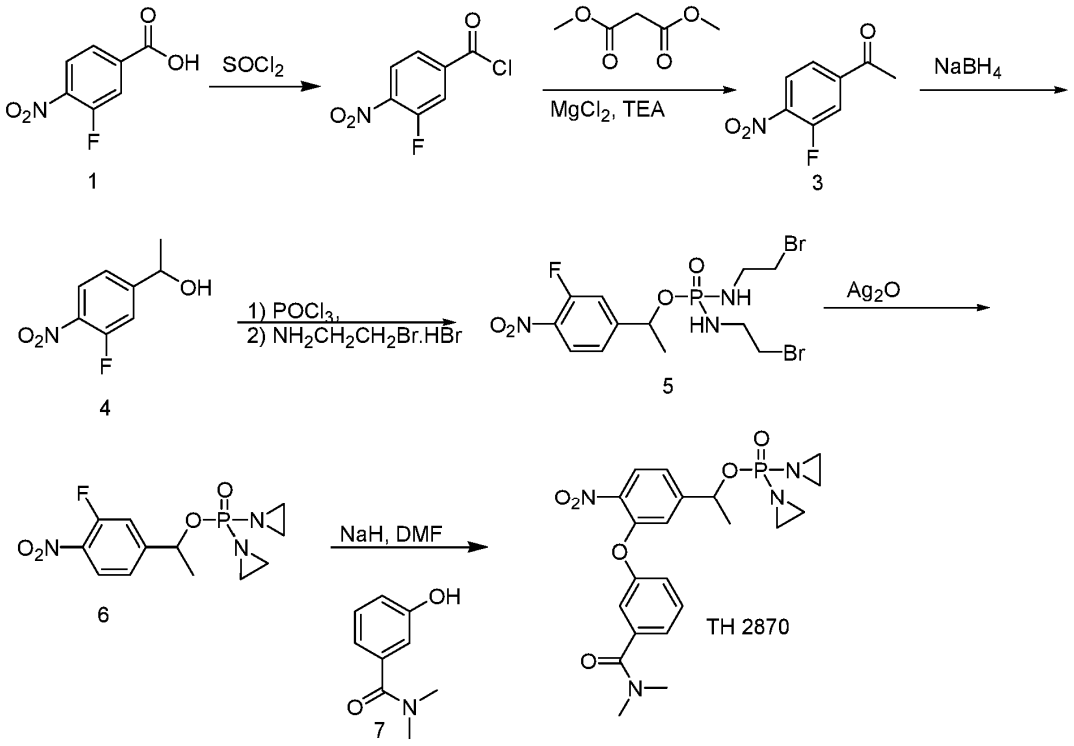
A una mezcla del compuesto 7 en DMF (60 ml) a 0 ºC, se le añadió NaH (60 %, 0,508 g, 12,7 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a 0 ºC durante 0,5 h antes de añadirse el compuesto 6 (2 g, 6,35 mmol) y después se agitó a 0 ºC durante 2,5 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (500 ml), se lavó con salmuera (50 ml x 3), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró, se concentró a presión reducida y se purificó a través de FCC (gel de sílice, Acetona/Hexano) para proporcionar TH 2870 en forma de un aceite de color amarillo.

Purificación final del TH 2870:

El 2870 como se ha mencionado anteriormente se purificó a través de HPLC semi-prep. (columna C18, acetonitrilo/agua). Las colecciones combinadas se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo claro como producto final. Se añadió acetonitrilo a las evaporaciones como un agente azeótropo para retirar el agua.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 7,98-7,96(d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,43-7,39 (m, 1H), 7,27-7,21 (m, 2H), 7,10-7,06 (m, 3H), 5,62-5,55 (m, 1H), 3,09 (s, 3H), 2,97 (s, 3H), 2,19-2,00 (m, 8H), 1,58-1,57 (d, J = 6,4 Hz, 3H). EM: m/z 460,8[M+1]+. PLC: 254 nm: 94,8 %.

Ejemplo 2. Preparación alternativa del compuesto TH 2870.



a. Preparación del compuesto 3

El compuesto 1 (200 g, 1,08 mol) se calentó a reflujo en $SOCl_2$ (700 ml) con DMF (10 ml) durante 3 h y después se retiró $SOCl_2$ al vacío. El residuo se diluyó con tolueno (400 ml) y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una mezcla de $MgCl_2$ (103 g, 1,08 mol), TEA (500 ml, 3,60 mol) y malonato de dimetilo (145 g, 1,1 mol) se agitó a TA durante 1,5 h antes de añadirse gota a gota la solución de tolueno mencionada anteriormente del compuesto 2. La mezcla resultante se agitó a TA durante 1,5 h más. Se lavó con H_2O (2 l), se extrajo con EtOAc (2 l x 5), se evaporó, se añadió HCl 4 N hasta pH 6,0 y se agitó durante 5 minutos. La mezcla se extrajo con EtOAc (2 l x 5), se evaporó.

Al residuo se le añadió HCl 6 N (1500 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche.

La mezcla se extrajo con EtOAc (2 l x 5), se concentró, se purificó por columna sobre gel de sílice (éter de petróleo: EtOAc=20:1) para dar el compuesto 3 en forma de un sólido de color amarillo (80 g, rendimiento del 41 %).

b. Preparación del compuesto 4

A una mezcla del compuesto 3 (150 g, 824 mol) en MeOH (2 l) a -10 ºC, se le añadió en porciones $NaBH_4$ (31,2 g, 824 mmol). La mezcla se agitó entre -10 ºC a 0 ºC durante 20 minutos, se diluyó con EtOAc (5 l), se lavó con una solución acuosa, sat. de NH_4Cl, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4, se concentró. El residuo se purificó por columna sobre gel de sílice (éter de petróleo: EtOAc=5:1) para dar el compuesto 4 en forma de un aceite de color amarillo (90 g, rendimiento del 60 %).

c. Preparación del compuesto 5

A una solución de $POCl_3$ (2 ml, 21,6 mmol) en DCM (20 ml) se le añadió el compuesto 4 (2 g, 10,8 mmol), después se añadió TEA (3,6 ml, 27 mmol) en DCM (10 ml) a -40 ºC en atmósfera de N_2, se agitó a -40 ºC durante 5 h. Después se añadió bromhidrato de 2-bromoetilamina (17,6 g, 86,8 mmol), se añadió lentamente TEA (12 ml, 86,8 mmol) en DCM (40 ml) en la solución anterior a -40 C, se agitó durante 0,5 h. Se añadió K_2CO_3 (10 %, 10,4 g, 100 ml), se agitó a t.a. durante 5 min. Se extrajo con DCM (300 ml x 3), se evaporó, se purificó por columna sobre gel de sílice (EtOAc) para dar el compuesto 5 en forma de un aceite de color amarillo (2,3 g, rendimiento del 43 %).

d. Preparación del compuesto 6

Una mezcla del compuesto 5 (4 g, 8,42 mmol) y Ag_2O (5,85 g, 25,26 mmol) en THF (40 ml) se agitó a 65 ºC durante 3 h, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por columna sobre gel de sílice (EtOAc) para dar el compuesto 6 en forma de un aceite de color amarillo (2,3 g, rendimiento del 87 %).

e. Preparación del compuesto TH2870

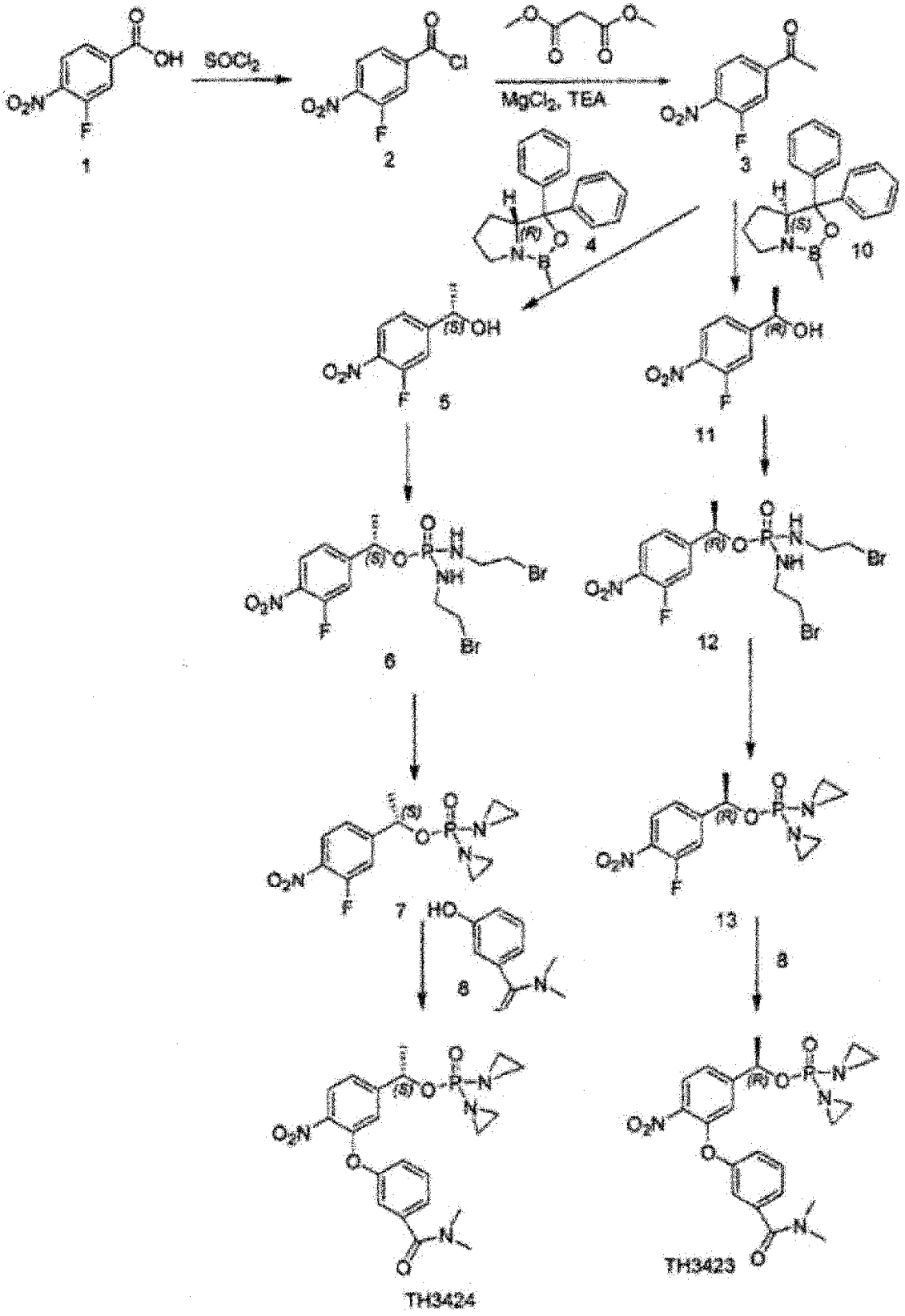
A una solución del compuesto 7 (1,81 g, 10,95 mmol) en DMF(10 ml), se le añadió NaH (60 %, 438 mg, 1095 mmol) a 0 ºC, se agitó durante 10 min, después se añadió el compuesto 6 (2,3, 7,3 mmol) en DMF(10 ml), se agitó a 0 ºC durante 30 min.

Se inactivó con H_2O, se extrajo con EtOAc (100 ml x 5), se lavó con H_2O (150 ml) y salmuera, se evaporó, se purificó por columna sobre gel de sílice (DCM:MeOH=40:1) para dar el compuesto TH2870 en forma de un aceite de color amarillo (2,3 g, rendimiento del 69 %).

Ejemplo. 3. Separación de los enantiómeros de TH2870 por cromatografía quiral preparativa

Disolver 983 mg del compuesto de fórmula (I) en 36 ml de metanol, inyectar 1 ml en un CHIRALPAK OZ-H 4,6x250 mm, 5 µm (Daicel) en una estación de método SFC-80 (Thar, Waters), a un caudal de 3,0 ml/min y una contrapresión de 12 MPa (120 bar) a una temperatura de columna de 35-40 ºC y eluir a ese caudal en una mezcla de CO_2/Metanol (65-60/35-40). El enantiómero de fórmula (Ia) (configuración (R)) se obtiene en un rendimiento del 86,5 % y con una pureza enantiomérica del 100 %. El enantiómero de fórmula (Ib) (configuración (S)) se obtiene en un rendimiento del 83,8 % y con una pureza enantiomérica del 100 %. La Fig. 1 muestra un control de pureza del enantiómero 1 TH 2870 (TH 3423) y el enantiómero 2 THE 2870 (TH 3424 o AST 106) después de la separación quiral por CLEM.

Síntesis quiral de TH 3423 y 3424



Compuesto 2

El compuesto 1 (65 g) se calentó a reflujo en $SOCl_2$ (150 ml) con DMF (2,5 ml) durante 5 h para conseguir una solución transparente y después el $SOCl_2$ se retiró al vacío. El residuo se diluyó con tolueno (30 ml) y los disolventes

se retiraron de nuevo. El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Compuesto 3

Una mezcla de $MgCl_2$ (21,0 g, 221 mmol), TEA (100,0 ml, 717 mmol) y malonato de dimetilo (41,0 ml, 359 mmol) se agitó con un agitador mecánico a TA durante 2 h, antes de añadirse el compuesto 2 en THF (80 ml). La mezcla resultante se agitó a TA durante 4 h antes de añadirse HCl conc. (90 ml) y se agitó durante 30 minutos. La mezcla se extrajo con EtOAc (300 ml x 3), se concentró a presión reducida. Al residuo se le añadió HCl 6 N (300 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante una noche. La mezcla se extrajo con EtOAc (300 ml x 3), la capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ (ac.) y se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se volvió a cristalizar en AcOEt/Hex=1/3(V/V) para proporcionar el compuesto 3 en forma de un sólido de color amarillo claro (46 g). RMN ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,16 (d, 1H), 7,86 (t, 2H), 2,68 (s, 3H)

Compuesto 5:

En una atmósfera de argón, se añadió BH_3.THF(1 M, 11 ml) a una solución del compuesto 4 en tolueno 1 M (3 ml, 3 mmol) a 0 ºC. La solución se agitó durante 30 min, después se enfrió hasta - 40 ºC. Se añadió lentamente una solución del compuesto 3 (1,83 g, 10 mmol) en THF (40 ml) durante 4 h a -40 ºC. El sistema se agitó a -40 ºC durante 2 h (la TLC mostró que desapareció SM). Se añadió MeOH (20 ml) a aproximadamente la solución a -40 ºC y la solución se agitó durante 30 min. Después de que los disolventes se retiraron a ta y el residuo se purificó por columna (Hex/AcOEt = 3/1 (V/V)) para conseguir el compuesto 5 (1,6 g).

RMN ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,05 (t, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 4,99 (m,1H), 1,51 (d, 3H).

Compuesto 6

A una solución de $POCl_3$ (1,6 ml, 17,25 mmol) en DCM (10 ml) a -40 ºC en argón, se le añadió el compuesto 5 (1,6 g, 8,65 mmol), después TEA (2,9 ml, 22,9 mmol) en 10 ml de DCM. La mezcla se agitó a -40 ºC durante 6 h y después se añadió bromhidrato de 2-bromoetilamina (14,2 g, 69,3 mmol), se añadió gota a gota TEA (9,6 ml) en DCM (10 ml). La mezcla de reacción se agitó de -40 ºC a ta durante una noche. Se añadió K_2CO_3 (8,3 g en 80 ml de agua) y la mezcla se agitó durante 5 min. La mezcla se extrajo con DCM, se secó sobre Na_2SO_4. Se filtró, se concentró y después se sometió a cromatografía ultrarrápida de gel de sílice, eluyendo con Acetona/Hexano = 0-100 %) para proporcionar el compuesto 6 en forma de un aceite de color amarillo (2,68 g, rendimiento: 65 %).

RMN ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,08 (t, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 5,56 (m, 1H), 3,34-3,56 (m, 2H), 3,32-3,42 (m, 4H), 3,08-3,26 (m, 4H), 1,62 (d, 3H). RMN 31P: 14,44.

Como alternativa, el TH3424 puede sintetizarse mediante el siguiente procedimiento:

Se añadió tolueno (11 ml/g) a una botella de vidrio de cuatro bocas en una atmósfera de nitrógeno. Según se inició la agitación, se añadió POCl3 (1,025 equiv.) al recipiente 1 en una atmósfera de nitrógeno. Los contenidos del recipiente 1 se enfriaron hasta -2~2 ºC. La solución del compuesto 1 se añadió (1,0 equiv.)y and TEA (1,435 equiv.) en tolueno (11 ml/g) gota a gota a -2~2 ºC. Los contenidos del recipiente 1 se agitaron a -2~2 ºC durante 1~2horas. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC para información. Se añadió bromhidrato de 2-bromoetilamina (3 equiv.) al recipiente 1. Se añadió gota a gotas TEA (6 equiv.) al recipiente 1 a -2~2 ºC. Los contenidos del recipiente 1 se agitaron a 0 ºC~TA durante una noche. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC. El procedimiento de trabajo fue como sigue a continuación: Se añadió H2O(19 ml/g) sal recipiente 1 y se agitó durante 5~10 min. La mezcla se extrajo con EA (19 ml/g) tres veces. La fase orgánica se secó sobre Na2SO4 y se filtró. Las aguas madre se concentraron a 40~50 ºC. El producto en bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice para conseguir el producto purificado.

Como alternativa, el TH3424 puede sintetizarse mediante el siguiente procedimiento:

Se añadió tolueno (11 ml/g) a una botella de vidrio de cuatro bocas en una atmósfera de nitrógeno. Se inició la agitación y se añadieron el compuesto 1 (1,0 equiv.) y TEA (1,435 equiv.) al recipiente 1 en nitrógeno. Los contenidos del recipiente 1 se enfriaron hasta -2~2 ºC. Se añadió gota a gota POCl3 (1,025 equiv.) al recipiente 1 en nitrógeno a -2~2 ºC. Los contenidos del recipiente 1 se agitaron a -2~2 ºC durante 1~2horas. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC para información. Se añadió bromhidrato de 2-bromoetilamina (3 equiv.) al recipiente 1. Se añadió gota a gota TEA (6 equiv.) al recipiente 1 a -2~2 ºC. Los contenidos del recipiente 1 se agitaron a 0 ºC~TA durante una noche. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC. El procedimiento de trabajo fue el mismo que el anterior.

Como alternativa, el TH3424 puede sintetizarse mediante el siguiente procedimiento:

Se añadieron DCM (2,2 ml/g) y POCl3 (1,91equiv.) a una botella de vidrio de cuatro cuellos en nitrógeno. Se inició la agitación y los contenidos del recipiente 1 se enfriaron a -35~-40 ºC en nitrógeno. Se añadió gota a gota la solución

del compuesto 1 (1,0 equiv.)/DCM (4,5 g/ml) al recipiente 1 en nitrógeno a -35~-40 ºC. Se añadió gota a gota la solución de TEA (4,0 equiv.)/DCM (4,5 g/ml) al recipiente 1 en nitrógeno a -35—40 ºC. Los contenidos del recipiente 1 se agitaron a -35~-40 ºC durante 4~6 horas. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC para información. Se añadió bromhidrato de 2-bromoetilamina (8 equiv.) al recipiente 1 a -30~-40 ºC. Se añadió gota a gota TEA(12 equiv.) al recipiente 1 a -30~-40 ºC. Los contenidos 1 se agitaron a - 30~-40 ºC durante 1-2 h. Los contenidos se muestrearon para análisis por HPLC. Procedimiento de trabajo: Se añadió H2O (15 ml/g) al recipiente 1 y se agitó durante 5~10 min. La fase acuosa se extrajo con DCM (12,5 ml/g) una vez. La fase orgánica se secó sobre Na2SO4 y se filtró. El filtrado se concentró a 20~30 ºC. El producto en bruto se purificó por cromatografía para conseguir el producto purificado.

Compuesto 7

Una mezcla del compuesto 6 (2,68 g), Ag_2O (3,92 g), en THF (30 ml) se agitó a 55 ºC durante una noche. Después de la retirada del disolvente al vacío, el residuo se separó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice para producir 1,0 g de líquido claro del compuesto 7.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,05 (t, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 5,66 (m,1H), 2,02-2,24 (m, 8H), 1,61 (d, 3H). RMN 31P: 31,55.

TH 3424 (TH 2870 enantiómero 2)

Una mezcla del compuesto 7 (1,0 g), compuesto 8 (785 mg), K_2CO_3 (880 mg) en DMF (8 ml) se agitó a ta durante una noche. La mezcla se diluyó con agua, se extrajo con DCM, se secó sobre Na_2SO_4. Se filtró, se concentró y después cromatografía ultrarrápida para proporcionar el compuesto 9 en forma de un aceite de color amarillo (1,1 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 7,97 (d, 1H), 7,41 (t,1H), 718-7,27 (m, 4H), 7,02-7,12 (m, 3H), 5,59 (m,1H), 3,08 (s, 3H), 2,97 (s, 3H), 2,01-2,21 (m, 8H), 1,66 (d, 3H). RMN 31P: 31,27.

Compuesto 11

Mismo procedimiento con compuesto 5. El compuesto 8 se usó en lugar del compuesto 3. Rendimiento: 50 %

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,05 (t, 1H), 7,34 (dd, 1H), 7,27 (d, 1H), 4,99 (m,1H), 1,51 (d, 3H).

Compuesto 12

Mismo procedimiento con compuesto 6 (rendimiento: 35 %).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,08 (t, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 5,56 (m, 1H), 3,34-3,56 (m, 2H), 3,32-3,42 (m, 4H), 3,08-3,26 (m, 4H), 1,62 (d, 3H). RMN ^{31}P:14,47.

Compuesto 13

Mismo procedimiento con compuesto 7 (rendimiento: 36 %). RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 8,06 (t, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,30 (d, 1H), 5,67 (m,1H), 2,02-2,25 (m, 8H), 1,62 (d, 3H). RMN ^{31}P:31,56.

TH3423 (TH 2870 enantiómero 1)

Mismo procedimiento con compuesto 9 (rendimiento: 68 %). RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 7,97 (d, 1H), 7,41 (t, 1H), 718-7,27 (m, 4H), 7,02-7,12 (m, 3H), 5,59 (m,1H), 3,08 (s, 3H), 2,97 (s, 3H), 2,01-2,21 (m, 8H), 1,66 (d, 3H). RMN ^{31}P: 31,25.

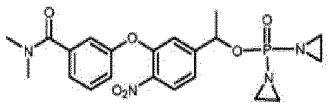
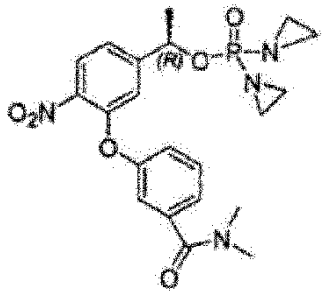
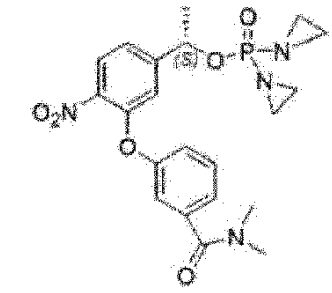
Ejemplo 4. Ensayo de citotoxicidad in vitro de líneas celulares tumorales humanas

En la tabla anterior de compuestos, se indican datos de proliferación *in vitro* sobre la línea celular de tumor humano H460 de cáncer de pulmón no microcítico. Los valores de CI_{50} se indican en micromolar y son el resultado de la exposición del compuesto a diversas concentraciones durante 2 horas seguido de una etapa de lavado y de adición de medios recientes seguido de tinción de crecimiento y viabilidad celular y comparación con un control tratado solo con medios.

Específicamente, en una placa de 96 pocillos se sembraron células de crecimiento exponencial a una densidad de 4 x 10^3 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37º C en CO_2 al 5 % y aire al 95 % y con una humedad relativa del 100 % antes de la adición de los compuestos de ensayo. Los compuestos se disolvieron en DMSO al 100 % a 200 veces la concentración de ensayo final deseada. En el momento de la adición de fármaco, los compuestos se diluyeron adicionalmente con medio completo hasta 4 veces la concentración final deseada. A pocillos de microtitulación que ya contenían 150 µl de medio, se añadieron alícuotas de 50 µl de compuesto a las

concentraciones especificadas, dando como resultado la concentración final de fármaco indicada. Después de la adición de fármaco, las placas se incubaron durante 2 horas más a 37º C, en CO_2 al 5 % y aire al 95 % y con una humedad relativa del 100 %, después, el fármaco se retiró con lavado y se añadió medio reciente y las placas se incubaron durante 70 horas más a 37°°C, en CO_2 al 5 % y aire al 95 % y con una humedad relativa del 100 %. Al final de esta incubación, las células viables se cuantificaron utilizando el ensayo AlamarBlue. Utilizando el programa informático Prism (Irvine, CA) se calculó la concentración de fármaco que producía una inhibición del crecimiento del 50 % (CI_{50}), y los resultados se indicaron en la tabla.

Su eficacia antiproliferativa sobre células de cáncer de pulmón H460 también se indica en la siguiente tabla.

Número de compuesto	*Estructura*	*CI 50 en ensayo de proliferación en células H460 (µM)*
TH 2870 *(racemato)*		0,005
TH3423		0,005
TH3424		0,004

Los datos anteriores en células H460, demuestran un efecto antitumoral sustancial con inhibición a niveles nanomolares bajos para diversos compuestos durante una exposición de solo 2 horas.

Ejemplo 5. Activación de TH 2870 por la aldoceto reductasa, AKR1C3

La AKR1C3 humana recombinante se diluyó a 25 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*), pH 7,4 (37°°C), que contenía NADPH 2 mM. A la mezcla de reacción se añadió TH2870 o progesterona (control positivo) en metanol al 30 %/agua al 70 % a una concentración final de 5 µM y se incubó a 37º C durante 120 minutos. A diversos momentos hasta 120 min, se tomaron 50 µl de la mezcla de reacción y como patrón interno se añadieron 200 µl de acetonitrilo que contenía propranolol, se mezclaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 min. El sobrenadante resultante (5 µl) se inyectó en una LC/MS/MS (cromatografía de líquidos con espectrometría de masas) para cuantificar el % de TH 2870 y de progesterona restante. Los compuestos se analizaron por duplicado.

Los datos de la figura 2 demuestran la rápida desaparición de TH 2870 en presencia de AKR1C3 mientras que el sustrato conocido, la progesterona, se reduce lentamente. Los controles de tampón que contienen NADPH, pero no enzima, no mostraron reacción con ninguno de los compuestos (datos no mostrados).

Ejemplo 6. Ensayo de citotoxicidad in vitro de líneas celulares tumorales humanas

Utilizando los materiales y procedimientos indicados más adelante, también se analizaron TH 2870, TH 3423 y TH 3424, en diferentes líneas celulares de cáncer. Se utilizó tampón de lisado celular 10* (cell signaling technology, Cat. N.º 9803); cóctel inhibidor de proteasa para tejidos de mamífero (Sigma, Cat. N.º P8340); cócteles inhibidores de fosfatasa para serina/treonina fosfatasas y L-isozimas de fosfatasas alcalinas (Sigma, Cat. N.º P0044); cócteles inhibidores de fosfatasa para proteína tirosina fosfatasas, fosfatasas ácidas y alcalinas (Sigma, Cat. N.º P5726); kit

BCA kit (Thermo, Cat. N.º 23225); anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón AKR1C3 (clon NP6.G6.A6; Sigma-Aldrich; anticuerpo primario, α-tubulina (clon B-5-1-2; Sigma-Aldrich); anticuerpo secundario, IgG de cabra-anti-ratón conjugado con HRP (A4416; Sigma-Aldrich). Las células se sometieron a pases de dos generaciones en buen estado y sometieron a digestión. El número apropiado de células se inoculó en placas de cultivo celular de 6 cm, y se incubaron a 37º°C, con CO2 al 5 % durante una noche. Cuando las células crecieron a una densidad de 80 %, las placas se sacaron de la incubadora. El medio se aspiró, se lavó dos veces con PBS enfriado en hielo y se eliminó el PBS residual. Se añadió un volumen apropiado de lisado celular 1* enfriado en hielo y se incubó en hielo durante 10 minutos. El lisado celular se transfirió a tubos de microcentrífuga enfriados en hielo, a una temperatura de 4º°C, a 12 000 rpm y se centrifugó durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga. Los lisados celulares se diluyeron con un lisado celular 10* y se añadió cóctel inhibidor de proteasa para tejidos de mamífero (Sigma, n.º P8340), cócteles inhibidores de fosfatasa para serina/treonina fosfatasas y L-isozimas de fosfatasas alcalinas, cócteles inhibidores de fosfatasa para proteína tirosina fosfatasas, fosfatasas ácidas y alcalinas. El kit de cuantificación de proteínas BCA para la cuantificación de proteínas se usó con lisado celular 1* para diluir el lisado celular a la misma concentración. Las muestras correspondientes se añadieron en tampón de carga de SDS 5*, se calentaron a 85º C durante 10 minutos y se centrifugaron durante poco tiempo. Las muestras se guardaron a -20º°C o se usaron directamente para la electroforesis de proteínas. Las muestras se guardaron a -20º°C o se usaron directamente para la electroforesis de proteínas. Esas muestras se sometieron a electroforesis de acuerdo con la práctica estándar, se transfirieron a una membrana, se aplicaron anticuerpos primarios y después anticuerpos secundarios de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para explorar las señales, se utilizó el sistema de obtención de imágenes láser infrarrojo Odyssey.

Los resultados se muestran más adelante en las figuras 3 y 4 y se indican en las siguientes tablas:

Tabla: Sensibilidad de TH 2870, TH 3423 y TH 3424 en líneas celulares de cáncer de hígado, próstata, esófago y leucemia

Línea celular de cáncer de hígado	*ID del compuesto*	% de *inhibición mínima*	% de *inhibición máxima*	*Lib CI50 (µM)*	*CI50 (µM) Abs*
HepG2	TH3424	3,4	100,2	0,0073	0,0086
HepG2	TH3423	-7,2	99,5	0,0131	0,0187
HepG2	TH2870	3,3	98,9	0,0055	0,0064
C3A	TH3424	-2,1	98,7	0,0041	0,0093
C3A	TH3423	5,4	98,5	0,0096	0,0117
C3A	TH2870	8,1	98,1	0,0071	0,0062
HCCC9810	TH3424	2,1	95,4	0,0134	0,0139
HCCC9810	TH3423	0,0	93,7	0,0168	0,0187
HCCC9810	TH2870	-2,6	95,4	0,0292	0,0294
PLCPRF5	TH3424	1,4	85,2	0,1279	0,1107
PLCPRF5	TH3423	-4,9	77,7	0,1556	0,2066
PLCPRF5	TH2870	-1,7	53,3	0,4745	0,5750
SNU-387	TH3424	-14,8	99,3	0,0587	0,0701
SNU-387	TH3423	1,3	99,8	0,0463	0,0397
SNU-387	TH2870	1,7	102,8	0,0422	0,0340
LIXC012	TH3424	4,1	82,8	0,0112	0,0175
LIXC012	TH3423	-1,1	84,8	0,0081	0,0169
LIXC-012	TH2870	6,6	87,1	0,0274	0,0187
Vcap_TH3424	Vcap_TH3424	-13,2	101,4	0,0132	0,0148
Vcap	TH3423	1,1	101,0	0,0266	0,0216
Vcap	TH2870	-3,4	100,2	0,0227	0,0152
TE-11	TH3424			0,0027	

(continuación)

Línea celular de cáncer de hígado	*ID del compuesto*	% de *inhibición mínima*	% de *inhibición máxima*	*Lib CI50 (μM)*	*CI50 (μM) Abs*
TE-14	TH3424			0,0047	
OE 21	TH3424			0,0052	
T.T	TH3424			0,006	
TE-6	TH3424			0,021	
TE-9	TH3424			0,011	
ECa-109	TH3424			0,017	
KYSE	TH3424			0,011	
TE-4	TH3424			0,0099	
TE-8	TH3424			0,019	
TE-15	TH3424			0,0029	
COLO680N	TH3424			0,066	
EC-GI-10	TH3424			0,013	
KYSE 70	TH3424			0,033	
TE-5	TH3424			0,033	
OE 33	TH3424			0,084	
KYSE 510	TH3424			0,18	
KYSE 270	TH3424			0,27	
KYSE 180	TH3424			0,45	
CCRF-CEM	TH3424			0,0037	
MOLT-4	TH3424			0,010	
PF-382	TH3424			0,015	
SUP-T1	TH3424			0,003	
TALL-1	TH3424			0,03	
Jurkat	TH3424			0,04	
Jurkat, Clon E6-1	TH3424			0,024	
NOMO-1	TH3424			0,011	
P116	TH3424			0,084	
P30/OHK	TH3424			>1	
GR-ST	TH3424			0,099	
KG-1	TH3424			0,0153	
TF-1	TH3424			0,028	
HEL	TH3424			0,224	
Reh 3	TH3424			0,003	
HL-60	TH3424			0,003	
Clon HL-60	TH3424			0,0526	
K-562	TH3424			>1,0	

(continuación)

Línea celular de cáncer de hígado	*ID del compuesto*	% de *inhibición mínima*	% de *inhibición máxima*	*Lib CI50 (µM)*	*CI50 (µM) Abs*
ATN-1	TH3424			0,0298	
Mono-Mac-6_	TH3424			>1,0	
THP-1_	TH3424			>1,0	

Ejemplo 7. Modelos de xenoinjerto tumoral humano in vivo y actividad antitumoral

Para demostrar la eficacia de los compuestos proporcionados en el presente documento, se utilizaron tres modelos antitumorales de xenoinjerto humano que utilizan los modelos H460 de pulmón no microcítico, A549 de pulmón no microcítico y A375 de melanoma.

Se utilizaron ratones hembra lampiñas homocigotas sin patógenos específicos (nu/nu, Charles River Laboratories). Los ratones recibieron comida y agua a voluntad y se instalaron en jaulas con microaislantes. En el momento de los experimentos, se identificaron animales de cuatro a seis semanas de vida mediante microplacas (Locus Technology, Manchester, MD, Estados Unidos). Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en Threshold Pharmaceuticals, Inc.

Todas las líneas celulares procedían de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, Estados Unidos). Las células se cultivaron en el medio sugerido con suero bovino fetal al 10 % y se mantuvieron en un entorno húmedo con CO_2 al 5 % a una temperatura de 37º C.

Las células se mezclaron con Matrigel (30 % en H460) y se implantaron por vía subcutánea 0,2 ml por ratón en el costado de los animales. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 100-150 mm^3, los ratones se asignaron al azar en grupos tratados con los compuestos de experimentación o con vehículo a razón de 10 ratonas/grupo y se inició el tratamiento (Día 1). Los compuestos analizados se formularon en DMSO al 5 % en D5W. Todos los compuestos se suministraron por vía IP, siguiendo un ciclo de CDx5/semana (5 días de administración, 2 días de descanso), durante un total de 2 ciclos. El crecimiento tumoral y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó como (longitud x anchura^2)/2. La eficacia del fármaco se evaluó como inhibición del crecimiento tumoral (ICT) y retraso del crecimiento tumoral (RCT). La ICT se definió como (1-ΔT/ΔC) x 100, en donde ΔT/ΔC presentó la relación del cambio en el volumen tumoral medio (o mediana, si la variación dentro del grupo era relativamente grande) del grupo tratado y del grupo control. El RCT se calculó como días adicionales para que el tumor tratado alcanzara 500 mm^3 en comparación con el grupo de control. Los animales se sacrificaron cuando en el grupo, el tamaño tumoral individual alcanzó un valor por encima de 2 000 mm^3 o cuando el volumen tumoral medio superó 1 000 mm^3. Los datos se expresaron como la media ± EEM (error estándar de la media). Para el análisis se utilizó el análisis de varianza unidireccional con la prueba de comparación posterior de Dunnett (GraphPad Prism 4) o la prueba bilateral de la t de Student. Un nivel de *P* <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 8. Resultados de eficacia in vivo:

Este estudio empleó un modelo de xenoinjerto de tumor humano de melanoma A375 y los compuestos proporcionados en el presente documento se compararon con tiotepa y con el fármaco autorizado contra el melanoma, abraxane. Los efectos antitumorales y la seguridad de la administración se ilustran gráficamente a continuación. Mpk se refiere a mg/kg.

Grupo	Días hasta 500 mm^3	Días hasta 1 000 mm^3	RCT500, Días (frente a vehículo)	RCT1 000, Días (frente a vehículo)	ICT
Grupo 1: Vehículo, cdx5x2, ip	15	25			
Grupo 2:Tiotepa, 2,5 mpk, cdx5x2,ip	18	27	3	2	16,6 %
Grupo 4: Abraxane, 30 mpk, 2x/semx2,iv	24	35	9	10	47,4 %
Grupo 8: TH2870, 20 mpk, cdx5x2, ip			>13		98,0 %

Tomados en conjunto, estos estudios demuestran eficacia antitumoral significativa en 3 líneas celulares tumorales

diferentes en relación con la quimioterapia estándar.

Ejemplo 9. TH3424 en modelo de ratón de cáncer de hígado humano

En este estudio se utilizaron ratones hembra lampiñas, atímicas (de 6 semanas de vida). Los animales se adquirieron en Beijing HFK Bioscience, Co., Ltd y se mantuvieron en un ambiente filtrado con filtros de aire de partículas de alta eficacia (HEPA) con jaulas, comida y lecho esterilizados por irradiación o autoclave. En el estudio se utilizó un total de 32 ratones lampiños. Células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 marcadas con proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés *green fluorescent protein*) (AntiCancer, Inc., San Diego, CA), se incubaron con RPMI-1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc.), que contenía FBS al 10 %. Las células se hicieron crecer en una incubadora de CO_2 con camisa de agua (Forma Scientific) manteniendo una temperatura de 37°°C y una atmósfera de CO_2 al 5 %/aire al 95 %. La viabilidad celular se determinó mediante análisis de exclusión con azul de tripano. Cinco ratones hembra lampiñas, atímicas recibieron una inyección subcutánea de una sola dosis de 5 x 10^6 células HepG2 marcadas con GFP. Los tumores se extrajeron cuando su tamaño alcanzó 1 cm^3 y después, los tejidos tumorales se cortaron en pequeños fragmentos de 1 mm^3. Cuarenta ratones hembra lampiñas recibieron implante ortotópico de un solo trozo de fragmento tumoral, procedente de un modelo tumoral subcutáneo de carcinoma hepatocelular humano HepG2-GFP. El tejido tumoral se implantó de manera ortotópica en el lóbulo derecho del hígado de cada ratón mediante IOQ (Implantación Ortotópica Quirúrgica). En resumen, se realizó una incisión abdominal superior de 1 cm con anestesia. El lóbulo derecho del hígado se expuso y una parte de la superficie del hígado se lesionó mecánicamente con unas tijeras. Después, un trozo de fragmento tumoral se fijó en el interior del tejido hepático, el hígado volvió a la cavidad peritoneal y finalmente la pared abdominal se cerró. Los ratones se mantuvieron en cabinas de flujo laminar en condiciones sin patógenos específicos.

El tratamiento se inició tres días después de la implantación del tumor cuando los tumores implantados alcanzaron un tamaño promedio de aproximadamente 1 mm^2. Los 32 ratones portadores de tumor se dividieron al azar en cuatro grupos de experimentación de 8 ratones cada uno. Cada jaula estaba bien identificada con su grupo con cuatro ratones por jaula. Cada ratón tenía una marca identificativa en la oreja. La siguiente tabla muestra el diseño del estudio.

Tabla. Grupos y protocolo de tratamiento

Grupos (Agente)	Dosis	Volumen	Pauta de dosificación	Vía	Animal (n)
Solución salina (C)	0,9 %	200 µl	Cdx35	I.P.	8
Sorafenib (S)	30 mg/kg	100 µl	Cdx35	Sonda gástrica	8
TH3424	2,5 mg/kg	200 µl	CSx6	I.P.	8
TH3424	5 mg/kg	200 µl	CSx3	I.P.	8
Observación: El tratamiento comenzó el día 3 después de la implantación del tumor.					

Durante el período del estudio, todos los días se comprobaba la mortalidad o los signos de morbilidad de todos los ratones de experimentación. Los animales se observaron hasta el día 38 después de la implantación del tumor. Los pesos corporales de los ratones se midieron dos veces por semana durante el período de estudio y se obtuvieron imágenes del crecimiento y evolución tumoral dos veces por semana con el sistema de obtención de imágenes FluorVivo, Modelo 300/Mag (INDEC, CA, Estados Unidos). Todos los animales de experimentación se sacrificaron utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico inyectada el día 38 después de la implantación del tumor. Los hígados se expusieron para obtener imágenes, después de lo cual se extrajeron los tumores y se pesaron con una balanza electrónica (Sartorius BS 124 S, Alemania). Los tejidos tumorales se mantuvieron en formalina para su posterior análisis. Se analizaron las comparaciones de los pesos corporales y de las cargas tumorales en los diferentes grupos utilizando la prueba de la t de Student con un $\alpha = 0,05$ (bilateral). Después de la inyección intravenosa de los agentes de ensayo, los ratones no murieron ni redujeron su actividad autónoma. Generalmente, los animales de experimentación estaban en buenas condiciones. En la figura 5 y en la siguiente tabla se muestran los cambios del peso corporal de cada grupo.

Tabla. Comparación del peso corporal medio de los ratones al final del estudio

Grupos	*Día 0, Peso corporal (g) (media ± de)*	*Día 35, Peso corporal (g) (media ± de)*	*Tasa de crecimiento de peso corporal (%)*	*Valor de p*
SOLUCIÓN SALINA (C)	15,2 ± 0,9	20,4 ± 0,9	34	

(continuación)

Grupos	*Día 0, Peso corporal (g) (media ± de)*	*Día 35, Peso corporal (g) (media ± de)*	*Tasa de crecimiento de peso corporal (%)*	*Valor de p*
SORAFENIB (S)	15,1 ± 1,1	18,2 ± 0,8	21	P = 0,0032 frente a C
TH3424(2,5 mg/kg)	15,4 ± 0,6	21,7 ± 0,7	41	P = 0,7252 frente a C
TH3424(5 mg/kg)	14,8 ± 1,2	19,9 ± 1,3	34	P = 0,1740 frente a C P = 0,1869 frente a (TH3424 2,5 mg/kg)

Como se muestra en la figura 5 y en la tabla anterior, el día 35 del estudio, en cada grupo, el peso corporal promedio de los ratones se incrementó del 21 % al 41 %. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con TH2870-2 y el grupo de control negativo. Esto sugirió que, con la administración intraperitoneal de una dosis baja o alta de TH2870-2, no había toxicidad aguda evidente para los ratones de experimentación. Sin embargo, en el grupo tratado con sorafenib, el peso corporal promedio fue, de manera estadísticamente significativa, más bajo que el del grupo de control negativo. Esto sugirió que, con la administración de sorafenib a la dosificación ensayada, había un cierto grado de toxicidad para los ratones de experimentación.

Evolución tumoral en cada grupo.

Las evoluciones del carcinoma hepatocelular HepG2-GFP ortotópico en diferentes grupos, se controlaron mediante obtención de imágenes en tiempo real. Las imágenes se obtuvieron dos veces por semana. En las figuras 6 y 7 se muestran imágenes tumorales típicas al final del estudio en cada grupo y curvas de crecimiento tumoral procedentes de las señales de fluorescencia tumoral, que se analizaron utilizando el programa informático Power Station (INDEC Biosystems, CA, Estados Unidos), respectivamente

Tabla. Tamaño tumoral promedio en cada grupo (mm^2)

Grupos	*Área tumoral (mm^2) (media ± de)*	*Valor de p*
Solución salina (C)	13,5 ± 2,7	
Sorafenib (S)	8,2 ± 5,3	P = 0,0577 frente a C;
TH3424 (2,5 mg/kg)	1,2 ± 1,1 (día 35) 2,0 ± 2,2 (día 49)	P = 0,0000 frente a C; P = 0.0079 frente a S P = 0,1163 frente a TH3424 (2,5 mg/kg) (día 49)
TH3424 (5 mg/kg)	0,0 ± 0,0	P = 0,0000 frente a C; P = 0.0031 frente a S P = 0.0183 frente a TH3424 (2,5 mg/kg)

Como se muestra en las figuras 6 y 7 y en la tabla anterior, el tamaño tumoral promedio en el grupo de control positivo, fue aproximadamente un 39 % menor que en el grupo de control negativo, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos de control (P = 0,0577).

En los grupos tratados con TH3424 (2,5 mg/kg) y con TH3424 (5 mg/kg), las áreas de lectura promedio de imágenes de fluorescencia fueron, de manera estadísticamente significativa, menores que las del grupo de control negativo, lo que muestra fuertes efectos inhibidores y una evidente relación entre dosis y efecto. Entre ellos, el área de lectura de imágenes de fluorescencia fue de 0 en el grupo tratado con TH3424 (5 mg/kg). En este grupo, la dosificación se interrumpió después de 3 ciclos de tratamiento; la lectura de imágenes de fluorescencia tumoral seguía siendo de 0 hasta el final del experimento. sin embargo, en el grupo tratado con TH3424 (2,5 mg/kg), la administración del fármaco se detuvo durante 1 semana después de 3 ciclos de tratamiento y después se reiniciaron otros 3 ciclos de tratamiento. El área de lectura promedio de imágenes de fluorescencia el día 35 fue de 1,2 ± 1,1, que fue de aproximadamente el 8 % de la del grupo de control negativo y, fue de 2,0 ± 2,2 (~ 8 %) de la del grupo de control negativo el día 49 después del tratamiento. La figura 8 muestra todos los tumores al final del estudio y la figura 9 muestra el valor promedio del peso tumoral en cada uno de los grupos de experimentación.

Tabla. Peso tumoral promedio en cada grupo

Grupos	*Peso tumoral (g) (media ± de)*	*Valor de p*
Solución salina (C)	0,1543 ± 0,0546	
Sorafenib (S)	0,0637 ± 0,0389	P = 0,0159 frente a C
TH3424 (2,5 mg/kg)	0,0081 ± 0,0088 (Día 49)	P = 0,0002 frente a C; P = 0,0020 frente a S
TH3424 (5 mg/kg)	0,0000 ± 0,0000	P = 0,0001 frente a C; P = 0,0024 frente a S; P = 0,0341 frente a TH3424 (2,5 mg/kg)

Como se muestra en las figuras 8 y 9 y en la tabla anterior, el peso tumoral promedio del grupo de control positivo fue menor que el del grupo de control negativo (P = 0,0159), lo que mostró que el fármaco de control positivo (sorafenib) tuvo un efecto inhibidor sobre el modelo de ratón de carcinoma hepatocelular humano HepG2-GFP ortotópico a la dosificación ensayada.

El peso tumoral promedio del grupo tratado con TH3424 (2,5 mg/kg) y con TH3424 (5 mg/kg) fue de 0,0081 g y de 0 g, respectivamente. De manera estadísticamente significativa, todo fue menor que en el en grupo de control. Entre ellos, el peso promedio fue de 0 g en el grupo tratado con dosis alta, y solo fue de 0,0081 ± 0,0088 g en el grupo tratado con dosis baja, que fue 0 % y 5,2 % del grupo de control negativo, respectivamente. Esto sugirió que, a las dosis ensayadas, TH3424 tenía un efecto inhibidor muy fuerte sobre el modelo de ratón de carcinoma hepatocelular humano HepG2-GFP ortotópico y también mostró una clara relación entre dosis y efecto.

La RI del tumor se calculó en función de los pesos tumorales promedio finales según la fórmula:

$$(\%) \text{ de RI} = (1\text{-tratamiento(t)/control(c)}) \times 100$$

RI para cada grupo de tratamiento:

$$(\%) \text{ de RI} = (1\text{-CP/CN}) \times 100 = (1\text{-}0{,}0637/0{,}1543) \times 100 \approx 58{,}7\ \%$$

$$\text{RI } (\%) = (1\text{-TH2870-2 LT/CN}) \times 100 = (1\text{-}0{,}0081/0{,}1543) \times 100 \approx 94{,}8\ \%$$

$$\text{RI } (\%) = (1\text{-TH2870-2 HT/CN}) \times 100 = (1\text{-}0{,}0000/0{,}1543) \times 100 \approx 100\ \%$$

Observación:

CN representa el grupo de control negativo
CP representa el grupo de control positivo

La tasa de inhibición tumoral fue de 58,7 % en el grupo tratado con sorafenib (P = 0,0159 frente al control), lo que muestra un fuerte efecto inhibidor sobre el modelo de ratón con carcinoma hepatocelular humano HepG2-GFP ortotópico a la dosificación ensayada. Sin embargo, en este grupo, el peso corporal promedio de los ratones de experimentación fue, de manera estadísticamente significativa, más bajo que el del grupo de control negativo. Esto sugirió que, con la administración de sorafenib a la dosificación ensayada, había un cierto grado de toxicidad para los ratones de experimentación. La tasa de inhibición tumoral de TH3424 (2,5 mg/kg) y de TH3424 (5 mg/kg) fue del 94,8% y del 100 %, respectivamente, lo que muestra un efecto inhibidor tumoral muy fuerte y una clara relación entre dosis y efecto sobre el modelo de ratón de carcinoma hepatocelular humano HepG2-GFP ortotópico. A las dosificaciones de TH3424 ensayadas, no hubo toxicidad obvia para los ratones de experimentación

Ejemplo 10. TH3424 en modelos animales de leucemia de linfocitos T

Las células leucémicas se prepararon descongelando ~ 150x106 células AL7473 de LN2 (aproximadamente 2-3 viales) y colocándolas rápidamente en un baño de agua a 37°°C. Todas las células se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml con 40 ml de medio completo precalentado. Las células se centrifugaron a 1 200 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron con 40 ml de RPMI1640. Después se hizo un recuento celular. Las células se centrifugaron a 1 200 rpm durante 5 min. y se resuspendieron con PBS enfriado con hielo a 2 millones de células por 100 ul de PBS. Se usaron 100 ul de solución salina que contenía 2X106 células preparadas anteriormente para inyectar en cada ratón por vía intravenosa (IV). Semanalmente, se realizó análisis FACS de sangre durante el período de experimentación transfiriendo muestras en tubos de FACS, añadiendo CD45 humano con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e isotipos en los tubos correspondientes para todas las muestras e incubando las células en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Se añadieron 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos a cada tubo y se incubaron en hielo durante otros 30 min. en la oscuridad. Todas las muestras se mezclaron en vórtex

varias veces durante este proceso y las muestras se centrifugaron durante 5 min. a 1 500 rpm a 4º C. Los sobrenadantes se descartaron y a cada tubo se añadieron 2 ml de tampón de lavado enfriado con hielo. Las muestras se centrifugaron durante 5 min. a 1 500 rpm a 4°°C y estas etapas se repitieron. Las células se resuspendieron en 150 µl de tampón de lavado/PBS para la adquisición de FACS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur usando Cell Quest o Flowjo y los resultados se analizaron usando el programa Prism 5.0.

Para el análisis FACS, los días 26, 33, 42 después de la inoculación celular, se recogieron muestras de sangre de cada grupo. Después de agrupar las muestras, el análisis FACS se realizó semanalmente hasta que terminó el estudio (Día 50, 57, 64 después de la inoculación de las células). Se recogieron 10 µl de muestras de plasma de cada ratón y se realizaron 3 frotis de sangre de cada grupo (Grupo 1: n.º 7, n.º 43, n.º 52; Grupo 2: n.º 11, n.º 15, n.º 23; Grupo 3: n.º 5, n.º 9, n.º 48; Grupo 4: n.º 25, n.º 28, n.º 36) el día 57 después de la inoculación celular. La lista de muestras se resume a continuación.

Tabla: Recogida de muestras de todos los animales en el punto de terminación.

Origen de la muestra	*Uso*	*Comentarios*
Sangre	*FACS (CD45 humano)*	Todos los ratones
Médula ósea	*FACS (CD45 humano)*	Todos los ratones
	fijada en formalina, incluida en parafina	3 ratones de cada grupo
Bazo	*FACS (CD45 humano)*	Todos los ratones
	fijado en formalina, incluido en parafina	3 ratones de cada grupo

En la figura 10 se muestran los resultados de los cambios de peso corporal en los ratones. Se recogió sangre periférica semanalmente para análisis FACS del anticuerpo CD45 humano detectado durante el tratamiento desde el inicio del tratamiento el día 43 después de la inoculación celular. Después de la inoculación celular, los ratones se dosificaron los días 43, 50, 57 y 64 (dosificación solo del grupo 1 y grupo 2), respectivamente. En la figura 11 se muestra la curva de crecimiento de la carga tumoral después del agrupamiento. Los porcentajes de células de leucemia CD45+ humanas en sangre periférica de cada grupo aumentaron a medida que evolucionaba la enfermedad y salvo en el grupo 2 (P> 0,05), las curvas porcentuales disminuyeron 7 días después de la primera dosis. Después de la segunda dosificación, el grupo que recibió tratamiento (grupo 2-4) fue significativamente menor que el grupo tratado con vehículo (grupo 1) (P <0,001). Todos los ratones (total de 4 grupos, 10 ratones en cada grupo) se sacrificaron 6 días después de la cuarta dosificación. La sangre, el bazo y la médula ósea de todos los ratones se recogieron para detectar por FACS el anticuerpo CD45 humano detectado. El bazo y la médula ósea de 3 ratones de cada grupo se recogieron para FFPE (siglas del inglés *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, fijar en formalina e incluir en parafina). En el Anexo 10.3 se resumen los datos detallados y la lista de muestras en el punto de terminación. En la figura 12 se muestra la carga tumoral en sangre periférica, bazo y médula ósea de ratones en el punto de terminación del estudio. Respectivamente, en comparación con la sangre, el bazo y la médula ósea del grupo 1, excepto la médula ósea en el grupo 2, mostró diferencias ligeramente significativas (P <0,05), todos los grupos de tratamiento (grupos 2-4) mostraron diferencias significativas (P <0,01).

Ejemplo 10. Parámetros farmacocinéticos (FC) y estudio de toxicidad aguda en monos no sometidos previamente a experimentación

TH 3423 y TH 3424 se analizaron en monos no sometidos previamente a experimentación (1 macho y una hembra para cada compuesto a 2 mg/kg) con infusión intravenosa durante 30 minutos, muestreo de FC (parámetros farmacocinéticos): el día 1 y el día 15: 0,25, 0,5, 0,75, 1 y 2 horas después del inicio de la infusión. Análisis bioquímico del suero y hematología: predosis (día 1), día 5, día 8 (predosis), día 15 (predosis), día 22 y el día 28. Observación clínica: Diariamente durante el estudio, 35 días en total. Consumo de alimento: Diariamente durante el estudio, 35 días en total. Medición de peso corporal: Dos veces por semana durante cinco semanas.

Los parámetros FC se indican en las siguientes tablas:

Concentración plasmática de TH3423 después de infusión IV durante 30 minutos a monos cinomolgos macho y hembra a 2 mg/kg				
Dosificación	**Puntos temporales**	**concentración (ng/ml)**		**Media (ng/ml)**
	(horas)	**macho_n.º 1**	**hembra_n.º 2**	
IV-TH3423 2 mg/kg	0,25	1100	1320	1210
	0,5	1420	1370	1395
	0,75	359	313	336
	1	85,0	55,0	70,0
	2	1,03	LDC	1,03
Parámetros FC	**Unidad**	**n.º 1-**	**n.º 2**	**Media**
CL	l/h/kg	2,59	2,61	2,60
V_{ss}	l/kg	0,584	0,469	0,5266
$ABC_{hasta\ el\ último\ punto}$	h* ng/ml	773	758	766
$abc_{hasta\ el\ infinito}$	h* ng/ml	774	766	770
t1/2 terminal	h	0,150	0,108	0,129

Concentración plasmática de TH3424 después de infusión IV durante 30 minutos a monos cinomolgos macho y hembra a 2 mg/kg				
Dosificación	**Puntos temporales**	**concentración (ng/ml)**		**Media (ng/ml)**
	(horas)	**macho_n.º 3**	**hembra_n.º 4**	
IV-TH3424 2 mg/kg	0,25	2480	1850	2165
	0,5	2720	2090	2405
	0,75	1030	557	794
	1	260	110	185
	2	7,43	3,84	5,64
Parámetros FC	**Unidad**	**n.º 3**	**n.º 4**	**Media**
CL	l/h/kg	1,16	1,67	1,42
Vss	l/kg	0,289	0,360	0,3246
$ABC_{hasta\ el\ último\ punto}$	h* ng/ml	1724	1195	1459
$ABC_{hasta\ el\ infinito}$	h* ng/ml	1726	1196	1461
t1/2 terminal	h	0,181	0,182	0,182
TRMINF	h	0,250	0,215	0,2324

En la siguiente tabla se muestra el análisis bioquímico del suero:

	Sexo	ID del animal	Tiempo de muestreo	ALT (U/l)	AST (U/l)	ALP (U/l)	γ-GT (U/l)	BILT (µM)	PT (g/l)	ALB (g/l)	BUN (µM)	Glu (mM)
Grupo 1 TH3423	Macho	n.º 1	Día 1	45,0	37,0	746,4	78,4	5,2	72,9	46,9	3,47	3,12
			Día 8	21,0	40,8	540,3	37,6	9,8	76,2	39,1	26,82	5,28
	Hembra	n.º 2	Día 1	41,7	43,3	205,5	41,5	0,0	66,0	42	4,06	6,03
			Día 8	25,5	57,7	190,3	37,0	0,4	71,8	40,9	7,61	2,13
			Día 15	21,1	76,7	123,6	29,4	1,4	54,9	34,2	5,96	2,51
Grupo 2 TH3424	Macho	n.º 3	Día 1	43,0	40,2	287,5	62,2	2,1	70,4	50,5	4,89	4,5
			Día 8	31,2	31,2	225,2	44,9	3,6	65,1	43,3	4,8	4,15
			Día 15	45,0	73,5	174,8	36,7	2,1	53,2	36,8	9,66	1,47
	Hembra	n.º 4	Día 1	61,6	23,7	134,2	47,3	1,5	70,2	46,1	3,43	3,34
			Día 8	37,7	43,1	200,2	36,2	0,8	72,4	41,8	5,63	5,91
			Día 15	31,9	23,8	151,5	34,2	4,0	62,3	38,5	3,87	2,8

	Sexo	Animal ID	Tiempo de muestreo	TC (mM)	TG (mmol/l)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)	CK (U/l)	GLB (g/l)	CREA (µM)
Grupo 1 TH3423	Macho	n.º 1	Día 1	2,1	0,24	2,54	1,27	146	26	66
			Día 8	1,72	2,25	2,55	1,84	153	37,1	141
	Hembra	n.º 2	Día 1	2,48	0,45	2,39	1,02	342	24	95
			Día 8	3,01	1,17	2,47	1,53	126	30,9	120

(continuación)

	Sexo	Animal ID	Tiempo de muestreo	TC (mM)	TG (mmol/l)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)	CK (U/l)	GLB (g/l)	CREA (µM)
			Día 15	2,02	0,84	2,36	1,09	78	20,7	69
Grupo 2 TH3424	Macho	n.º 3	Día 1	3,22	0,38	2,38	1,66	221	19,9	91
			Día 8	3,06	0,66	2,33	1,57	83	21,8	96
			Día 15	1,44	0,41	2,14	1,5	172	16,4	58
	Hembra	n.º 4	Día 1	3,04	0,17	2,51	1,21	202	24,1	61
			Día 8	2,91	0,63	2,37	1,31	190	30,6	88
			Día 15	2,23	0,94	2,2	1,22	78	23,8	46

	Sexo	ID del animal	Tiempo de muestreo	A/G	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Cl (mmol/l)
Grupo 1 TH3423	Macho	n.º 1	Día 1	1,8	143	6,92	106
			Día 8	1,1	112	5,86	71,2
	Hembra	n.º 2	Día 1	1,8	146	6,14	104
			Día 8	1,3	149	4,83	97,9
			Día 15	1,7	128,17	4,81	83,87
Grupo 2 TH3424	Macho	n.º 3	Día 1	2,5	147	4,31	110
			Día 8	2,0	147	4,51	97,2
			Día 15	2,2	136,14	6,05	92,47
	Hembra	n.º 4	Día 1	1,9	143	5,77	108
			Día 8	1,4	143	4,33	97,1
			Día 15	1,6	132,59	5,58	95,29

Los datos de hematología se muestran en la siguiente tabla:

	Sexo	**ID del animal**	**Tiempo de muestreo**	LEUCOCITOS ($x10^9$/l)	% de NEUT (%)	% de LINF (%)	% de MONO (%)	% de EOS (%)	% de BASÓF. (%)	recuento absoluto de neutrófilos ($x10^9$/l)	recuento absoluto de linfocitos ($x10^9$/l)
Grupo 1 TH3423	Macho	n.º 1	Día 1	5,33	55,4	36,7	5,5	2,4	0,0	2,96	1,95
			Día 8	11,66	80,9	15,4	0,0	3,0	0,7	9,44	1,79
	Hembra	n.º 2	Día 1	6,7	47,9	45	4,8	2,3	0,0	3,21	3,02
			Día 8	10,35	61,90	35,60	0,00	2,30	0,20	6,40	3,68
			Día 15	9,56	63,0	27,90	6,30	2,70	0,10	6,02	2,67
Grupo 2 TH3424	Macho	n.º 3	Día 1	4,71	58,4	38,9	0,1	2,6	0,0	2,75	1,84
			Día 8	9,15	34,60	45,90	13,10	1,10	5,30	3,16	4,19
			Día 15	13,26	65,7	26,70	4,40	3,10	0,10	8,70	3,54
	Hembra	n.º 4	Día 1	11,64	72,8	22,9	0,9	3,3	0,1	8,47	2,66
			Día 8	16,91	49,10	18,90	0,20	1,50	30,30	8,29	3,20
			Día 15	20,70	80,8	13,60	3,00	1,70	0,90	16,7	2,80

	Sexo	ID del animal	Tiempo de muestreo	recuento absoluto de monocitos ($x10^9$/l)	recuento absoluto de eosinófilos ($x10^9$/l)	recuento absoluto de basófilos ($x10^9$/l)	Glóbulos rojos ($x10^{12}$/l)	HGB (g/l)	HCT (%)	VGM (fl)	HCM (pg)
Grupo 1	Macho	n.º 1	Día 1	0,29	0,13	0,0	5,2	132	40,8	78,3	25,4
TH3423			Día 8	0,00	0,35	0,08	5,86	146,00	44,70	76,20	24,90
	Hembra	n.º 2	Día 1	0,32	0,15	0	4,67	112	35	74,9	24
			Día 8	0,00	0,25	0,02	5,21	128,00	39,80	76,30	24,60
			Día 15	0,60	0,26	0,01	4,8	115	33,9	70,6	24,0
			Día 1	0	0,12	0	4,55	117	34,9	76,7	25,7
	Macho	n.º 3	Día 8	1,21	0,10	0,49	4,59	117,00	35,20	76,70	25,50
Grupo 2			Día 15	0,59	0,41	0,02	5,02	127	37,4	74,5	25,3
TH3424			Día 1	0,11	0,39	0,01	4,65	118	35,7	76,8	25,4
	Hembra	n.º 4	Día 8	0,03	0,26	5,13	5,15	130,00	39,30	76,30	25,30
			Día 15	0,62	0,37	0,19	4,94	125	36,3	73,5	25,3

	Sexo	**ID del animal**	**Tiempo de muestreo**	CGMH (g/l)	CV de la ADE (%)	DE de la ADE (fl)	PLT ($x10^9$/l)	VPM (fl)	ADP	PCT (%)
Grupo 1 TH3423	Macho	n.º 1	Día 1	324	11,6	38,2	358	10,2	15,1	0,365
			Día 8	327,00	11,90	38,00	490,00	10,60	15,70	0,52
	Hembra	n.º 2	Día 1	320	11,8	37,2	318	10,6	14,8	0,338
			Día 8	322,00	12,30	39,50	699,00	9,60	15,40	0,67
			Día 15	339	10,9	32,3	533	8,70	15,10	0,46
Grupo 2 TH3424	Macho	n.º 3	Día 1	335	11,8	38,1	240	11,1	15,5	0,267
			Día 8	332,00	11,50	37,20	496,00	10,30	15,30	0,51
			Día 15	340	11,5	36,3	623	9,5	15,4	0,593
	Hembra	n.º 4	Día 1	331	11,5	37,4	213	13	15,4	0,277

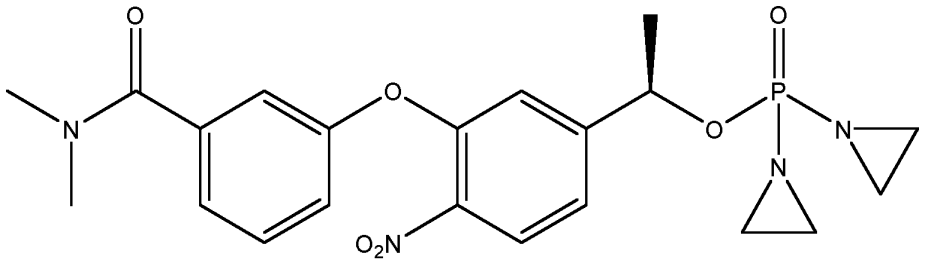
			Día 8	331,00	11,20	36,20	390,00	12,80	15,50	0,50
			Día 15	344	11,0	34,1	221	12,5	16,2	0,275

En la siguiente tabla se indican los cambios de peso corporal:

Grupo N.º	**ID del animal**				
		Día 1	**Día 4**	**Día 8**	**Día 11**
Grupo 1 TH3423	n.º 1	3,35	3,23	3,23	2,95
	n.º 2	3,65	3,55	3,41	2,96
	Media	3,50	3,39	3,32	2,96
Grupo 2 TH3424	n.º 3-	3,40	3,30	3,31	3,17
	n.º 4	3,28	3,22	3,08	2,94
	Media	3,34	3,26	3,20	3,06

REIVINDICACIONES

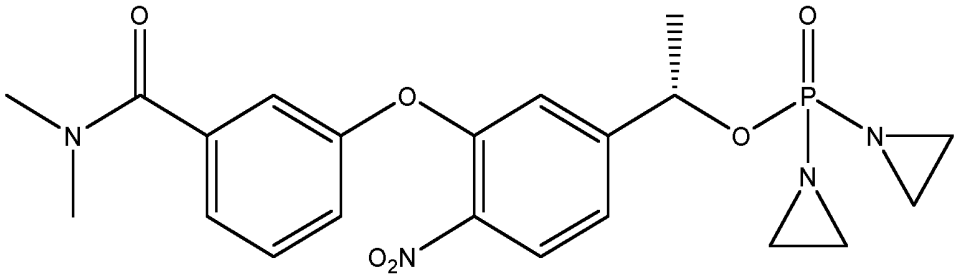
1. El compuesto (R)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxi1-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato:



I

o una variante anisotópica, un solvato o un hidrato del mismo.

2. El compuesto (S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato:



II

o una variante isotópica del mismo o un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto tiene un exceso enantiomérico de no menos del 80 %.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde el compuesto tiene un exceso enantiomérico de:

no menos del 90 % o
no menos del 95 %.

5. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto es sustancialmente puro.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde el compuesto tiene una pureza de:

al menos el 50 % o
al menos el 90 %.

7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

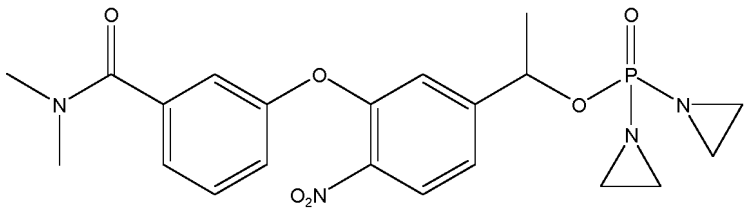
8. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2 para uso en el tratamiento o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad proliferativa en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

9. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad es cáncer incluyendo cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, leucemia, cáncer de esófago, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, un cáncer de sarcoma y cáncer de recto.

10. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en un método de inhibición del crecimiento de una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

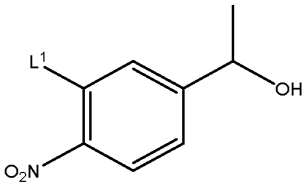
11. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en un método de la reivindicación 10, en donde la célula es una célula cancerosa.

12. Un proceso para preparar el compuesto de fórmula I:



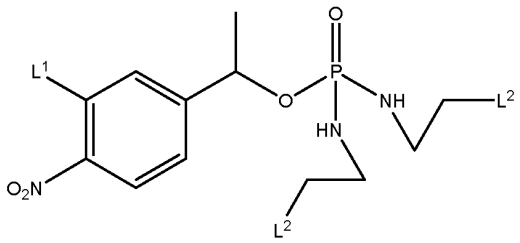
I

que comprende poner en contacto un compuesto de fórmula II:



II

con $POCl_3$ y $H_2NCH_2CH_2L^2$ o una sal del mismo, para proporcionar un compuesto de fórmula III,



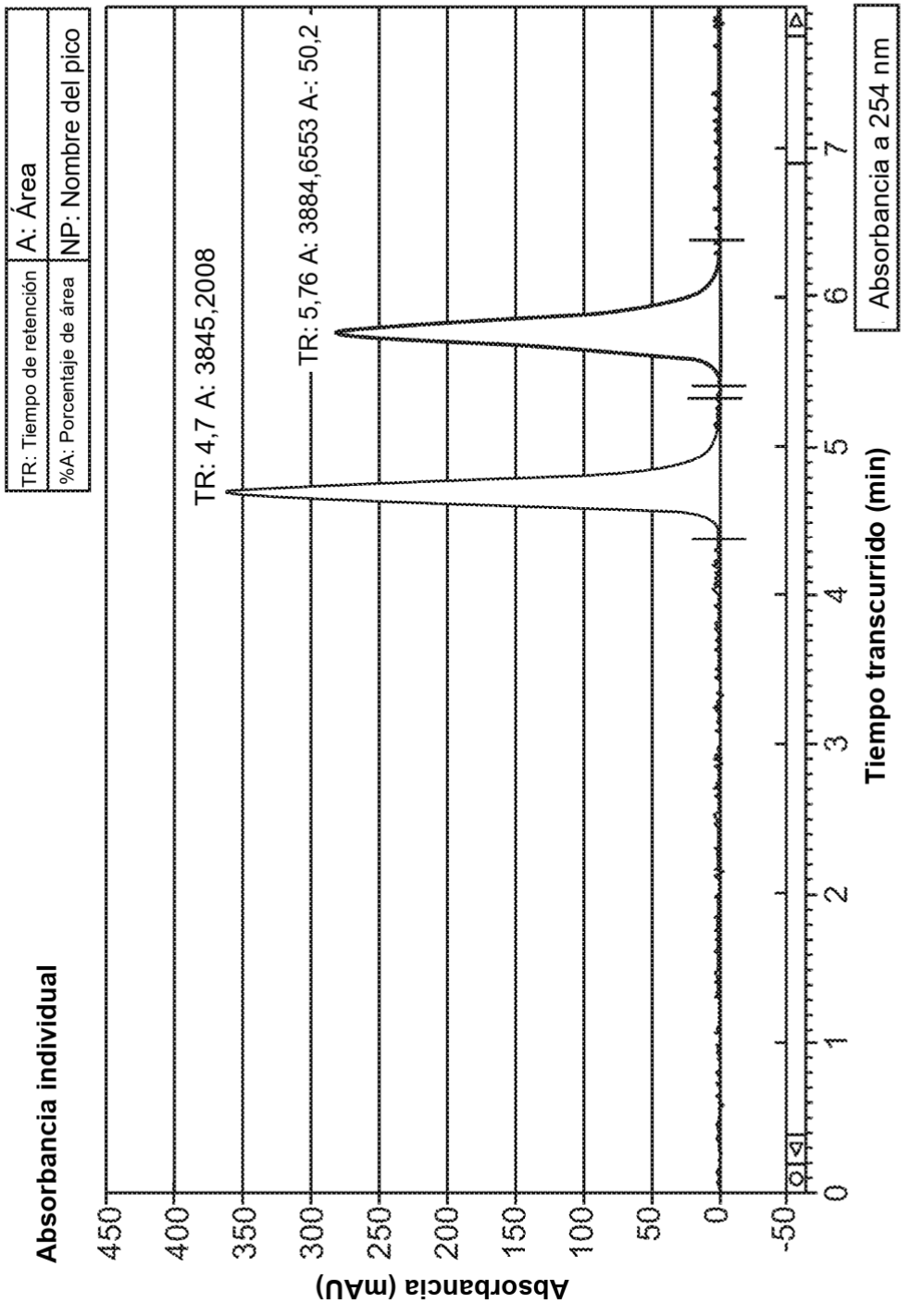
III

en donde L^1 y L^2 son independientemente un grupo saliente, y convertir el compuesto de fórmula III en un compuesto de fórmula I. X es F, Cl, Br, $MeSO_3$.

13. Un proceso para la resolución en uno de los enantiómeros del racemato del compuesto de la reivindicación I o para el enriquecimiento de una mezcla con cualquier exceso enantiomérico de dicho compuesto de fórmula (I), que comprende las siguientes etapas: a) sometiendo el compuesto de fórmula (I): a un proceso de resolución óptica en donde una mezcla racémica enantioméricamente enriquecida de 1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato se separa en sus dos enantiómeros (S)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato y (R)-1-(3-(3-N,N-dimetilaminocarbonil)fenoxil-4-nitrofenil)-1-etil-N,N'-bis(etilen)fosforamidato mediante cromatografía quiral que comprende una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase estacionaria comprende un gel de sílice impregnado con un polisacárido funcionalizado, y en donde la fase móvil comprende un alcohol y otro disolvente.

14. El proceso de la reivindicación 13, en donde el alcohol es metanol.

15. El proceso de la reivindicación 13, en donde el otro disolvente es CO_2.



Información sobre el número de pico	TR (min)	Área %	Área	Altura
1	4,7	49,7448	3845,2008	365,9276
2	5,76	50,2552	3884,6553	284,9271

FIG. 1A

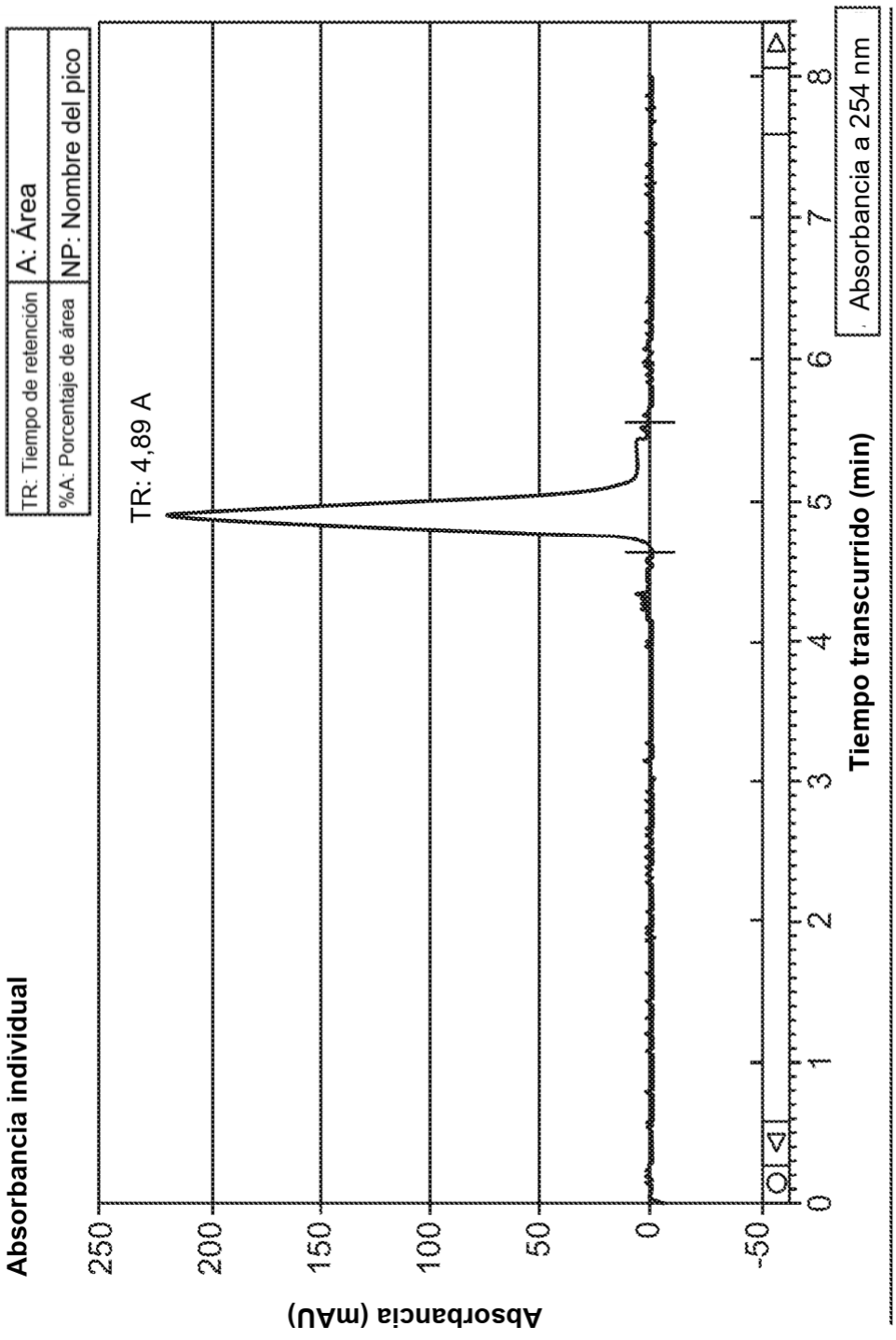

Absorbancia individual
TR: Tiempo de retención
%A: Porcentaje de área
A: Área
NP: Nombre del pico
TR: 4,89 A
Absorbancia (mAU)
250
200
150
100
50
0
-50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Tiempo transcurrido (min)
Absorbancia a 254 nm
Información sobre el número de pico
TR (min)
Área %
Área
Altura
1
4,89
100
2551,5441
217,4787

FIG. 1B

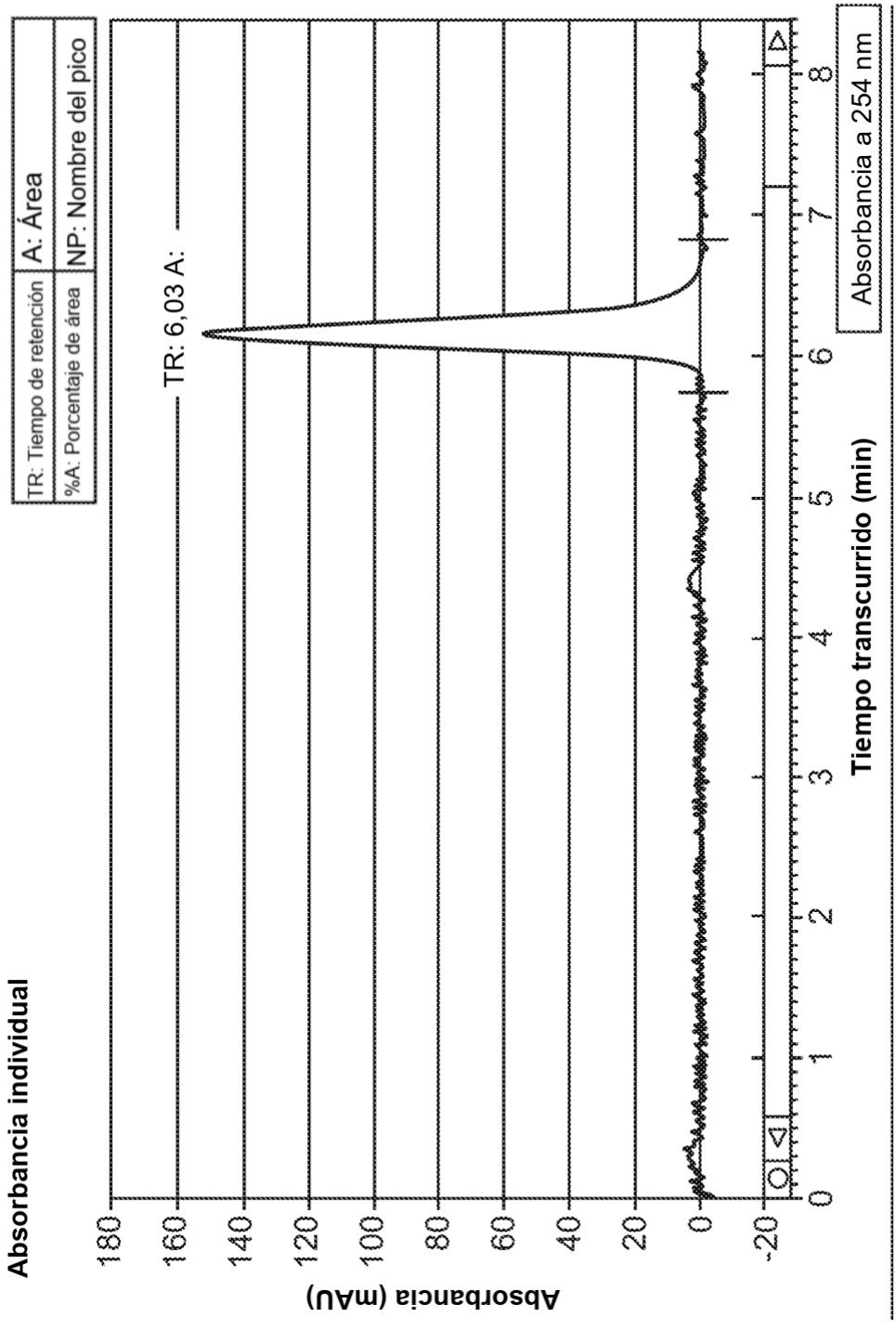

Absorbancia individual
TR: Tiempo de retención
A: Área
%A: Porcentaje de área
NP: Nombre del pico
TR: 6,03 A:
Absorbancia (mAU)
Tiempo transcurrido (min)
Absorbancia a 254 nm
Información sobre el número de pico
TR (min)
Área %
Área
Altura
1
6,03
100
2219,2723
154,9745

FIG. 1C

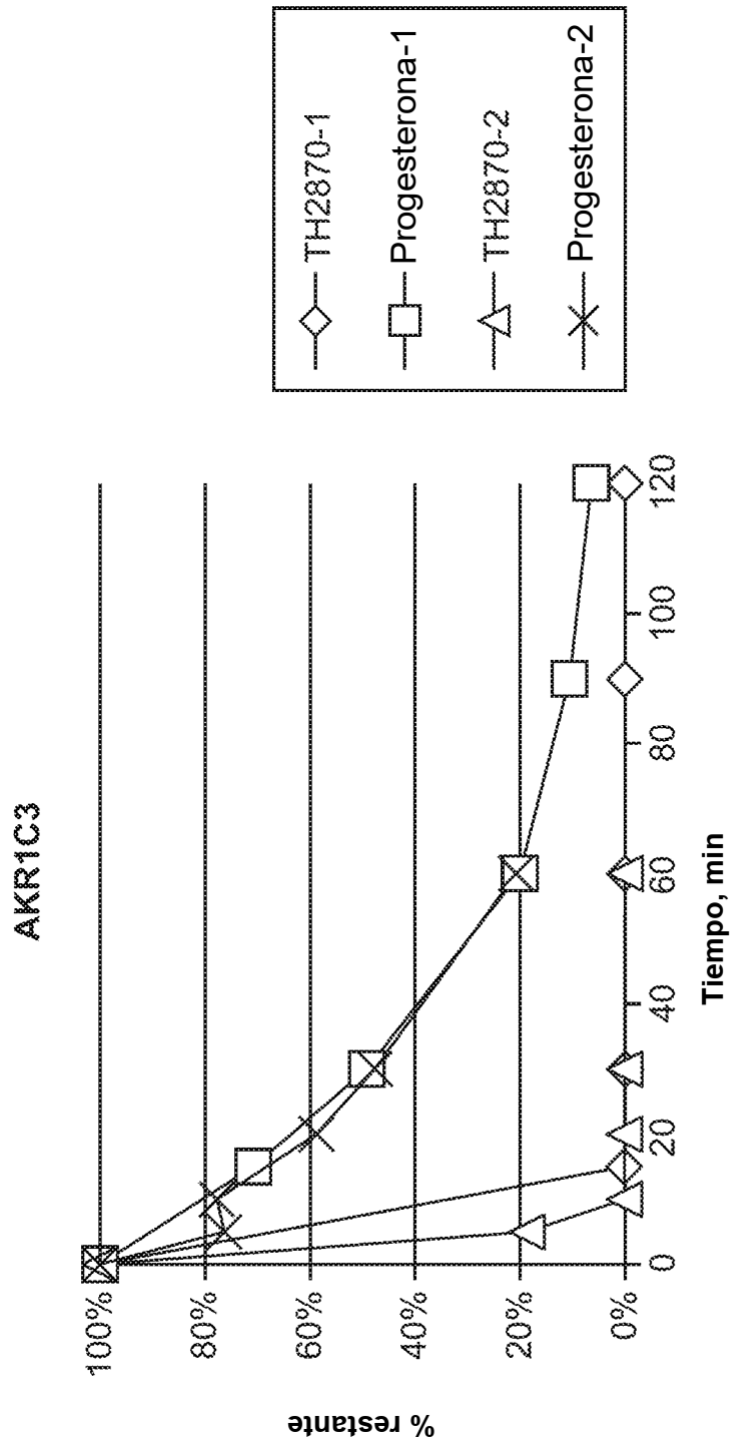

TH2870-1
Progesterona-1
TH2870-2
Progesterona-2
AKR1C3
% restante
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
20
40
60
80
100
120
Tiempo, min

FIG. 2

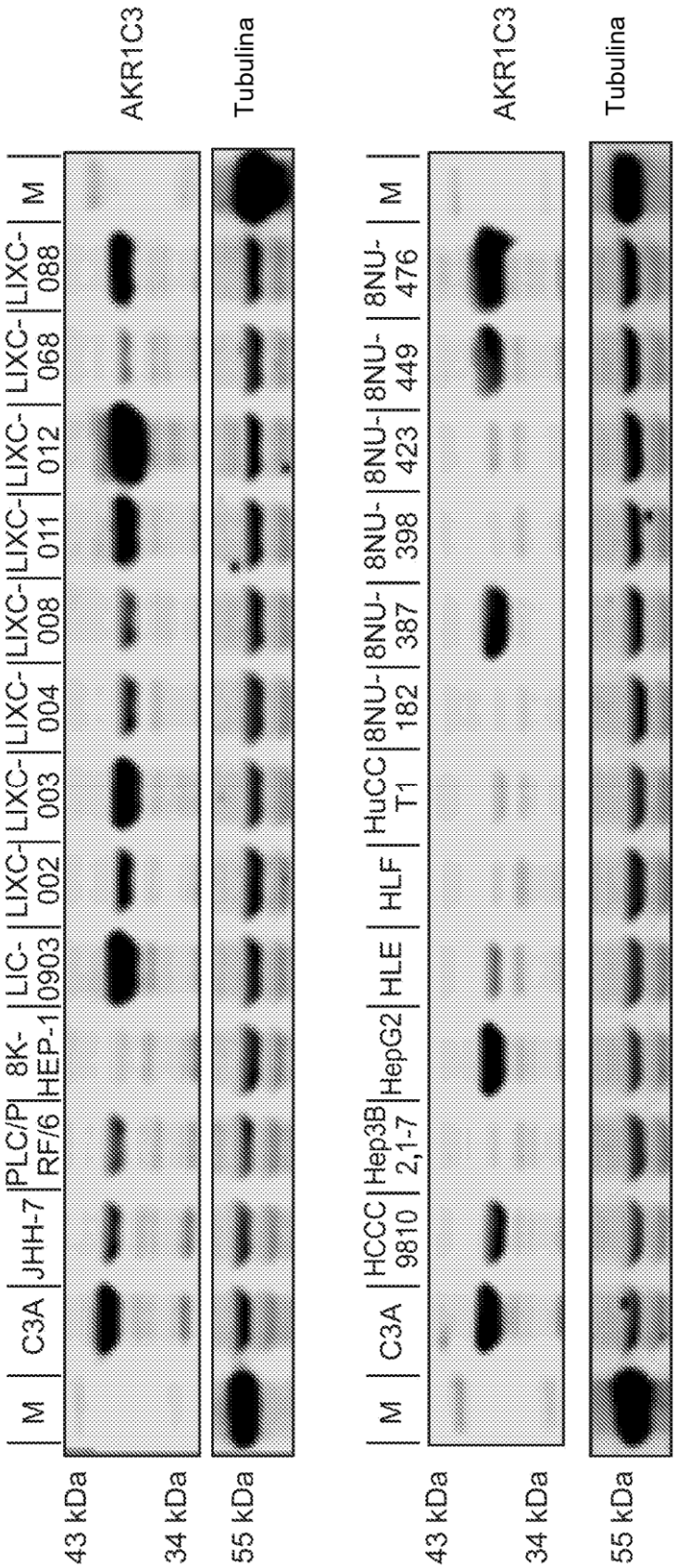

Expresión de AKR1C3 en líneas celulares de cáncer de hígado
M
C3A
JHH-7
PLC/PRF/6
8K-HEP-1
LIC-0903
LIXC-002
LIXC-003
LIXC-004
LIXC-008
LIXC-011
LIXC-012
LIXC-068
LIXC-088
M
AKR1C3
Tubulina
43 kDa
34 kDa
55 kDa
M
C3A
HCCC 9810
Hep3B 2,1-7
HepG2
HLE
HLF
HuCC T1
8NU-182
8NU-387
8NU-398
8NU-423
8NU-449
8NU-476
M
AKR1C3
Tubulina
43 kDa
34 kDa
55 kDa

FIG. 3

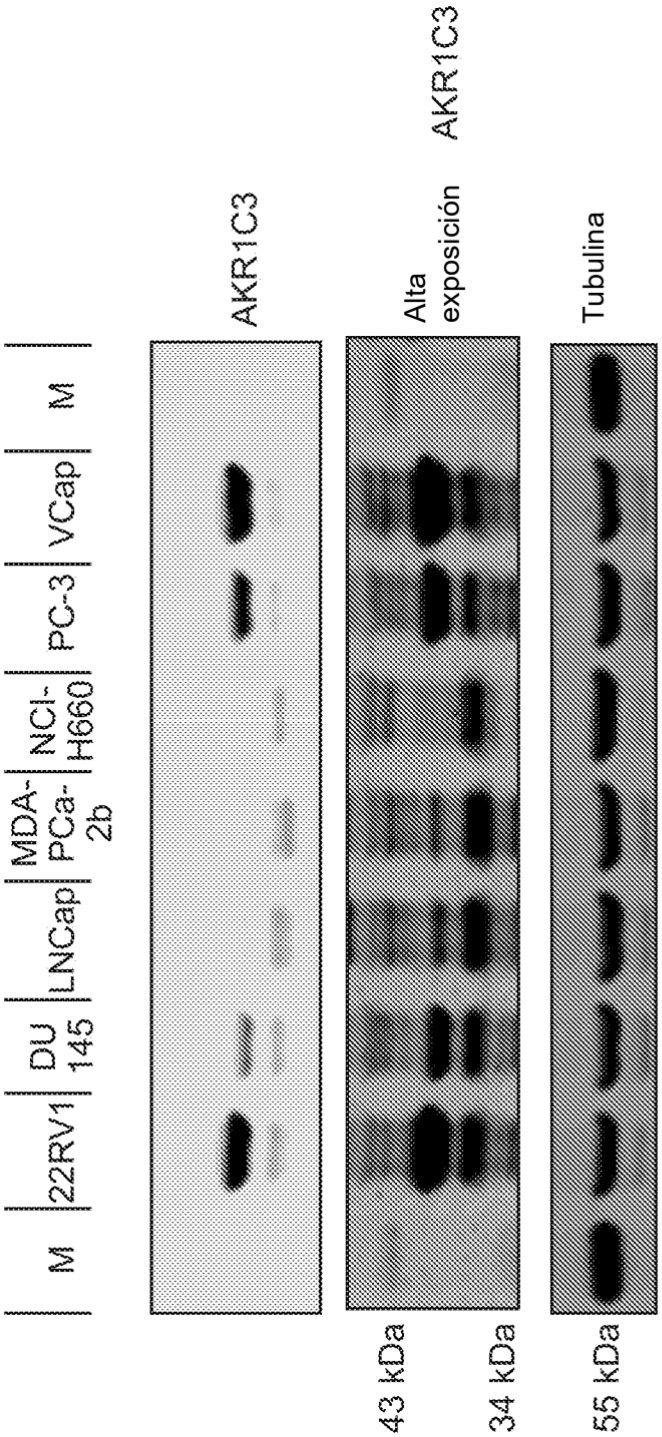

M
22RV1
DU 145
LNCap
MDA-PCa-2b
NCI-H660
PC-3
VCap
M
AKR1C3
Alta exposición
AKR1C3
Tubulina
43 kDa
34 kDa
55 kDa

FIG. 4

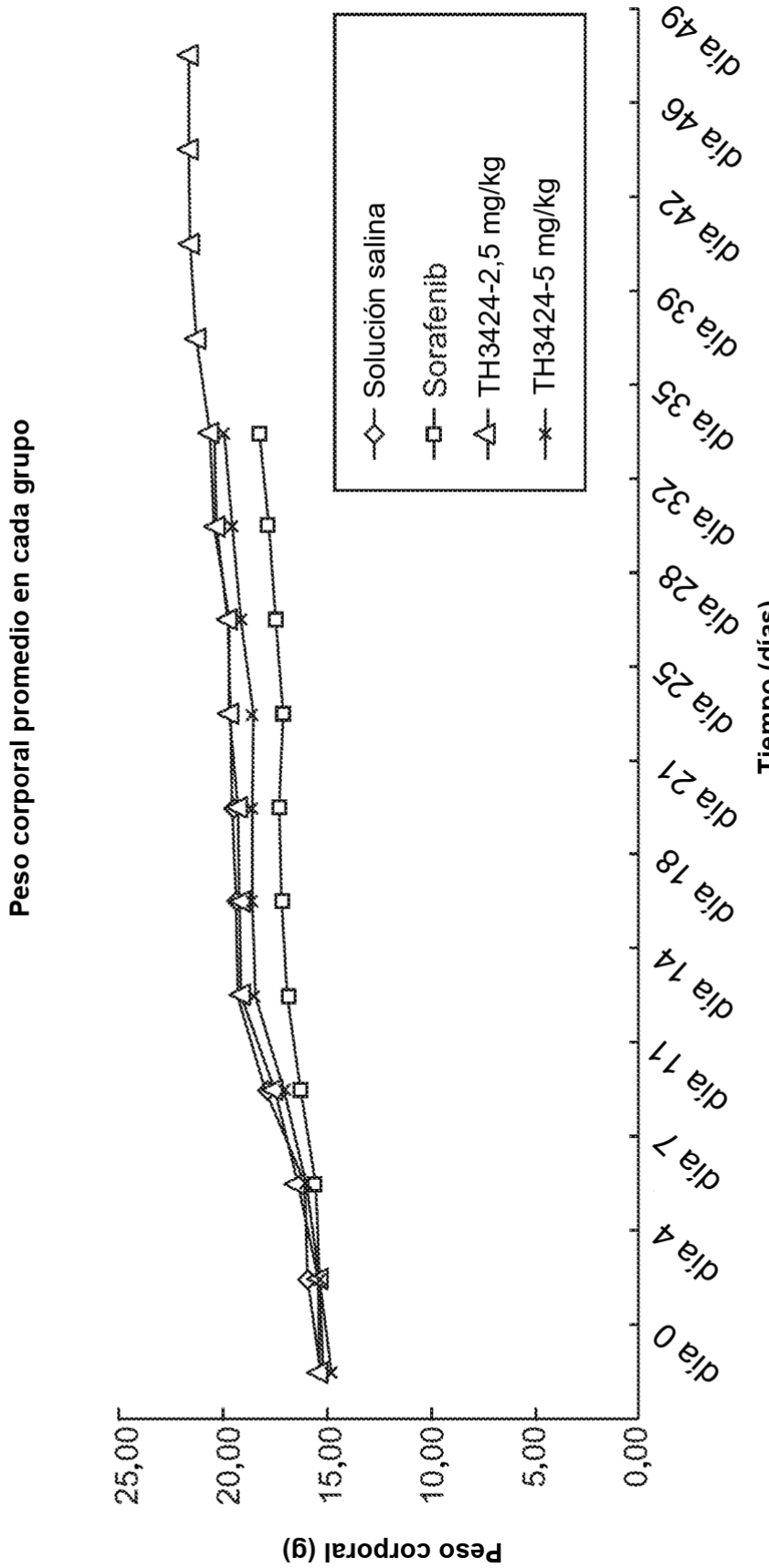

Peso corporal promedio en cada grupo
Solución salina
Sorafenib
TH3424-2,5 mg/kg
TH3424-5 mg/kg
Peso corporal (g)
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
Tiempo (días)
día 0
día 4
día 7
día 11
día 14
día 18
día 21
día 25
día 28
día 32
día 35
día 39
día 42
día 46
día 49

FIG. 5

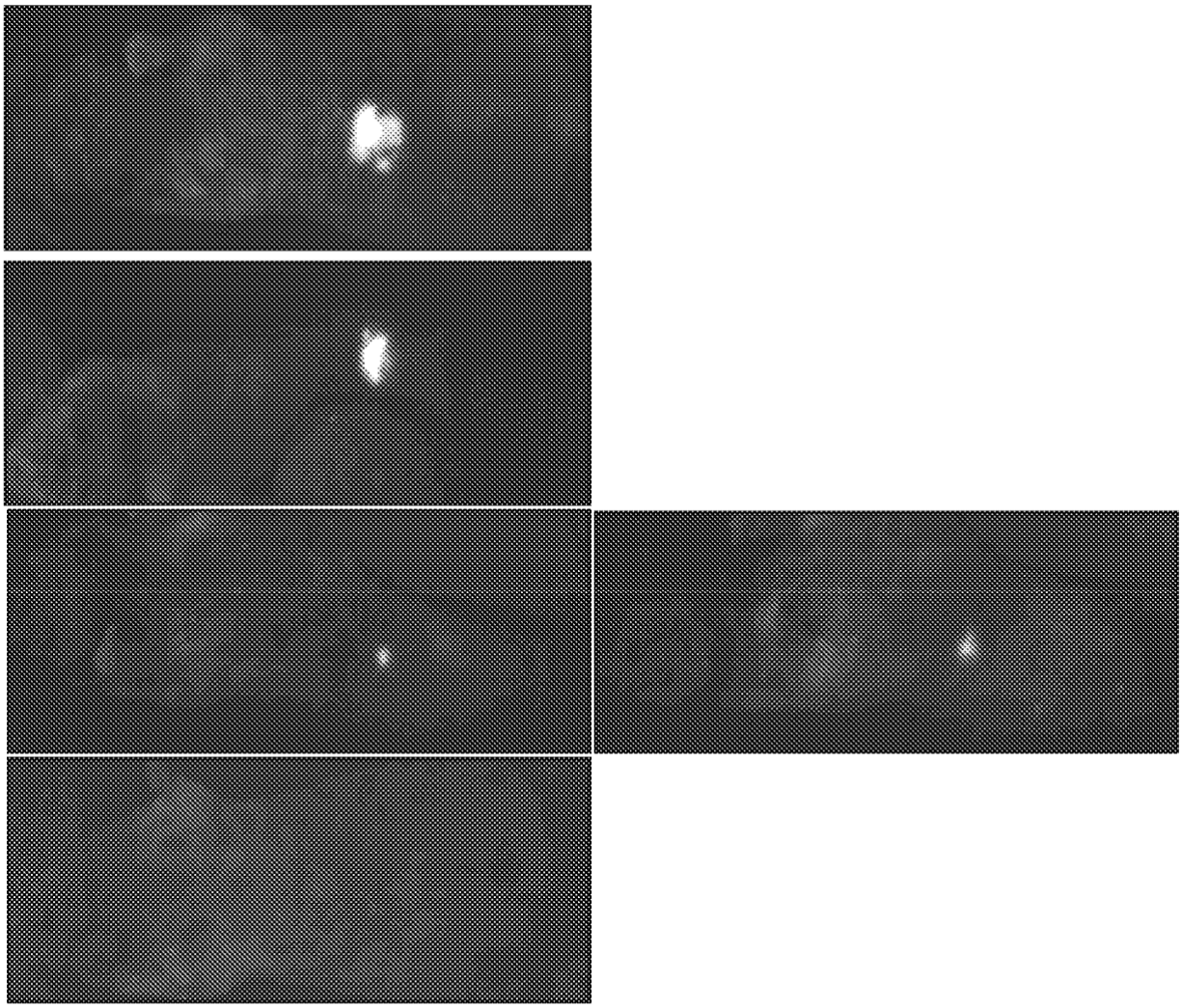


FIG. 6

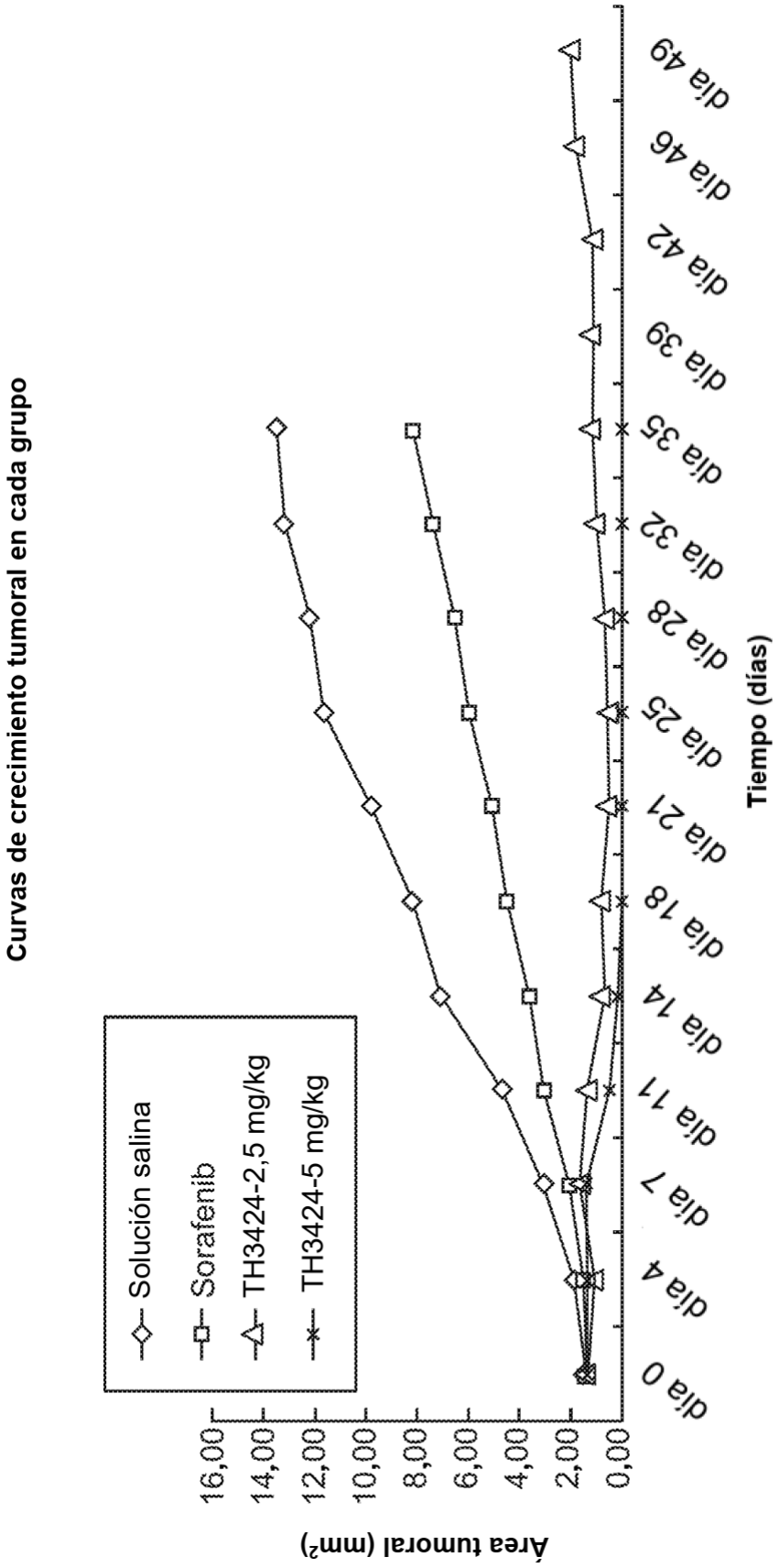

Curvas de crecimiento tumoral en cada grupo
Solución salina
Sorafenib
TH3424-2,5 mg/kg
TH3424-5 mg/kg
Área tumoral (mm²)
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
día 0
día 4
día 7
día 11
día 14
día 18
día 21
día 25
día 28
día 32
día 35
día 39
día 42
día 46
día 49
Tiempo (días)

FIG. 7

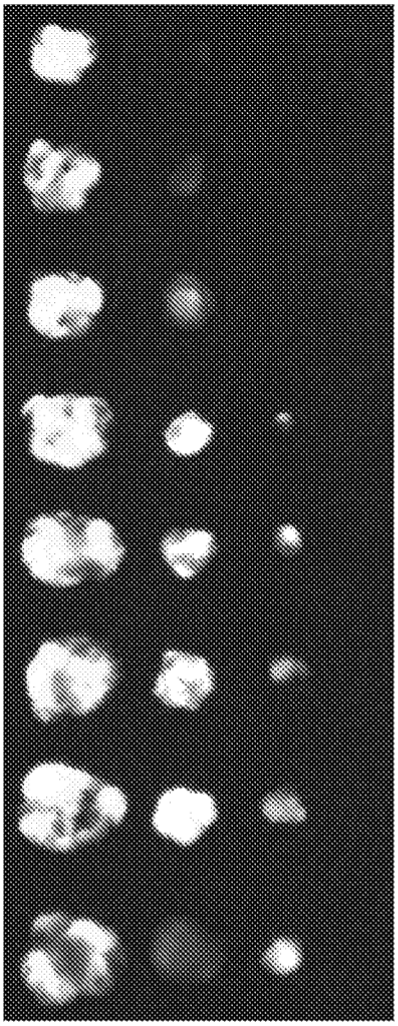


FIG. 8

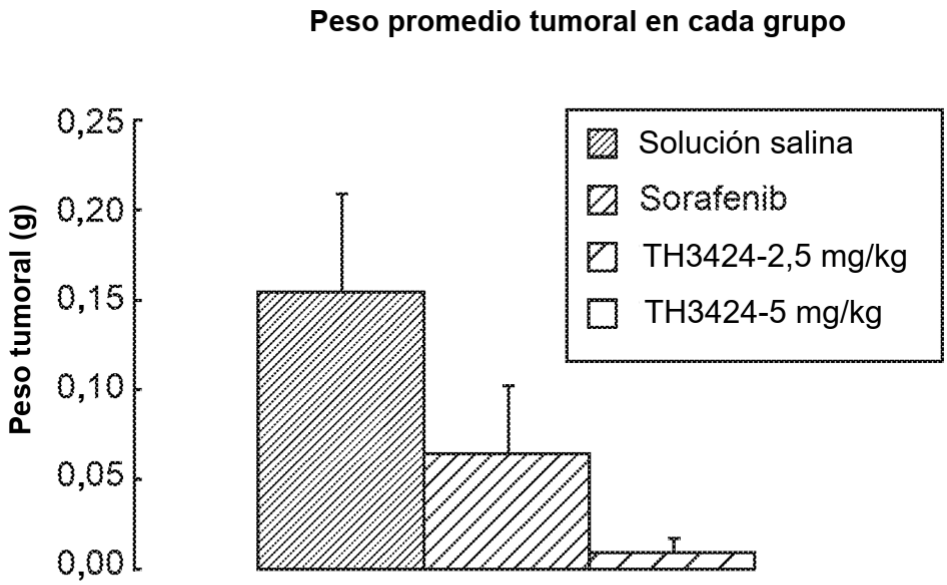

Peso promedio tumoral en cada grupo
Peso tumoral (g)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Solución salina
Sorafenib
TH3424-2,5 mg/kg
TH3424-5 mg/kg

FIG. 9

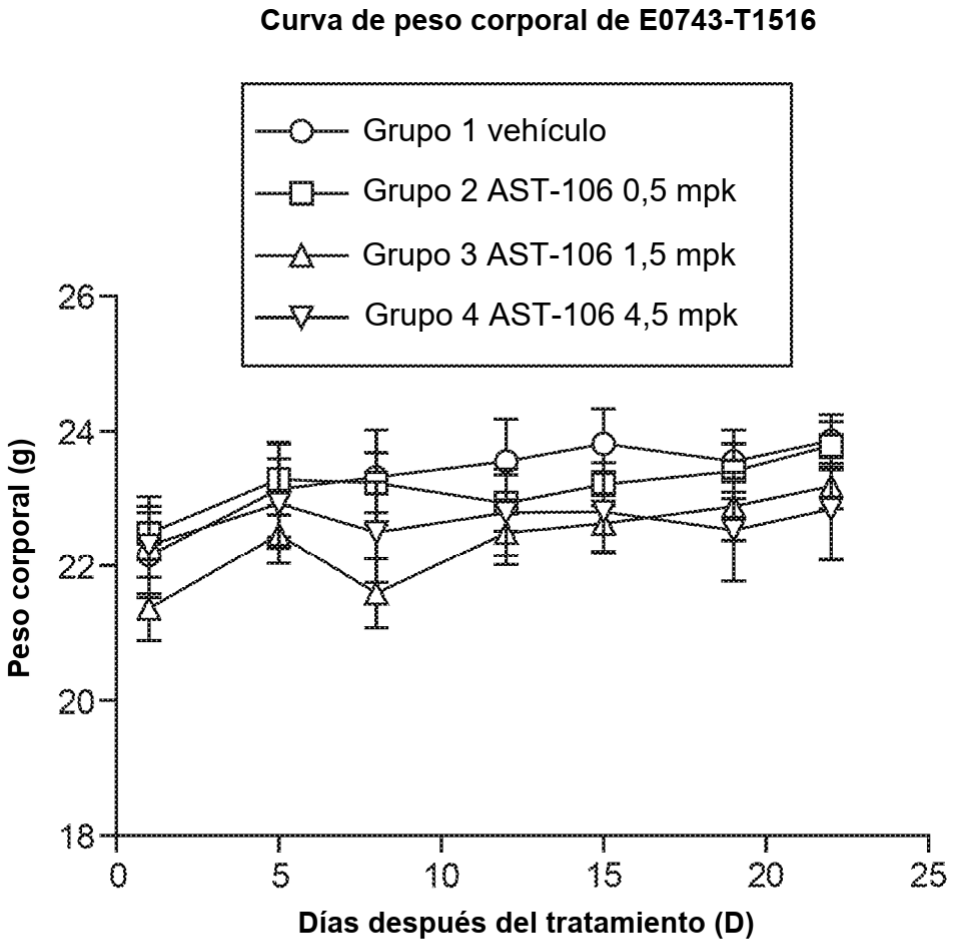

Curva de peso corporal de E0743-T1516
Grupo 1 vehículo
Grupo 2 AST-106 0,5 mpk
Grupo 3 AST-106 1,5 mpk
Grupo 4 AST-106 4,5 mpk
Peso corporal (g)
26
24
22
20
18
0
5
10
15
20
25
Días después del tratamiento (D)

FIG. 10

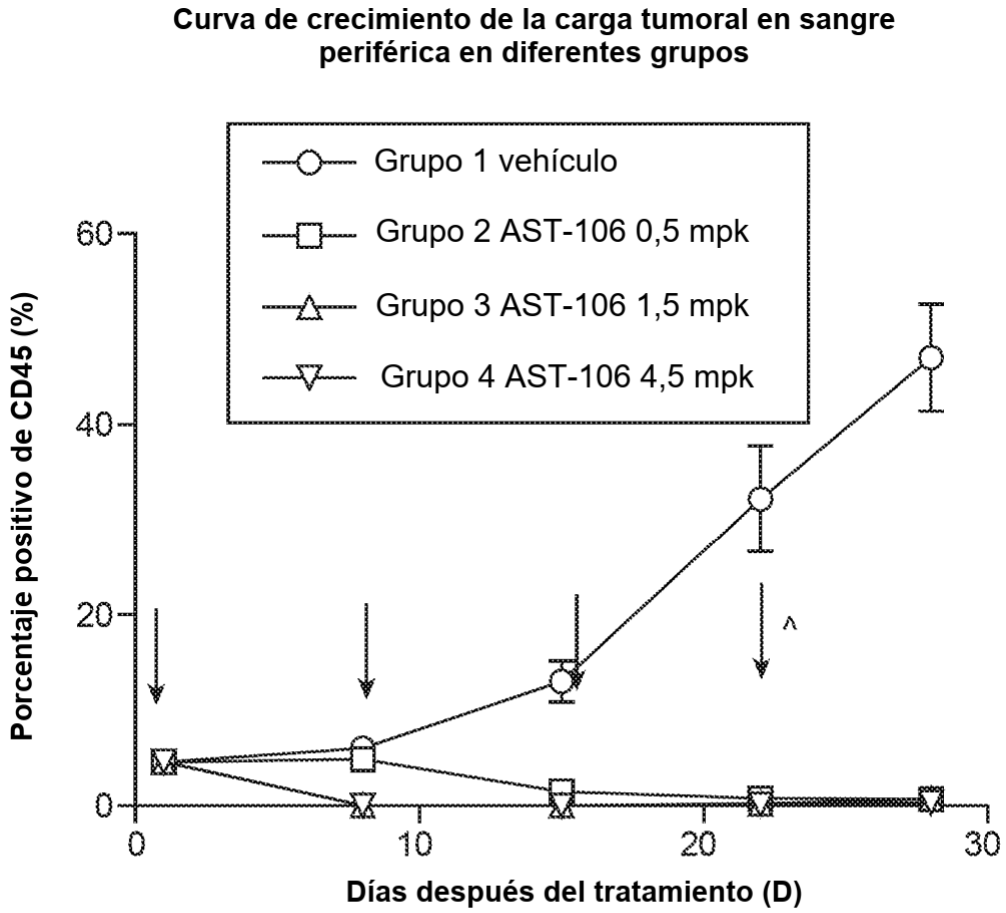

Curva de crecimiento de la carga tumoral en sangre periférica en diferentes grupos
Grupo 1 vehículo
Grupo 2 AST-106 0,5 mpk
Grupo 3 AST-106 1,5 mpk
Grupo 4 AST-106 4,5 mpk
Porcentaje positivo de CD45 (%)
60
40
20
0
0
10
20
30
Días después del tratamiento (D)

FIG. 11

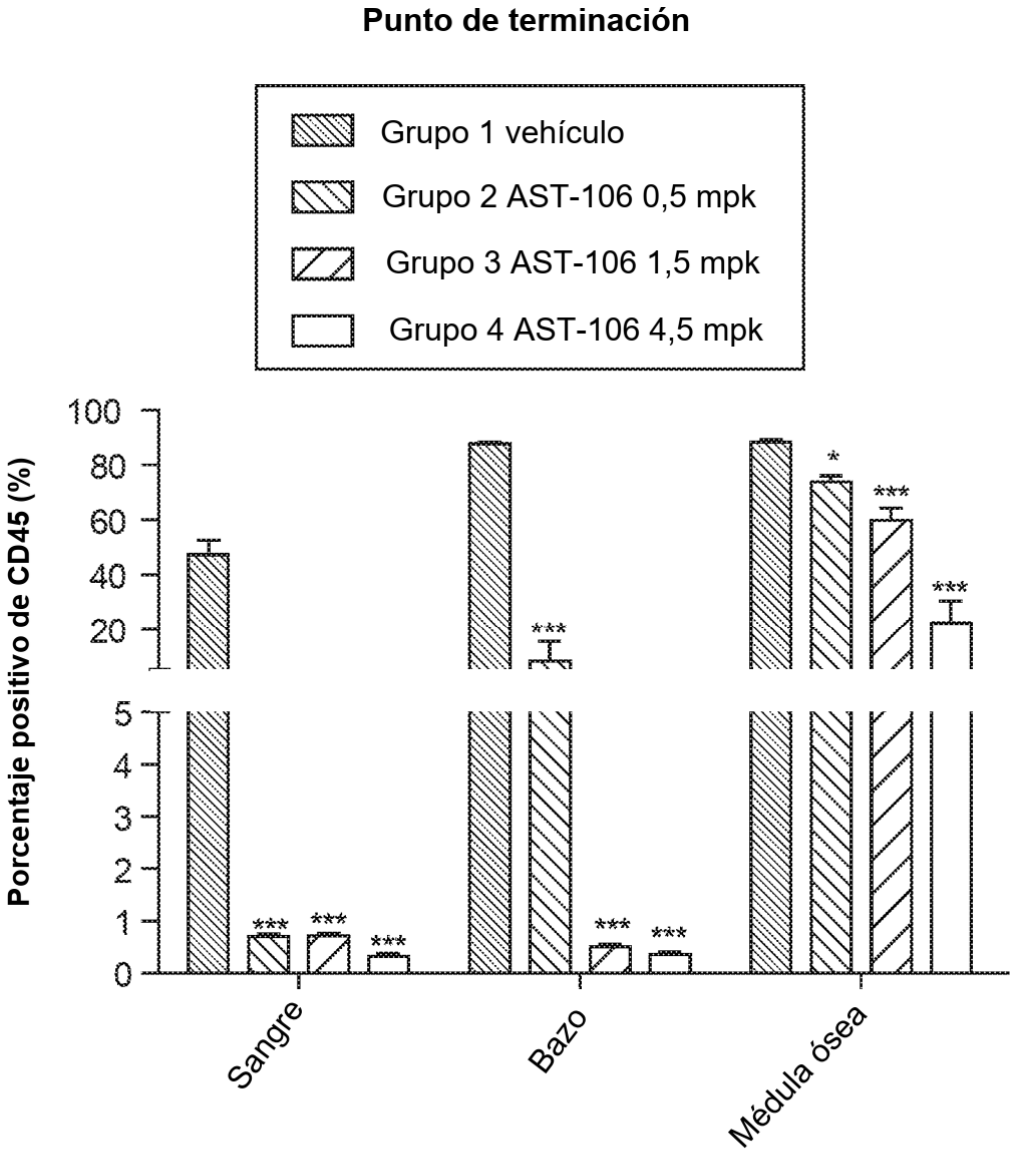

Punto de terminación
Grupo 1 vehículo
Grupo 2 AST-106 0,5 mpk
Grupo 3 AST-106 1,5 mpk
Grupo 4 AST-106 4,5 mpk
Porcentaje positivo de CD45 (%)
100
80
60
40
20
5
4
3
2
1
0
***
*
Sangre
Bazo
Médula ósea

FIG. 12