República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612845-9 A2**

* B R P I 0 6 1 2 8 4 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 29/06/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/685

(54) Título: **COMPOSTO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO**

(30) Prioridade Unionista: 29/06/2005 US 60/695755

(73) Titular(es): Threshold Pharmaceuticals, Inc

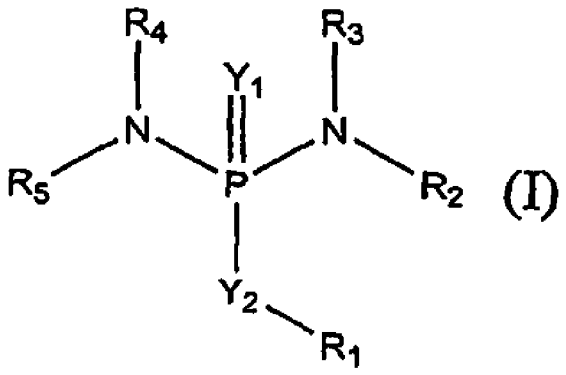
(72) Inventor(es): Hailong Jiao, Jacob Kaizeman, Jian-Xin Duan , Mark Matteucci, Steve Ammons

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006025881 de 29/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/002931de 04/01/2007

(57) Resumo: COMPOSTO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO. Drogas alquiladoras de fosforoamidato podem ser usadas para tratar câncer quando administradas sozinhas ou em combinação com um ou mais agentes anti-neoplásicos.



(I)

Pet. 020090059323
PI 0612845-9

"COMPOSTO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO"

Referências cruzadas a pedidos relacionados

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de patente provisional dos E.U.A. nº 60/695.755 depositado em 29 de junho de 2005, que é incorporado aqui por referência.

Fundamentos da invenção

Campo da invenção

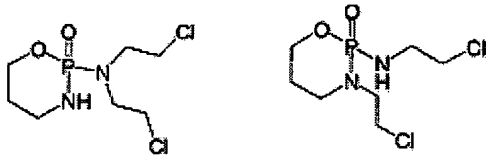
A presente invenção proporciona composições e métodos para tratar câncer e outras condições de doença hiperproliferativa com pró-drogas de alquilador de fosforoamidato. A presente invenção refere-se de uma maneira geral aos campos da química, biologia, biologia molecular, farmacologia, e medicina.

Descrição da técnica relacionada

Agentes alquiladores ("alquiladores" ou "mostardas") usados na quimioterapia do câncer compreendem um grupo distinto de químicos que têm a capacidade de alquilar macromoléculas biologicamente vitais, como DNA, em condições fisiológicas (ver Hardman *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 2001, 1389-1399, McGraw-Hill, New York, E.U.A.). A alquilação de DNA é postulada como sendo um mecanismo importante na atividade antitumor dos alquiladores. Os alquiladores quimioterápicos atuam como eletrófilos fortes, por exemplo, por meio da formação de intermediários *ônio* estabilizados com heteroátomo adjacente, como um cátion aziridínio ou aziridina.

Alquiladores baseados em fosforoamidato usados na terapia do câncer, como Ciclofosfamida e Ifosfamida, são uma subclasse importante de alquiladores quimioterápicos. Ciclofosfamida e Ifosfamida são ativadas, cada uma, no fígado e o alquilador ativo liberou porções nucleofílicas alquiladas,

como o DNA nas células de tumor, atuando como um agente quimioterápico. Se os alquiladores ativos são liberados para longe do tumor, então DNA e outras porções nucleofílicas, como os grupos fosfato, amino, sulfidrila, hidroxila, carboxila e imidazo de biomoléculas de células saudáveis não-cancerosas, podem se tornar alquilados. Referida alquilação de células saudáveis pode resultar em eventos tóxicos indesejados em pacientes (ver Hardman *et al.*, acima).



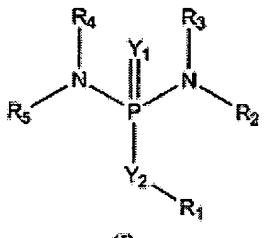
Ciclofosfamida e **Ifosfamida**

Permanece uma necessidade de novos alquiladores à base de fosforoamidato que podem ser usados para tratar câncer ou outras condições de doenças hiperproliferativas, de preferência compostos menos tóxicos para células normais. A presente invenção atende estas necessidades e proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato inéditas e também métodos de terapia empregando as mesmas, como resumido na seção a seguir.

Breve resumo da invenção

Em um aspecto a presente invenção proporciona compostos que são pró-drogas de alquilador de fosforoamidato ativadas com hipoxia e métodos para sua síntese. As pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção podem apresentar a fórmula Alq-T, em que Alq é um alquilador de fosforoamidato, T é L-Z_3 em que L é um ligante, Z_3 é um grupo biorredutor.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato de fórmula (I):



(I)

Y_1 é O, S, NR_6, ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, ou heteroarila;

Y_2 é O, S, NR_6, $NCOR_6$, ou NSO_2R_6;

cada um de R_1-R_5 é independentemente hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla; ou, em conjunto,

quaisquer dois de R_1-R_5 formam um C_3-C_{10} heterociclo; ou cada um de R_1-R_5 é independentemente um disparador T em que T é L-Z_3

L é selecionado dentre

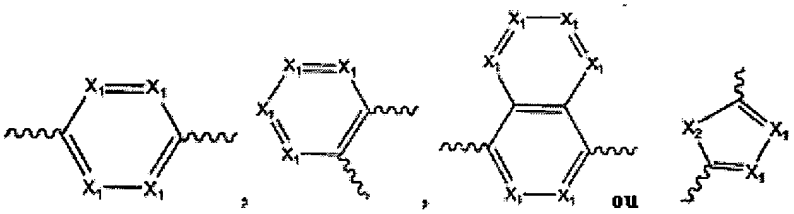
$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}[C(=O)\text{-}O]_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[\text{-}C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$ e $-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}(S(=O)_2)_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_2\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$; em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

Y_3 é S, O, ou NR_7 em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

Y_4 é O, S, ou $-NR_7\text{-}C(=O)\text{-}O-$;

cada Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, heteroarila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

Z_2 é C_1-C_6 alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno,

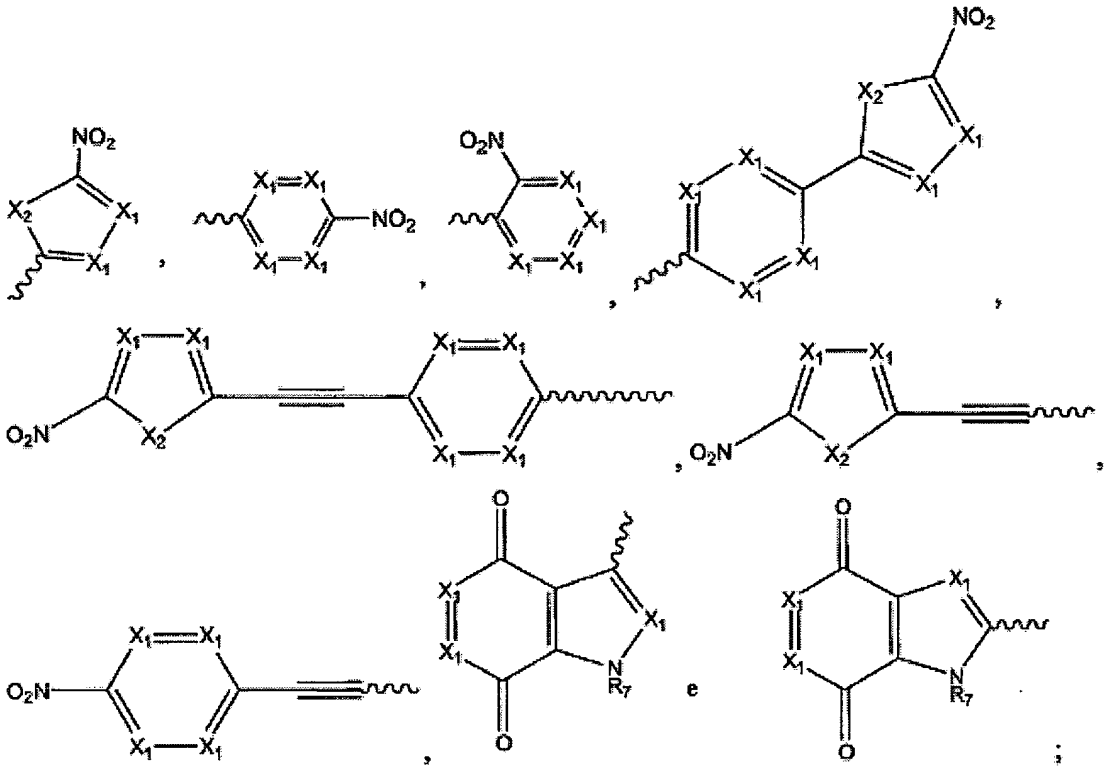


em que cada X_1 é independentemente N ou CR_8, cada R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, nitro, ciano, CO_2H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-

C_6 dialquilamino, arila, $CON(R_7)_2$, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

Z_3 é selecionado do grupo que consiste de:



com a condição de que na fórmula (I):

(i) pelo menos dois de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é  ou

(iii) NR_2R_3 e NR_4R_5 são ambos, em conjunto ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-

racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Em uma concretização, Z_3 é um grupo biorredutor que pode aceitar um ou mais elétrons em uma reação de oxidação-redução.

Em uma concretização relacionada, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato apresentando IC_{50} ou GI_{50}, em células sob hipoxia, de 50 μM a 0,01 nm. Em uma concretização relacionada, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato apresentando citotoxicidade hipóxica que é até um milhão de vezes, até 10.000 vezes, e até 1000 vezes menos tóxica em células normóxicas correspondentes. Em uma concretização relacionada, a citotoxicidade celular é medida por meio de ensaios de antiproliferação e usando-se o valor IC_{50} relativo de um composto em células hipóxicas e normóxicas. Em uma concretização relacionada, a citotoxicidade celular é medida por meio de ensaios clonogênicos e usando-se os valores relativos de C_{10}, C_{50}, ou C_{90} dos compostos em células hipóxicas e normóxicas.

Em outra concretização relacionada, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato apresentando valores IC_{50}, em células sob hipoxia, de 50 μM a 0,01 nM. Em outra concretização relacionada, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que são até 5000 menos tóxicas em células normóxicas correspondentes conforme medido pelos valores IC_{50} relativos em células hipóxicas e normóxicas. Em outra concretização relacionada, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato apresentando uma IC_{50} em células em hipoxia de 50 μM a 0,01 nM e que é até 1000 vezes menos tóxica em células normóxicas correspondentes conforme medido pelos valores IC50 relativos em células hipóxicas e normóxicas.

Em uma concretização relacionada, pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica

de 0,1 nM a 50 μM e uma relação de hipoxia citotoxicidade, HCR, medida por meio da relação de citotóxicas normóxicas e hipóxicas, e definido com mais detalhe mais adiante no pedido, de 10 a 100.000. Em uma concretização relacionada, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica de 0,1 nM a 50 μM e uma HCR de 25 a 100.000. Em outra concretização relacionada, pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica de 0,1 nM a 5 μM e uma HCR de 50 a 10.000.

Em um aspecto a presente invenção proporciona alquiladores de fosforoamidatos inéditos para tratamento de câncer e outras doenças hiperproliferativas.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma formulação farmacêutica compreendendo as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção e um excipiente, veículo, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer e outras doenças hiperproliferativas compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção ou uma que é conhecida, a um paciente que necessita desse tipo de referida. Em uma concretização, o câncer tratado é resistente a terapia de primeira linha, segunda linha, ou terceira linha, ou é um câncer reicindente. Em outra concretização, o câncer tratado é um câncer metastático. Em outra concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção, ou uma que é conhecida, é administrada em combinação com pelo menos outro agente anticâncer.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1 demonstra o efeito do Composto 25 (50 mg/kg) sobre crescimento de tumor no modelo de enxerto exógeno H460 em camundongo.

Figura 2 demonstra o efeito do Composto 25 (100 mg/kg)

sobre crescimento de tumor no modelo de enxerto exógeno H460 em camundongo.

Figura 3 demonstra o efeito do Composto 25 (150 mg/kg) dosado em combinação com CDDP sobre crescimento de tumor no modelo de enxerto exógeno H460 em camundongo.

Figura 4 demonstra o efeito do Composto 25 dosado em combinação com CDDP sobre crescimento de tumor no modelo de enxerto exógeno H460 em camundongo.

Figuras 5, 6 e 7 demonstram o efeito do Composto 25 em combinação com Gemcitabina sobre crescimento de tumor no modelo de enxerto exógeno H460 em camundongo.

Descrição detalhada da invenção

A descrição detalhada dos diferentes aspectos e concretizações da presente invenção é organizada como a seguir: Seção I proporciona definições úteis; Seção II descreve os compostos da invenção e métodos para preparação dos mesmos; Seção III descreve métodos de tratamento, terapias, administrações, e formulações, empregando os compostos da invenção sozinhos ou em combinação; e Seção IV proporciona exemplos de métodos sintéticos e ensaios biológicos para os compostos da invenção. Esta descrição detalhada é organizada em seções apenas visando a conveniência do leitor, e revelação encontrada em qualquer seção é aplicável a qualquer aspecto da invenção.

I. Definições

As definições a seguir são proporcionadas para auxiliar o leitor. Exceto se definido de outra forma, todos os termos de técnica, anotações e outros termos médicos ou científicos ou a terminologia usada aqui devem ter os significados comumente compreendidos por aqueles com prática nas técnicas químicas e médicas. Em alguns casos, termos com significados comumente compreendidos são definidos aqui visando clareza

e/ou fácil referência, e a inclusão de referidas definições aqui não deveria ser interpretada como representando uma diferença substancial relativamente à definição do termo como geralmente compreendido na técnica.

Como usado aqui, "um" ou "uma" meio "pelo menos um" ou "um ou mais".

"Alquila" significa um radical hidrocarboneto monovalente saturado linear ou um radical hidrocarboneto monovalente saturado ramificado apresentando o número de átomos de carbono indicado no prefixo. Como usado nesta revelação, os prefixos (C_1-C_{qq}), C_1-$_{qq}$, ou C_1-C_{qq}, em que qq é um número inteiro de 2 a 20, têm os mesmos significados. Por exemplo, (C_1-C_6) alquila, C_1-$_8$ alquila, ou C_1- C_8 alquila inclui metila, etila, n-propila, 2-propila, n-butila, 2-butila, t-butila, pentila, e análogos. Para cada uma das definições dadas aqui (p. ex., alquila, alquenila, alcóxi, aralquilóxi), quando um prefixo não é incluído para indicar o número de átomos de carbono da cadeia principal em uma porção alquila, o radical ou porção do mesmo possuirá seis ou menos átomos de carbono na cadeia principal. (C_1-C_6) alquila pode ser opcionalmente substituído adicionalmente por substituintes, incluindo por exemplo, deutério ("D"), hidroxila, amino, mono ou di(C_1-C_6) alquil-amino, halo, C_2-C_6 alquenil éter, ciano, nitro, etenila, etinila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquiltio, -COOH, -$CONH_2$, mono- ou di(d-C_6) alquilcarboxamido, -SO_2NH_2, -OSO_2-(C_1-C_6) alquila, mono ou di(C_1-C_6) alquilsulfonamido, arila, heteroarila, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi ou heteroarilsulfonilóxi.

"Alquenila" significa um radical hidrocarboneto monovalente linear ou um radical hidrocarboneto monovalente ramificado apresentando o número de átomos de carbono indicado no prefixo e contendo pelo menos uma dupla ligação, porém não mais do que três duplas ligações. Por exemplo, (C_2-C_6) alquenila inclui, etenila, propenila, 1,3-butadienila e análogos. Alquenila pode ser opcionalmente substituído adicionalmente por

substituintes, incluindo por exemplo, deutério ("D"), hidroxila, amino, mono ou di(C_1-C_6) alquila amino, halo, C_2-C_6 alquenil éter, ciano, nitro, etenila, etinila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquiltio, -COOH, -$CONH_2$, mono- ou di(C_1-C_6) alquilcarboxamido, -SO_2NH_2, -OSO_2-(C_1-C_6) alquila, mono ou di(C_1-C_6) alquilsulfonamido, arila, heteroarila, alquila ou heteroalquilsulfonilóxi, e arila ou heteroarilsulfonilóxi.

"Alquilador" significa uma porção reativa capaz de formar uma ligação alquila covalente com macromoléculas via uma reação eletrofílica com um nucleófilo na macromolécula. "Alquilador de fosforoamidato" significa um alquilador para o qual um eletrófilo de aziridínio ou aziridina está presente ou é gerado por meio de ciclização intramolecular.

"Alquileno" significa um radical hidrocarboneto divalente saturado linear apresentando de um a doze átomos de carbono ou um radical hidrocarboneto divalente saturado ramificado apresentando de um a doze átomos de carbono opcionalmente substituídos por substituintes incluindo por exemplo, deutério ("D"), hidroxila, amino, mono ou di(C_1-C_6)alquila amino, halo, C_2-C_6 alquenil éter, ciano, nitro, etenila, etinila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquiltio, -COOH, -$CONH_2$, mono- ou di- -SO_2NH_2, -OSO_2-(C_1-C_6) alquila, mono ou di(C_1-C_6) alquilsulfonamido, arila, heteroarila, alquila ou heteroalquilsulfonilóxi, e arila ou heteroarilsulfonilóxi. Por exemplo, alquileno inclui metileno, etileno, propileno, 2- metil-propileno, pentileno, hexileno, e análogos.

"Heteroalquileno" tem substancialmente o significado dado acima para um alquileno exceto que um ou mais heteroátomos (i.e. oxigênio, enxofre, nitrogênio e/ou fosforoso) podem estar presentes no bi-radical alquileno. Por exemplo, heteroalquileno inclui, -CH_2OCH_2O-,-$CH_2CH_2OCH_2CH_2$-, -$CH_2CH_2N(CH_3)CH_2CH_2$-, -$CH_2CH_2SCH_2CH_2$-, e análogos.

"Arila" refere-se a um radical hidrocarboneto aromático monocíclico ou bicíclico monovalente com de 6 a 10 átomos de anel que é substituído independentemente por de um a oito substituintes, de preferência um, dois, três, quatro ou cinco substituintes selecionados dentre deutério ("D"), alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, halo, nitro, ciano, hidroxila, alcóxi, amino, acilamino, mono- alquilamino, di-alquilamino, haloalquila, haloalcóxi, heteroalquila, COR (em que R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, fenila ou fenilalquila), $-(CR'R")_n-COOR$ (em que n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, e R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila) ou $-(CR'R")_n-CONR^xR^y$ (em que n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, e R^x e R^y são independentemente selecionado dentre hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila). Em uma concretização, R^x e R^y em conjunto são cicloalquila ou heterociclila. Mais especificamente, o termo arila inclui, embora sem limitação, fenila, bifenila, 1-naftila, e 2-naftila, e as suas formas substituídas.

"Cicloalquila" refere-se a um radical hidrocarboneto cíclico monovalente de três a sete carbonos no anel. O grupo cicloalquila pode apresentar uma ou mais duplas ligações e também pode ser opcionalmente substituído independentemente por um, dois, três ou quatro substituintes selecionados dentre alquila, fenila opcionalmente substituído, ou $-C(O)R^2$ (em que R^z é hidrogênio, alquila, haloalquila, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, hidroxila, alcóxi, ou fenila opcionalmente substituído). Mais especificamente, o termo cicloalquila inclui, por exemplo, ciclopropila, ciclo-hexila, ciclo-hexenila, fenilciclo-hexila, 4-carboxiciclo-hexila, 2-carboxamidociclo-hexenila, 2- dimetilaminocarbonil-ciclo-hexila, e análogos.

"Heteroalquila" significa um radical alquila como definido aqui com um, dois ou três substituintes selecionados independentemente

dentre ciano, $-OR^W$, $-NR^XR^Y$, e $-S(O)_PR^Z$ (em que p é um número inteiro de 0 a 2), com a compreensão de que o ponto de ligação do radical heteroalquila é através de um átomo de carbono do radical heteroalquila. R^W é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, arila, aralquila, alcoxicarbonila, ariloxicarbonila, carboxamido, ou mono- ou di-alquilcarbamoíla, R^X é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, arila ou aralquila. R^Y é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, arila, aralquila, alcoxicarbonila, ariloxicarbonila, carboxamido, mono- ou di-alquilcarbamoila ou alquilsulfonila. R^Z é hidrogênio (desde que n seja 0), alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, arila, aralquila, amino, mono- alquilamino, di-alquilamino, ou hidroxialquila. Exemplos representativos incluem, por exemplo, 2-hidroxietila, 2,3-diidroxipropila, 2-metoxietila, benziloximetila, 2-cianoetila, e 2-metilsulfonil-etila. Para cada um dos indicados acima, R^W, R^X, R^Y, e R^Z podem ser substituídos adicionalmente por amino, halo, flúor, alquilamino, di-alquilamino, OH ou alcóxi. Adicionalmente, o prefixo que indica o número de átomos de carbono (p. ex., C_1-C_{10}) refere-se ao número total de átomos de carbono na porção do grupo heteroalquila exclusive das porções ciano, $-OR^W$, $-NR^XR^Y$, ou $-S(O)_PR^Z$.

Em uma concretização, R^X e R^Y juntamente são cicloalquila ou heterociclila.

"Heteroarila" significa um radical monocíclico, bicíclico ou tricíclico monovalente com de 5 a 12 átomos de anel apresentando pelo menos um anel aromático contendo um, dois, ou três heteroátomos do anel selecionados dentre N, O, ou S, em que os átomos de anel remanescentes são C, com a compreensão de que o ponto de ligação do radical heteroarila será no anel aromático. O anel heteroarila é opcionalmente substituído independentemente por de um a oito substituintes, de preferência um, dois, três ou quatro substituintes, selecionados dentre alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, halo, nitro, ciano, hidroxila, alcóxi, amino, acilamino,

mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquila, haloalcóxi, heteroalquila, -COR (em que R é hidrogênio, alquila, fenila ou fenilalquila, - $(CR'R'')_n$-COOR (em que n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, e R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, fenila ou fenilalquila), ou - (CR'R")n-$CONR^xR^y$ (em que n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, e R^x e R^y são, independentemente um do outro, hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquil-alquila, fenila ou fenilalquila). Em uma concretização, R^x e R^y em conjunto são cicloalquila ou heterociclila. Mais especificamente o termo heteroarila inclui, embora sem limitação, piridila, furanila, tienila, tiazolila, isotiazolila, triazolila, imidazolila, isoxazolila, pirrolila, pirazolila, piridazinila, pirimidinila, benzofuranila, tetraidrobenzofuranila, isobenzofuranila, benzotiazolila, benzoisotiazolila, benzotriazolila, indolila, isoindolila, benzoxazolila, quinolila, tetraidroquinolinila, isoquinolila, benzimidazolila, benzisoxazolila ou benzotienila, indazolila, pirrolopirimidinila, indolizinila, pirazolopiridinila, triazolopiridinila, pirazolopirimidinila, triazolopirimidinila, pirrolotriazinila, pirazolotriazinila, triazolotriazinila, pirazolotetrazinila, hexaazaindenila, e heptaazaindenila e os seus derivados. Exceto se indicado de outra forma, a disposição dos heteroátomos no anel pode ser qualquer disposição permitida pelas características de ligação dos átomos de anel constituintes.

"Heterociclila" ou "ciclo-heteroalquila" significa um anel cíclico não-aromático saturado ou insaturado com de 3 a 8 átomos de anel em que de um a quatro átomos de anel são heteroátomos selecionado dentre O, NR (em que R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila), $P(=O)OR^W$, ou $S(O)_P$ (em que p é um número inteiro de 0 a 2), em que os átomos de anel remanescentes são C, em que um ou dois átomos de C podem ser opcionalmente substituídos por um grupo carbonila. O anel heterociclila pode ser opcionalmente substituído independentemente por um,

dois, três ou quatro substituintes selecionados dentre alquila, arila, arilalquila, heteroarila, heteroarilalquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, halo, nitro, ciano, hidroxila, alcóxi, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquila, haloalcóxi, -COR (em que R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila), $-(CR'R'')_n-COOR$ (n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, e R é hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila), ou $-(CR'R'')_n-CONR^xR^y$ (em que n é um número inteiro de 0 a 5, R' e R" são independentemente hidrogênio ou alquila, R^x e R^y são, independentemente um do outro, hidrogênio, alquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, fenila ou fenilalquila). Mais especificamente, o termo heterociclila inclui, embora sem limitação, piridila, tetraidropiranila, N-metilpiperidin-3-ila, N-metilpirrolidin-3-ila, 2-pirrolidon-1-ila, furila, quinolila, tienila, benzotienila, pirrolidinila, piperidinila, morfolinila, pirrolidinila, tetraidro furanila, tetraidrotiofuranila, 1,1-dioxo-hexaidro-$1\Delta^6$-tiopiran-4-ila, tetraidroimidazo [4,5-c] piridinila, imidazolinila, piperazinila, e piperidin-2-inila e os seus derivados. O prefixo que indica o número de átomos de carbono (p. ex., C_3-C_{10}) refere-se ao número total de átomos de carbono na porção do grupo ciclo-heteroalquila ou heterociclila exclusive o número de heteroátomos.

"C_1-C_6 Acila" significa -CO-(C_1-C_6 alquila), em que o termo alquila é como definido acima.

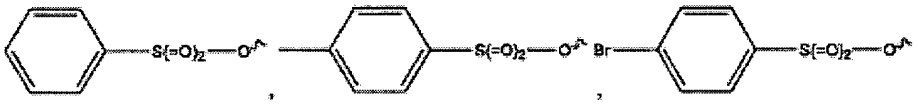
"C_1-C_6 Heteroacila" significa -CO-(C_1-C_6 heteroalquila), em que o termo heteroalquila é como definido acima.

"Aroíla" significam -CO-arila, em que o termo arila é como definido acima.

"Heteroaroíla" significa -CO-heteroaila, em que o termo heteroarila é como definido acima.

"R_{sul}sulfonilóxi" significa R_{sul}-$S(=O)_2$-O- incluindo alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, cicloalquilsulfonilóxi,

heterociclilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi e heteroarilsulfonilóxi em que R_{sul} é alquila, heteroalquila, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila respectivamente, e em que alquila, heteroalquila, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila são definidos acima. Exemplos de alquilsulfonilóxi incluem Me-$S(=O)_2$-O-, Et- $S(=O)_2$-O-, CF_3-$S(=O)_2$-O- e análogos, e exemplos de arilsulfonilóxi incluem



e análogos.

Grupos alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, cicloalquilsulfonilóxi, heterociclilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, e heteroarilsulfonilóxi podem ser grupos de saída em alquiladores de fosforoamidatos e podem ser substituídos em uma célula por ácidos nucleicos, como DNA ou RNA, e imidazóis, carboxilatos, ou tióis de proteínas, causando alquilação e morte celular. A taxa de reação de vários grupos R_{sul}sulfonilóxi com ácidos nucleicos, proteínas ou água pode ser modulada dependendo, por exemplo, da natureza retiradora de elétrons e do volume estérico da porção R_{sul} e pode proporcionar alquiladores de fosforoamidatos e pró-drogas dos mesmos que são mais tóxicos para tumores em geral e zonas de tumor hipóxicas, em particular em células saudáveis.

"Substituintes" significam, juntamente com substituintes particularmente descritas na definição de cada um dos grupos acima, aqueles selecionados dentre: deutério, -halogênio, -OR', -NR'R", -SR', -SiR'R "R'", -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R'", -NR"$C(O)_2$R', -NH-$C(NH_2)$=NH, -NR'$C(NH_2)$=NH, -NH-$C(NH_2)$=NR', - S(O)R', -$S(O)_2$R', -S(O) $_2$NR'R", -NR'$S(O)_2$R", -CN e -NO_2, -R', -N_3, perfluoro(C_1-C_4) alcóxi, e perfluoro(C_1-C_4) alquila, em um número compreendendo de zero até o número total de valências abertas no radical; e em que R', R" e R'" são selecionados independentemente dentre hidrogênio,

grupos C_{1-8} alquila, C_{3-6} cicloalquila, C_{2-8} alquenila, C_{2-8} alquinila, arila não substituído e heteroarila, (arila não substituída)-C_{1-4} alquila, e arilóxi não substituído-C_{1-4} alquila, arila substituído por de 1 a 3 halogênios, C_{1-8} alquila não substituído, C_{1-8} alcóxi ou C_{1-8} tioalcóxi, ou grupos arila não substituído-C_{1-4} alquila. Quando R' e R" são ligados ao mesmo átomo de nitrogênio, eles podem ser combinados com o átomo de nitrogênio para formar um anel com de 3, 4, 5, 6, ou 7 membros. Por exemplo, -NR'R" significa que inclui 1-pirrolidinila e 4-morfolinila. Outros substituintes vantajosos incluem cada um dos substituintes arila acima ligados a um átomo de anel por um alquileno, em conjunto, com de 1 a 4 átomos de carbono. Dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel arila ou heteroarila podem ser substituídos opcionalmente por um substituinte da fórmula -T^2- C(O)-(CH_2)q-U^3-, em que T^2 e U^3 são independentemente -NH-, -O-, -CH_2- ou uma ligação simples, e q é um número inteiro de 0 a 2. Alternativamente, dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel arila ou heteroarila podem ser opcionalmente substituídos por um substituinte da fórmula -A- $(CH_2)_r$-B-, em que A e B são independentemente -CH_2-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)2-, -S(O) 2NR'- ou uma ligação simples, e r é um número inteiro de 1 a 3. Uma das ligações simples do novo anel assim formado pode ser opcionalmente substituída por uma dupla ligação. Alternativamente, dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel arila ou heteroarila podem ser opcionalmente substituídos por um substituinte da fórmula -$(CH_2)_s$-X^5-(CH_2)t-, em que s e t são independentemente números inteiros de 0 a 3, e X^5 é -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, ou -$S(O)_2$NR'-. O substituinte R' em -NR'- e -$S(O)_2$NR'- é selecionado dentre hidrogênio ou C_{1-6} alquila não substituído.

Determinados compostos da presente invenção possuem átomos assimétricos de carbono (centros ópticos) ou duplas ligações; os racemizados, diaestereômeros, isômeros geométricos, regioisômeros e isômeros individuais (p. ex., enanciômeros separados) devem ser

compreendidos no escopo da presente invenção. Os compostos da presente invenção também podem conter proporções não-naturais de isótopos atômicos em um ou mais dos átomos que constituem determinados compostos. Por exemplo, os compostos podem ser rádio-marcados com isótopos radioativos, como por exemplo, trítio (^{3}H), iodo- 125 (^{125}I) ou carbono- 14 (^{14}C). Todas as variações isotópicas dos compostos da presente invenção, quer radioativas ou não, devem ser compreendidas pelo escopo da presente invenção.

O termo "sais farmaceuticamente aceitáveis" significa que inclui sais dos compostos ativos que são preparados com bases ou ácidos relativamente não-tóxicos, dependendo dos substituintes particulares encontrados nos compostos aqui descritos. Quando compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente ácidas, é possível obter sais de adição de base por meio de contato da forma neutra de referidos compostos com uma quantidade suficiente da base desejada, seja pura ou em um solvente inerte vantajoso. Exemplos de sais derivados de bases inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis incluem alumínio, amônio, cálcio, cobre, férrico, ferroso, lítio, magnésio, mangânico, manganoso, potássio, sódio, zinco e análogos. Sais derivados de bases orgânicas farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de aminas primárias, secundárias e terciárias, incluindo aminas substituídas, aminas cíclicas, aminas naturalmente ocorrentes e análogos,, como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenziletilenodiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperadina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromo, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina e análogos. Quando compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente básicas, sais de adição de ácido podem ser obtidos contactando-se a forma neutra de referidos

compostos com uma quantidade suficiente do ácido desejado, seja puro ou em um solvente inerte vantajoso. Exemplos de sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico, bromídrico, nítrico, carboxílico, mono-hidrogenocarboxílico, fosfórico, mono-hidrogenofosfórico, diidrogenofosfórico, sulfúrico, mono-hidrogenossulfúrico, iodídrico, ou ácido fosforoso e análogos, e também os sais derivados de ácidos orgânicos relativamente não-tóxicos, como acético, propiônico, isobutírico, malônico, benzóico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, benzenossulfônico, p-tolilsulfônico, cítrico, tartárico, metanossulfônico, e análogos. Inclui-se também sais de aminoácidos, como arginato e análogos, e sais de ácidos orgânicos, como ácidos glucurônico ou galactunórico e análogos (ver, p. ex., Berge, S.M., *et al*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Determinados compostos específicos da presente invenção contêm tanto funcionalidades básicas como também ácidas que permitem que compostos sejam convertidos a base ou sais de adição de ácido.

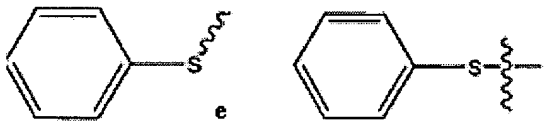
As formas neutras dos compostos podem ser regeneradas por meio de contato do sal com uma base ou ácido, e isolamento do composto parental da maneira convencional. A forma parental do composto difere das várias formas salinas em determinadas propriedades físicas,, como solubilidade em solventes polares, mas, de outra forma, os sais são equivalentes à forma parental do composto para os fins da presente invenção.

Determinados compostos da presente invenção podem existir em formas não-solvatadas e também formas solvatadas, incluindo formas hidratadas. De uma maneira geral, as formas solvatadas são equivaletnes a formas não-solvatadas e devem ser compreendidas no escopo da presente invenção. Determinados compostos da presente invenção podem existir em formas amorfas ou cristalinas múltiplas. De uma maneira geral, todas as

formas físicas são equivalentes para os usos considerados pela presente invenção e devem ser compreendidas no escopo da presente invenção.

Como usado aqui, um "análogo de glicose" inclui mono-, di- e tri-sacarídeos. O análogo de glicose inclui sacarídeos compreendendo glucosamina, N-acetil-glucosamina; frutose; manose e derivados de manose; glicose e derivados de glicose, incluindo, embora sem limitação, 2-desoxiglicose (2-DG), N-acetil-2-amino-2-desoxiglicose, de 3 a amino-3-desóxi-glicose, 2-amino-2-desóxi-glicose; e galactose e derivados de galactose incluindo, embora sem limitação, D-2-desóxi-D-galactose, D-4-amino-4-desóxi-galactose e D-2-amino-2-desóxi-galactose. Assim, o análogo de glicose pode diferir de glicose ou um derivado, como DG e glucosamina pelo fato de que é um epímero do mesmo. Adicionalmente, o análogo de glicose pode ser um derivados fluorado de qualquer um dos compostos precedentes. Além disso, o oxigênio no anel de qualquer um dos compostos precedentes pode ser substituído por um isoéster selecionado do grupo que consiste de S, sulfona, e análogos. Por exemplo, análogo de glicose pode ser 5-tio-D-glicose ou um derivado do mesmo.

Uma linha ondulada "∿∿" significa o ponto de ligação de um grupo ou porção a outra. Por exemplo, ambos



e

incidam que o grupo tio é o ponto de ligação a outro grupo ou porção.

Os termos CO, C(O), C(=O), -CO- são usados aqui intercambiavelmente. Os termos CO_2 e COO são usados intercambiavelmente aqui. Os termos; SO_2, $S(O)_2$ são usados intercambiavelmente aqui. Os termos SO e S(=O) são usados intercambiavelmente aqui. Os termos PO e P(=O) são usados intercambiavelmente aqui.

Como usado aqui, um "bioisóstero" de uma porção química, como molécula, grupo, ou átomo, significa outra porção química

apresentando disposição espacial de par ou pares de elétrons e tamanhos similares. Bioisósteros e bioisoesterismo são ferramentas bem conhecidas para predizer as atividades biológias de compostos, com base na premissa de que compostos com tamanho, forma, e densidade de elétrons similar podem apresentar atividade biológica. Substituições bioisoestéricas conhecidas incluem, por exemplo, a intercambialidade de -F, -OH, $-NH_2$, -Cl, e $-CH_3$; a intercambialidade de -Br e $-i-C_3H_7$; a intercambialidade de -I e $-t-C_4H_9$; a intercambialidade de -O-, -S-, -NH-, $-CH_2$, e -Se-; a intercambialidade de -N=, -CH=, e -P= (em porções cíclicas ou não-cíclicas); a intercambialidade de grupos fenila e piridila; a intercambialidade de -C=C- e -S- (por exemplo, benzeno e tiofeno); a intercambialidade de um nitrogênio aromático (R_{ar}-$N(R_{ar})$-R_{ar}) para um carbono insaturado (R_{ar}- $C(=R_{ar})$-R_{ar}); e a intercambialidade de -CO-, -SO-, e $-SO_2$-. Estes exemplos não se limitam à faixa de equivalentes bioisoestéricos, e alguém com prática na técnica será capaz de identificar outras substituições bioisoestéricas conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Patani *et al*, 1996, *Chem. Rev.* 96:3147-76; e Burger, 1991, *A Prog. Drug Res.* 37:287-371.

Uma predição quantitativa razoável da capacidade de ligação ou a função de uma molécula conhecida pode ser realizada com base na disposição espacial de um pequeno número de átomos ou grupos funcionais na molécula. Como usado aqui, uma disposição do tipo referido é denominada um "farmacóforo", e uma vez que o farmacóforo ou farmacóforos em uma molécula foram identificados, esta informação pode ser usada para identificar outras moléculas contendo os mesmos farmacóforos ou similares. Referidos métodos são bem conhecidos por pessoas com prática ordinária na técnica da química medicinal, e como a informação estrutural descrita neste pedido identifica o farmacóforo de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato e alquiladores de fosforoamidatos. Um exemplo de programas disponíveis para realizar buscas relacionadas com farmacóforos é o programa de busca *3D*

Pharmacophore do *Chemical Computing Group* (ver http: //www. chemcomp.com/fdept/prodinfo.htm).

"Opcional" ou "opcionalmente" significa que o evento ou circunstância descrita subseqüentemente pode, mas não precisa, ocorrer, e que a descrição inclui casos em que o evento ou circunstância ocorre e em que não ocorre. Por exemplo, "grupo heterociclo opcionalmente mono- ou di-substituído por um grupo alquila" significa que o alquila pode, mas não precisa, estar presente, e a descrição inclui situações em que o grupo heterociclo é mono- ou dissubstituído por um grupo alquila e situações em que o grupo heterociclo não é substituído por um grupo alquila.

Uma combinação de substituintes ou variáveis só é permissível se uma referida combinação resulta em um composto estável ou quimicamente exequível. Um composto estável ou composto quimicamente exequível é um em que a estrutura química não é substancialmente alterada quando mantido a uma temperatura de 4 °C ou menos, na ausência de umidade ou outras condições quimicamente reativas, durante pelo menos uma semana.

Como usado aqui, uma "pró-droga" significa um composto que, após administração, é metabolizado ou, de outra forma, convertido a uma forma ativa ou mais ativa com relação a pelo menos uma propriedade biológica, relativamente a si mesmo. Para produzir uma pró-droga, um composto farmaceuticamente aceitável (ou um precursor vantajoso do mesmo) é modificado quimicamente de tal modo que a forma modificada é menos ativa ou inativa, mas a modificação química é eficazmente reversível em determinadas condições biológicas de tal modo que uma forma farmaceuticamente ativa do composto é gerada por meio de processos metabólicos ou outros processos biológicos. Uma pró-droga pode apresentar, relativamente à droga, características de transporte ou estabilidade metabólica alterada, menos efeitos colaterais ou menor toxicidade, ou aroma

aperfeiçoado, por exemplo, (ver a referência Nogrady, 1985, *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, páginas 388-392). Pró-drogas também podem ser preparadas usando-se compostos que não são drogas, mas que, após ativação em determinadas condições biológicas, geram um composto farmaceuticamente ativo. Como usado aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é uma pró-droga que, ao ser ativada, libera o alquilador de fosforoamidato ativo.

Como usado aqui, um "agente citotóxico" é um agente ou composto que produz um efeito tóxico em células. Como usado aqui, um "agente citostático" é um agente que inibe ou suprime crescimento e multiplicação celular.

Como usado aqui "células hipóxicas" são células que se encontram em um ambiente hipóxico *in vivo*, como, por exemplo, em uma zona de tumor hipóxica, ou *in vitro*. Como usado aqui "células normóxicas" são células que se encontram em um ambiente normóxico *in vivo* ou *in vitro*. Como usado aqui "citotoxicidade hipóxica" de um composto ou agente é sua citotoxicidade em células hipóxicas. Como usado aqui "citotoxicidade normóxica" de um composto ou agente é sua citotoxicidade em células normóxicas.

Como usado aqui, um "grupo bio-redutor" refere-se a um grupo que aceita elétrons em uma reação de oxidação-redução. O grupo bio-redutor é um grupo (1) que pode ser reduzido, i.e., um grupo que pode aceitar elétrons, hidrogênio, e/ou ou um íon hidreto; (2) que pode ser reduzido *in vivo* e/ou *in vitro*; (3) que pode ser reduzido *in vivo* e/ou *in vitro* sob hipoxia; (4) que pode ser reduzido *in vivo* e/ou *in vitro* por meio de DT-diaforase, tióis, ou via meios fotoquímicos ou eletroquímicos; ou (5) que podem ser eliminados e/ou clivados por meio de um processo biológico,, como por meio de hidrólise enzimática, metabolismo etc.

Por exemplo, e como descrito mais detalhadamente abaixo, um

grupo biorredutor é um nitroimidazol que pode ser substituído por uma variedade de grupos. Outros exemplos de grupos biorredutors incluem, embora sem limitação, grupos baseados em nitrobenzenos com deficiência de elétrons, amidas de ácido nitrobenzóico com deficiência de elétrons, nitroazóis, nitroimidazóis, nitrotiofenos, nitrotiazóis, nitrooxazóis, nitrofuranos, e nitropirróis, em que cada uma destas classes de porções pode ser opcionalmente substituída, de tal modo que o potencial redox para o grupo biorredutor se situe numa faixa em que o grupo pode ser submetido a redução nas condições hipóxicas de um tumor, por meio de DT-diaforase, e/ou por meio de um tiol. Alguém com prática na técnica compreenderá, considerando a revelação aqui apresentada, como substituir estes e outros grupos biorredutors para proporcionar um grupo biorredutor apresentando um potencial redox que se situa dentro de referida faixa.

De uma maneira geral, alguém com prática na técnica será capaz de "ajustar" o potencial redox de um grupo biorredutor mediante modificação daquele grupo para conter grupos retiradores de elétrons, grupos doadores de elétrons, ou alguma combinação de referidos grupos. Por exemplo, grupos nitrotiofeno, nitrofurano, e nitrotiazol podem ser substituído por um ou mais grupos doadores de elétrons, incluindo, embora sem limitação, grupos metila, metóxi, ou amina, para obter o potencial redox desejado. Em outro exemplo, a porção nitropirrol pode ser substituída por um grupo retirador de elétron, incluindo, embora sem limitação, grupos ciano, carboxamida, $-CF_3$, e sulfonamida, para se obter o potencial redox desejado. Para tal fim, é possível usar grupos retiradores de elétron, como ciano, sulfona, sulfonamida, carboxamida, ou $-CF_3$, e grupos retiradores de elétrons brandos, como $-CH_2$-halogênio, em que halogênio é -F, -Cl, ou -Br.

Como usado aqui, um "agente anti-neoplásico", "agente anti-tumor", ou "agente anti-câncer", refere-se a qualquer agente usado no tratamento de câncer. Referidos agentes podem ser usados sozinhos ou em

combinação com outros compostos e podem aliviar, reduzir, melhorar, prevenir, ou colocar ou manter em um estado de remissão de sintomas clínicos ou marcadores diagnósticos associados com neoplasma, tumor ou câncer. Agentes anti-neoplásicos incluem, embora sem limitação, agentes anti-angiogênicos, agentes alquiladores ou alquiladores, antimetabólito, determinados produtos naturais, complexos de coordenação de platina, antracenodionas, uréias dissubstituídas, derivados de metil-hidrazina, supressores adrenocorticóides, determinados hormônios e antagonistas, polissacarídeos anti-câncer, quimioprotetores, e determinados extratos de ervas ou outras plantas.

Como usado aqui, "câncer" refere-se a um grupo de mais de 100 doenças causadas pelo crescimento descontrolado e a disseminação de células anormais que podem tomar a forma de tumores sólidos, linfomas, e cânceres não-sólidos, como leucemia.

Como usado aqui, "câncer maligno" refere-se a célula de câncer ou de cânceres que apresentam a capacidade de metástase, com perda de controle de crescimento e posicional.

Como usado aqui, "neoplasma" (neoplasia) ou "tumor" refere-se a crescimento anormal de tecido ou de células novas, o que pode ser benigno ou maligno.

Como usado aqui, "tratar" uma condição ou paciente refere-se a empreender etapas para se obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para os fins desta invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, embora sem limitação, alívio ou melhoramento de um ou mais sintomas de câncer ou outras condições de doenças hiperproliferativas, diminuição da extensão da doença, retardo ou desaceleração da progressão da doença, melhoramento, paliativo, ou estabilização do estado de doença, e outros resultados descritos abaixo.

Como usado aqui, "redução" de um sintoma ou sintomas (e

equivalentes gramaticais desta expressão) significa redução da gravidade ou freqüência do(s) sintoma(s), ou eliminação do(s) sintoma(s).

Como usado aqui, "administrar" ou "administração de uma droga a um sujeito (e equivalentes gramaticais desta expressão) inclui tanto administração direta, incluindo auto- administração, e administração indireta, incluindo o ato de prescrever uma droga. Por exemplo, como usado aqui, um médico que instrui um paciente a auto-administrar uma droga e/ou fornece a um paciente uma prescrição de uma droga a ser administrada ao paciente.

Como usado aqui, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma droga é uma quantidade de uma droga que, quando administrada a um sujeito com câncer, exercerá o efeito terapêutico desejado, p. ex., alívio, melhora, paliativo ou eliminação de uma ou mais manifestações de câncer no sujeito. O efeito terapêutico pleno não ocorre necessariamente por meio de administração de uma dose, e pode ocorrer apenas após administração de uma série de doses. Assim, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações.

Como usado aqui, uma "quantidade profilaticamente eficaz" de uma droga é uma quantidade de uma droga que, quando administrada a um sujeito, exercerá o efeito profilático desejado, p. ex., prevenir ou retardar o início (ou recorrência) de doença ou sintomas, ou reduzir a probabilidade do início (ou recorrência) de doença ou sintomas. O pleno efeito profilático não ocorre necessariamente por meio de administração de uma dose, e pode ocorrer apenas após administração de uma série de doses. Assim, uma quantidade profilaticamente eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações.

Como usado aqui, uma terapia de "segunda linha" refere-se a terapia que é dada para o tratamento de um câncer que falhou em responder a um primeiro regime de quimioterapia ou quimioterapia de "primeira linha". Diz-se que terapia de "terceira linha" refere-se a terapia que é dada para o

tratamento de um câncer quando tanto o tratamento inicial, terapia de primeira linha, como também o tratamento subseqüente, terapia de segunda linha, não funcionam, ou cessam de funcionar.

Como usado aqui "LogP" significa uma medida de lipofilicidade de uma substância determinada com base na repartição da substância entre octanol e água.

IIa. Compostos

A maior parte das terapias de câncer mediadas com câncer, terapias à base de alquilador de fosforoamidato, consiste de venenos, denominados agentes citotóxicos, seletivos para objetivação de células que se dividem, por exemplo, seu DNA replicante, microtúbulo, e vários fatores de crescimento e receptores de fator de crescimento. Estas drogas são eficazes porque células de câncer geralmente se dividem mais freqüentemente do que células normais. No entanto, referidas drogas quase inevitavelmente não matam todas as células de câncer no paciente. Uma razão é que células de câncer podem mutar-se e desenvolver resistência à droga. Outra é que nem todas as células de câncer se dividem mais freqüentemente do que células normais, e células que se dividem lentamente podem ser tão, ou mesmo mais, insensíveis a referidos agentes citotóxicos do que células normais.

Algumas células de câncer encontram-se em um tumor sólido fracamente vascularizado, são incapazes de gerar a energia requerida para divisão celular e dividem-se lentamente. À medida que o tumor cresce, ele requer um suprimento de sangue e, conseqüentemente, desenvolvimento de nova vasculatura. A nova vasculatura que suporta o crescimento do tumor freqüentemente é desordenada; deixando significativas regiões do tumor sub-vascularizadas e mesmo as regiões vascularizadas sujeitas a bloqueio intermitente. Estas regiões sub-vascularizadas e bloqueadas do tumor tornam-se hipóxicas - elas apresentam uma menor concentração de oxigênio ou uma menor pressão parcial de oxigênio do que o tecido normal correspondente, e

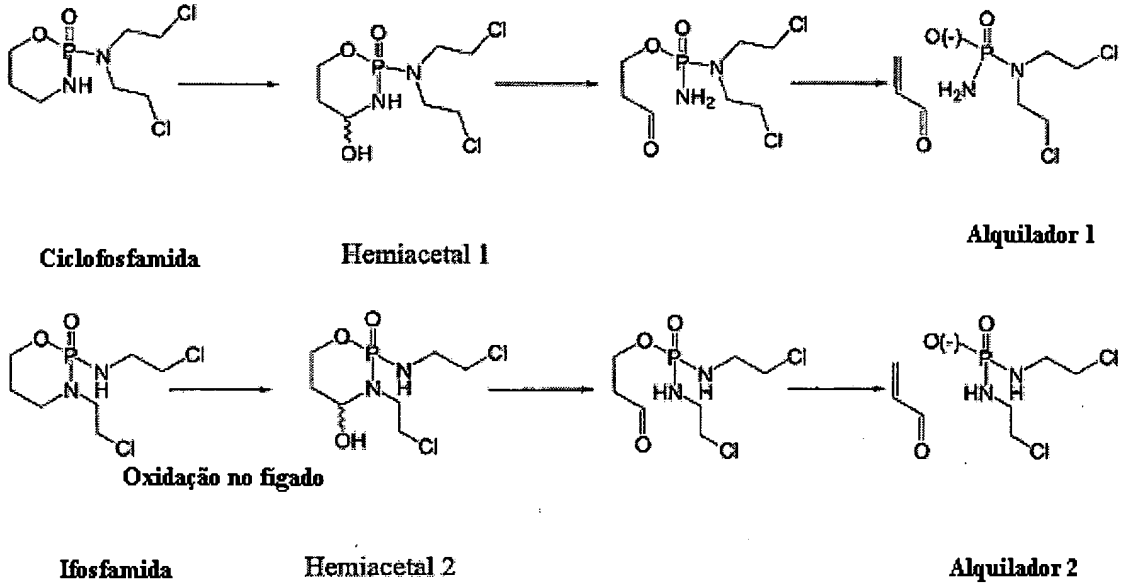
as células nas mesmas apresentam menores taxas de divisão. Assim, a concentração média de oxigênio de apenas dez por cento de tumores sólidos enquadra-se na faixa normal de 40 a 60 mm de Hg, e cinqüenta porcento dos tumores sólidos apresentam concentrações médias de oxigênio inferiores a 10 mm de Hg.

As áreas hipóxicas do tumor representam uma fonte significativa de metástases e células de câncer resistentes a terapia (ver por exemplo, De Jaeger *et al*, *Br J Cancer*. 2001, 84(9):1280-5 e Rofstad *et al*, *Br J Cancer*. 1999, 80(11):1697-707). Não é de surpreender que, então, baixos níveis de oxigênio no tumor estejam associados com uma baixa resposta à terapia, metástases incrementadas, e baixa taxa de sobrevida. Os mecanismos de ativação e ação da Ciclofosfamida e Ifosfamida podem exemplificar como estes agentes não podem objetivar especificamente a dificuldade de matar zona hipóxica de um tumor.

Tanto a Ciclofosfamida como também a Ifosfamida são pró-drogas e podem ser ativadas oxidativamente no fígado por meio de intermediários dando alquiladores de fosforoamidatos ativos, Alquiladores 1 (mostarda de ciclofosfamida) e 2 (mostarda de ifosfamida), respectivamente (ver abaixo). Os semiacetais 1 e 2 de carga neutra, podem ter uma meia-vida de muitos minutos e podem permear para dentro e para fora da célula. Em contraste, os Alquiladores 1 e 2 aniônicos são muito menos permeáveis para a membrana celular e, uma vez formados extracelularmente, matam a célula ineficientemente por meio de alquilação de DNA celular.

Quando os alquiladores de fosforoamidatos atingem o tumor, eles geralmente matam células na zona externa do tumor normóxica, bem vascularizada, de crescimento rápido. No entanto, estes alquiladores de fosforoamidatos não são efetivos para permear adentrando zonas de tumor interiores progressivamente hipóxicas, menos vascularizadas, de crescimento mais lento, e para matar células de tumor ali existentes. Antes que qualquer

um destes alquiladores ativos atinja o tumor, eles podem reagir com células saudáveis e resultar em toxicidade e/ou morte celular.



Embora o tumor hipóxido seja difícil de tratar, a zona de tumor hipóxida pode gerar derivados reduzidos de vários grupos químicos (ver a referência Workman *et al.*, 1993, *Cancer and Metast. Rev.* 12: 73-82), e é possível desenvolver pró-drogas de citotoxinas para explorar referidos ambientes bio-redutores (Pedidos PCT nums. US 04/009667 e US 05/08161; PCT/US2005/041959 e PCT/US2005/042095, todos para Matteucci *et al*). Uma referida pró-droga reduzível com hipoxia (ou ativada por hipoxia) pode ser construída empregando-se um grupo bio-redutor (Z_3) juntamente com um alquilador. O grupo bio-redutor é empregado como parte de uma porção disparadora ligada covalentemente ou ligada ao alquilador de fosforoamidato.

Os compostos da invenção podem ser descritos geralmente como pró-drogas de alquilador de fosforoamidato. De uma maneira geral, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção apresentam a estrutura a seguir

Alq-disparador em que Alq é um alquilador de fosforoamidato, e disparador T apresenta uma estrutura L-Z_3, em que o ligante L é ligado a um grupo biorredutor Z_3. Em uma concretização, o disparador T é um disparador ativado por hipoxia.

Derivados de alquilador de fosforoamidato são reportados nas referências, Borch *et al*, *J. Med. Chem.* 2000, 43: 2258-65; 2001, 44: 69-73; 2001, 44: 74-7; Hernick *et al J. Med. Chem.* 2002, 45: 3540-8; Hernick *et al*, *J. Med. Chem.* 2003, 46: 148-54; Patentes dos Estados Unidos nums. 4.908.356; 5.306.727; 5.403.932; 5.190.929; 5.472.956; e 6.656.926; Publicação de Pedido de Patente dos E.U.A. nº US 2003/0008850; e Papot *et al*, *Curr. Med. Chem.*, 2002, 2, 155-85, cujos compostos isolados são aqui divulgados, e não são o objeto da presente invenção. Em algumas concretizações, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresentam uma ou mais das características a seguir: (i) uma toxicidade hipóxica mais elevada ou menor valor de IC_{50} ou IC_{90}, em tecido hipóxico, (ii) menor citotoxicidade normóxica, e (iii) perfil de efeito colateral menos tóxico ou algumas combinações destes atributos. Em algumas concretizações, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção diferem de derivados conhecidos de alquilador de fosforoamidato em virtude de: (i) a natureza do alquilador de fosforoamidato liberado, (ii) a natureza do ligante (L) e/ou do grupo biorredutor Z_3, (iii) a presença de mais do que uma porção de grupo biorredutor, ou algumas combinações destes atributos (iv) citotoxicidade seletiva à hipoxia incrementada medida por maiores valores de HCR (v) maior solubilidade aquosa (vi) maior estabilidade à degradação microssômica no fígado e/ou (vii) fornecimento de pró-drogas eficazes de alquilador de fosforamida que são aquirais e evitam metabolismo específico para enanciômero *in vivo*.

Para compreender porque os compostos de pró-droga da presente invenção representam um avanço significativo relativamente a derivados conhecidos de alquilador de fosforoamidato anticâncer, será útil uma compreensão da biologia do tumor particularmente sob hipoxia e a farmacocinética e farmacodinâmica de pró-drogas aqui proporcionadas em particular.

Para eficaz terapia de tumor, uma pró-droga ativada por hipoxia deveria ser menos tóxica para células normóxicas saudáveis do que para células de tumor hipóxicas. Em algumas concretizações, as pró-drogas ativadas por hipoxia da invenção são menos ativas e menos tóxicas para células normóxicas do que para células hipóxicas. Quando uma pró-droga da invenção encontra o ambiente hipóxico redutor no interior de tecido de tumor sólido, a redução do grupo biorredutor causa dissociação do alquilador de fosforoamidato ou da citotoxina ativa. O alquilador de fosforoamidato é liberado na zona de tumor e pode penetrar mais facilmente a região hipóxica do tumor sólido. Estes alquiladores de fosforoamidatos podem matar células se tiverem dificuldade de atingir região hipóxica do tumor sólido, ao mesmo tempo que minimizam a morte de células saudáveis não-cancerosas e efeitos colaterais tóxicos para o paciente. Assim, a presente invenção proporciona pró-drogas ativadas por hipoxia que são muito menos tóxicas para células normóxicas saudáveis do que para células de tumor hipóxicas.

Em determinadas concretizações, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção empregam porções indol quinona ou aromáticas contendo nitro como grupos biorredutors no disparador T. No tumor hipóxico, o grupo nitro é reduzido a um grupo hidroxilamino ou um grupo amino e fluxo de um par de elétrons do grupo amino ou hidroxilamino através do sistema de elétrons π conjugado do disparador T libera o alquilador de fosforoamidato. Em outra concretização, em um tumor hipóxico, uma indol quinona é reduzida a uma indol hidroquinona, e fluxo de um par de elétrons da hidroquinona através do disparador T libera o alquilador de fosforoamidato. O alquilador de fosforoamidato liberado mata células em e/ou próximo do tumor hipóxico.

Várias enzimas podem ser responsáveis pela redução do grupo biorredutor Z_3 no disparador. Por exemplo, enzimas de citocromo P450 redutase podem reduzir a porção nitro ou uma porção quinona a um grupo

biorredutor numa primeira etapa respectivamente a um ânion de radical semiquinona ou NO_2('-). A zona de tumor hipóxica pode apresentar uma maior concentração da enzima redutase em comparação com tecido normóxico. Sob normoxia, como também em tecido saudável bem vascularizado, na presença de oxigênio, o ânion de radical semiquinona ou NO_2('-) formado pode reagir com oxigênio para reverter ao grupo biorredutor e, não ultimamente, gerar ou liberar o alquilador de fosforoamidato. A porção arila ou heteroarila ligada covalentemente ao ânion de radical semiquinona ou NO2('-) modula a sensibilidade ao oxigênio do ânion do radical.

A sensibilidade ao oxigênio do grupo biorredutor varia dependendo parcialmente do potencial de redução do grupo biorredutor. Assim, por exemplo, um grupo biorredutor pode tornar-se reduzido em uma zona de tumor hipóxica apresentando 1% de oxigênio, outro em uma zona apresentando 0,1% de oxigênio, e outro ainda em uma zona apresentando 0,01% de oxigênio.

Um grupo biorredutor perde parte ou toda sua especificidade hipóxica quando é tão facilmente reduzido que a enzima citocromo P450 redutase ou outros agentes redutores ("agentes de redução") em tecido normóxico saudável pode reduzir o mesmo na presença de oxigênio. Se um ânion de radical de semiquinona ou NO_2('-) em um grupo biorredutor não reage ou reage lentamente com oxigênio, o ânion de radical por si só pode liberar o alquilador de fosforoamidato, ou pode ser adicionalmente reduzido e liberar o alquilador de fosforoamidato, causando toxicidade para tecido e células normóxicas saudáveis. As pró-drogas de alquilador de fosforoamidato inéditas da presente invenção são mais tóxicas para o tecido e as células de câncer hipóxicas do que para o tecido e as células normóxicas saudáveis.

A facilidade ou dificuldade de reduzir o grupo biorredutor Z_3 pode ser medido por meio da redução potencial do grupo biorredutor e é influenciada pelo ligante (L), e o alquilador de fosforoamidato (Alq-H). Por

exemplo, a ligação do grupo biorredutor a um ligante retirator de elétron ou um alquilador de fosforoamidato retirador de elétron pode tornar o grupo biorredutor mais fácil de reduzir em comparação com quando é ligado covalentemente a um ligante rico em elétron ou um alquilador de fosforoamidato rico em elétron.

O disparador T pode ser oxidado, hidrolisado, ou tiolisado e pode liberar o alquilador de fosforoamidato de uma maneira não-seletiva para hipoxia. Telcyta™, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato que se encontra na clínica, pode liberar uma toxina ativa na ausência de hipoxia por meio da ação de glutationa transferase (ver, p. ex., alquilador de fosforoamidato 1f na seção "Métodos de Tratamento"). A natureza química do ligante e/ou do alquilador de fosforoamidato pode influenciar a estabilidade oxidativa, hidrolítica ou tiolítica da pró-droga com relação à liberação de alquilador de fosforoamidato. Em uma concretização da presente invenção uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ativada por hipoxia, não libera o alquilador de fosforoamidato em uma oxidação, hidrólise, ou tiólise não específica para hipoxia.

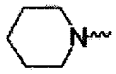
De acordo com a presente invenção, um disparador empregado adequadamente pode ser usado para "ajustar" a propriedade farmacocinética da pró-droga sem alterar suas propriedades citotóxicas. Por exemplo, um elevado volume de distribuição de um agente anticâncer assegura que a pró-droga é absorvida rapidamente no tecido. De acordo com a presente invenção, em uma concretização, o volume de distribuição de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode se modulado empregando-se um disparador T contendo um grupo amino capaz de formar um cátion amônio em condições fisiológicas. Em uma concretização, um disparador T contendo um grupo amônio quaternário pode proporcionar um composto de pró-droga da invenção apresentando um elevado volume de distribuição enquanto se evita possível aprisionamento endossômico. Em outra concretização, um

disparador T compreendendo uma funcionalidade carboxila existirá como a forma de ânion carboxilato aniônico, $CO_2(^-)$ no espaço extracelular do lado exterior de tecido saudável normal e não passará facilmente através da membrana celular normal. O pH no espaço extracelular do tumor pode converter o $CO_2(^-)$ à forma "CO_2H" não-carregada, permitindo que a pró-droga passe através da membrana da célula de tumor.

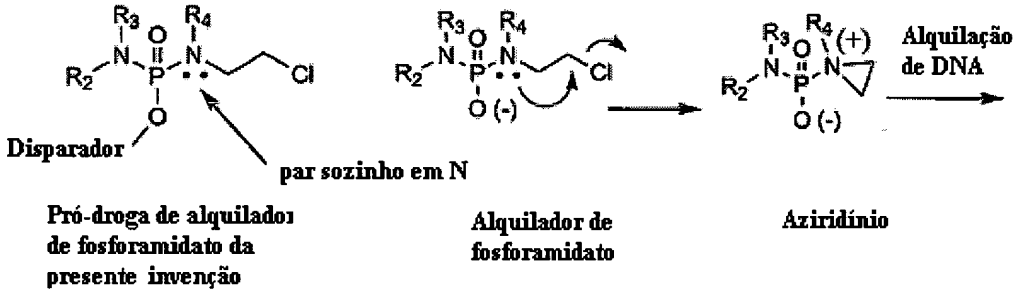
Um alquilador de fosforoamidato contendo um grupo hidroxila, amino, mercapto, e/ou um grupo carboxila pode ser transformado numa pró-droga por meio de ligação covalente de um disparador T a um ou mais destes grupos funcionais. Durante a transformação de um alquilador de fosforoamidato numa pró-droga, um grupo hidroxila no alquilador de fosforoamidato pode ser transformado, por exemplo, num éter ou num acetal; um amino num alquilamino, um carbamato, ou uma amida; um grupo carboxila num éster; e um grupo mercapto num tioéter ou uma tioacila, como descrito mais detalhadamente nas seções de Método de Síntese e Experimental abaixo. Estas transformações podem proporcionar uma pró-droga que é menos polar ou mais lipofílica do que o alquilador de fosforoamidato correspondente. Pró-drogas de alquilador de fosforoamidato não polares podem não ser facilmente solúveis em diluentes ou veículos farmacêuticos aquosos. Grupos acentuadores de solubilidade, como CO_2H, amino, alquilamino, dialilamino, e hidroxila, podem ser empregados no disparador T para modular a solubilidade da pró-droga e superar quaisquer problemas encontrados na preparação de formulações aquosas das pró-drogas de alquilador de fosforoamidato.

Alquiladores de fosforoamidatos da presente invenção podem apresentar uma ou mais N-(2- haloalquila) ou N-(2-haloetila) e/ou uma ou mais porção  aziridina ligada covalentemente a uma porção P=O como mostrado abaixo. Após liberação da porção de alquilador de fosforoamidato aniônica forma-se uma espécie de aziridina ou azirídio que pode alquilar

DNA (ver seção de Exemplos, Exemplo 36). Dependendo da natureza de retirada de elétron de substituintes R_2 e R_3, a cinética da formação de aziridínio pode variar. Por exemplo, como mostrado na seqüência de reação abaixo, a taxa de alquilação pode aumentar quando a porção NR_2R_3 é modificada de NH_2 para



(ver Engle *et al*, *J. Med. Chem.*, 1987, 25: 1347-57). Substituintes nos átomos de nitrogênio podem alterar a geometria do alquilador de fosforoamidato, a deslocalização do par de elétrons sozinho neste átomo de nitrogênio na porção P=O, a disponibilidade dos pares de elétrons sozinhos de nitrogênio para formação de aziridínio ou subseqüentemente aziridina, e a solubilidade aquosa de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e de alquilador de fosforoamidato.



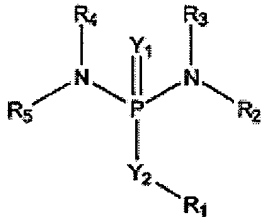
A presente invenção provém, em parte, da descoberta de que pró-drogas de alquilador de fosforoamidato empregando grupo biorredutor de 2-nitroimidazol mostram citotoxicidade hipóxica inesperadamente elevada, baixa toxicidade normóxica e elevada HCR e solubilidade incrementada. Por exemplo, Compostos 24 e 25 foram, respectivamente, de 400 a 1000 vezes mais tóxicos em células hipóxicas do que em células normóxicas em um ensaio de citotoxicidade anti-proliferação com uma IC_{50} de 0,05 μM em células sob hipoxia. (ver Seção de Exemplos). Pró-drogas de alquilador de fosforoamidato contendo mostarda de ifosfamida ou análogos de mostarda de ifosfamida e apresentando fórmulas:

Z_3-CH_2-O-P(=O)($NHCH_2CH_2X4)_2$, Z_3-CH_2-O-P(=O)($NHCH(R_9)CH_2X_4)_2$, e

Z_3-CH(Z_2)-O-P(=O)(NHCH(R_9)CH_2X_4)$_2$;

em que Z_2 é metila; R_9 é hidrogênio, metila, ou isopropila; Z_3 é 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-ila), 2-nitrotiofen-5-ila, ou 2-nitrofuran-5-ila; e cada X_4 é Cl ou Br foram inesperadamente mais tóxicos em células hipóxicas do que em células normóxicas, e/ou apresentaram inesperadamente valores de HCR elevados, em ensaios de citotoxicidade de células anti-proliferação, em contraste com os valores de HCR de derivados conhecidos de alquilador de fosforoamidato apresentando grupos 2-nitrotiofeno-5-ila, 2-nitrofuran-5-ila, ou 5-nitro imidazolila, grupos biorredutors (Z_3), e mostarda de N,N'(tetraquis-2-coloroetil) fosforoamidato ou mostarda de ciclofosfamida; ou um grupo indol quinonila como Z_3 e mostarda de ifosfamida (ver p. ex., compostos P4, P 14-17, P 19, e P21-22, em Borch *et al*, *J. Med. Chem.*, e Patente dos Estados Unidos nº 6.656.926 ambas indicadas acima).

Em um aspecto, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquiladores de fosforoamidatos de fórmula (I):



(I)

em que

Y_1 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, ou heteroarila;

Y_2 é O, S, NR_6, $NCOR_6$, ou NSO_2R_6;

cada um de R_1-R_5 é independentemente hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla; ou, em conjunto, quaisquer dois de R_1-R_5 formam um C_3-C_{10} heterociclo; ou cada um de R_1-R_5 é independentemente um disparador T em que disparador é L-Z_3;

L é selecionado dentre

$-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-[C(=O)-O]_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[-C(Z_1)=C(Z_1)]_g-$; e $-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-(S(=O)_2)_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[C(Z_1)=C(Z_1)]_g-$;

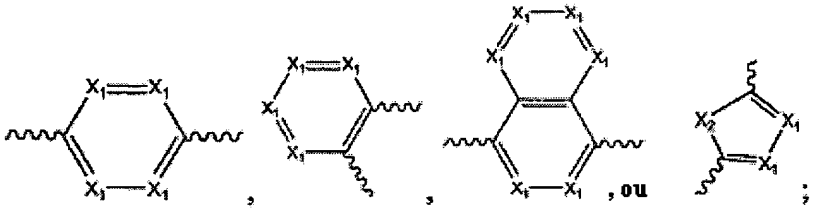
em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

Y_3 é S, O, ou NR_7 em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

Y_4 é O, S, ou $-NR_7-C(O)-O-$;

cada Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, heteroarila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

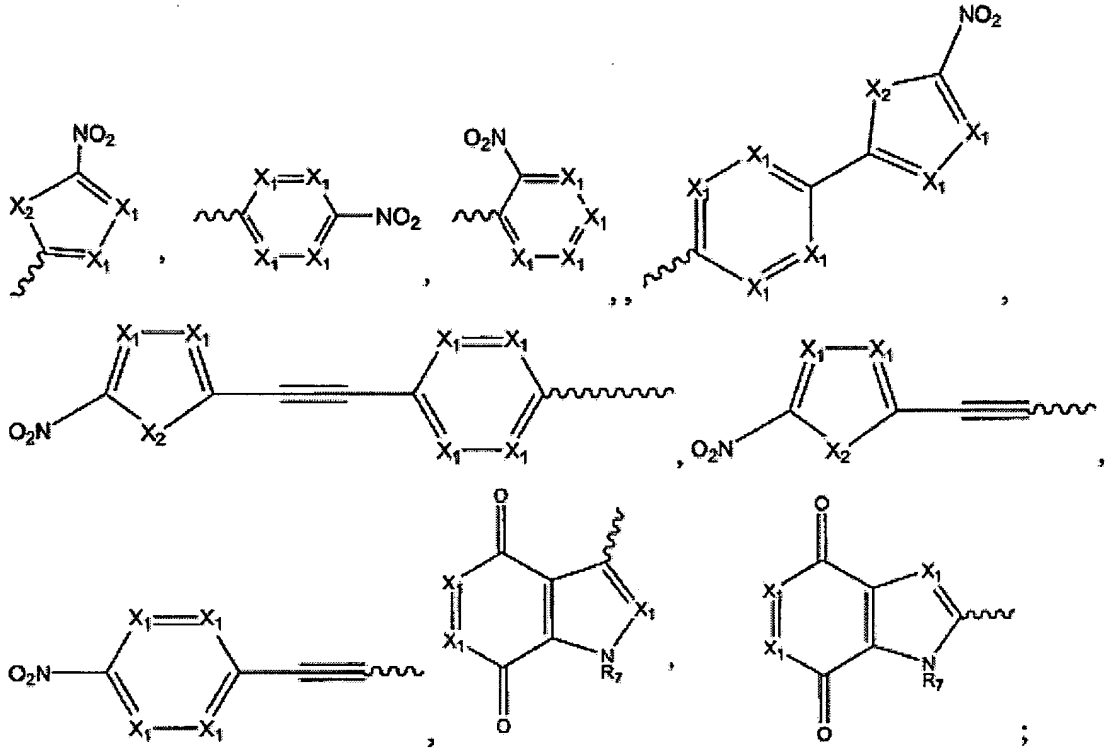
Z_2 é C_1-C_6 alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno,



cada X_1 é independentemente N ou CR_8 em que R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, OH, $OP(=O)(OH)_2$, nitro, ciano, CO_2H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1- C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, $CON(R_7)_2$, C_1-C_6 acila, C_1- C6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

Z_3 é um grupo biorredutor selecionado do grupo que consiste de:



com a condição de que na fórmula (I):

(i) pelo menos dois de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; **ou**

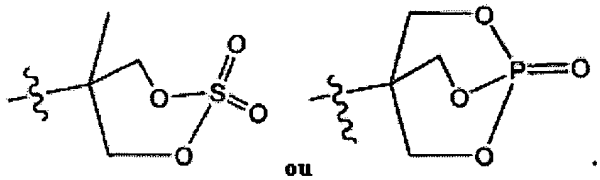
(iii) cada um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; **e**

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteros, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Em uma concretização, z é 1.

Em uma concretização, R^2-R^5 não são iguais.

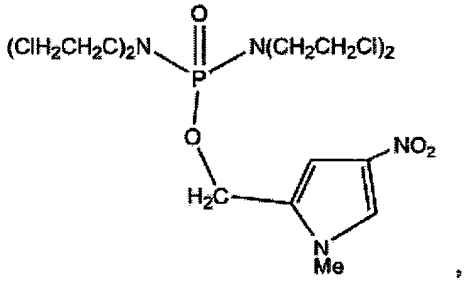
Em uma concretização, qualquer um de R^2-R^5 é



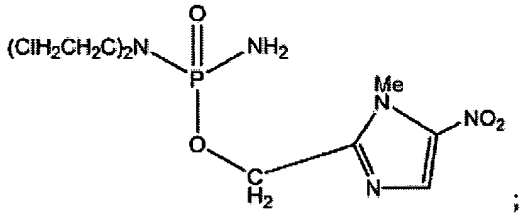
ou

Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato ativadas com hipoxia cada uma empregando dois alquiladores de fosforoamidatos. Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção emprega uma porção 1-N-alquil-2-nitroimidazol-5-ila ou uma porção 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-ila como um grupo biorredutor ou Z_3. Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção emprega uma porção 2-nitrofurano como um grupo biorredutor ou Z_3.

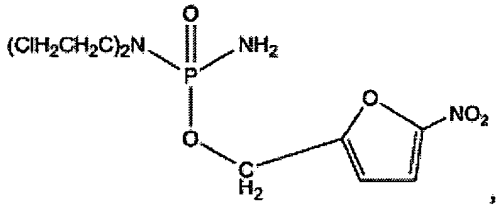
Em uma concretização, a presente invenção exclui os compostos:



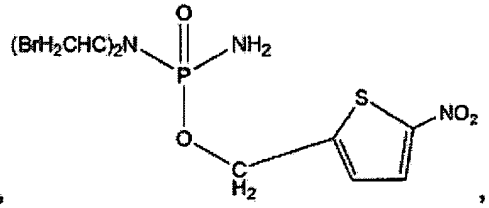
P1



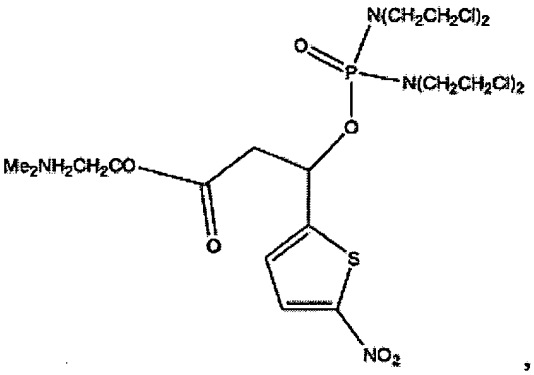
P2



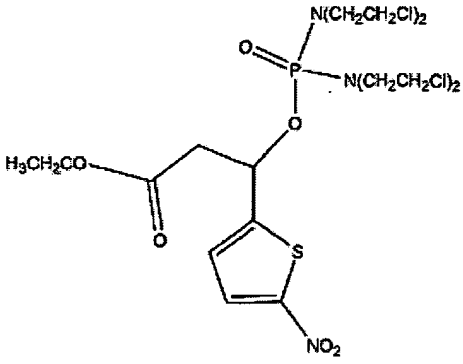
P3



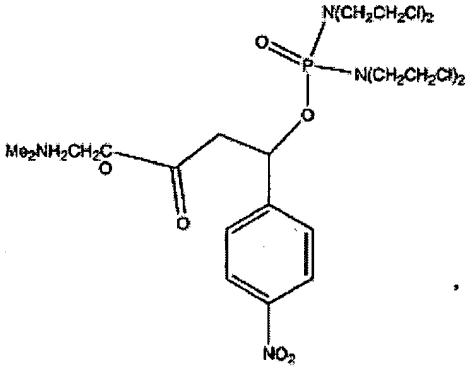
P4



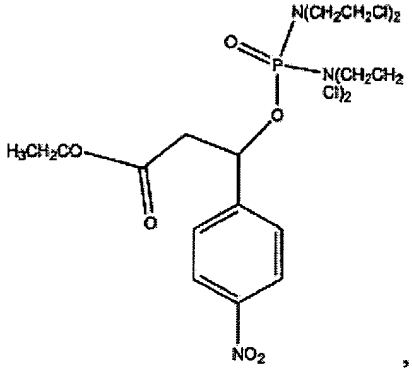
P5



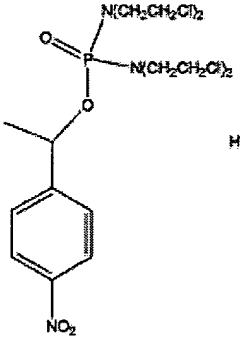
P6



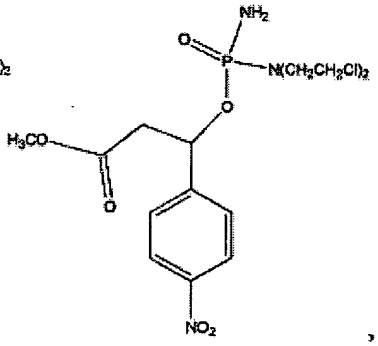
P7



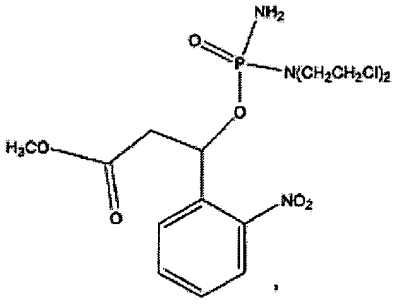
P8



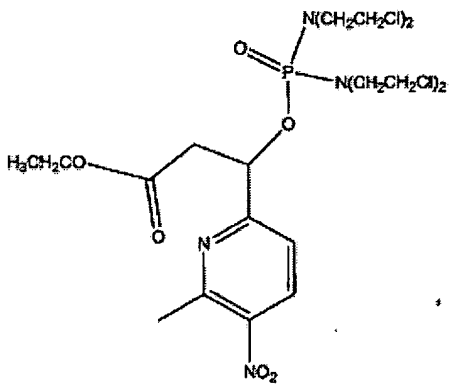
P9



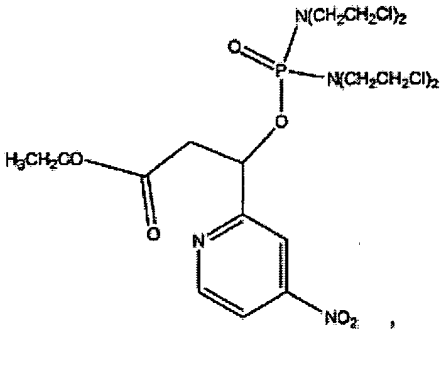
P10



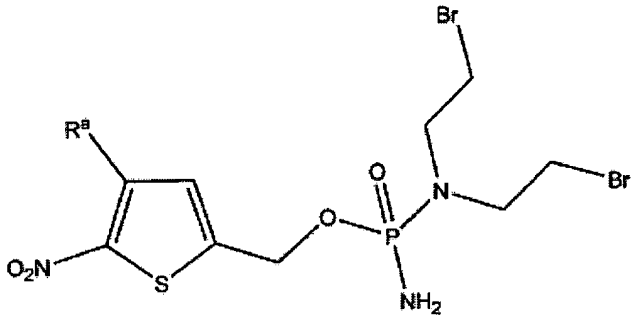
P11



P12

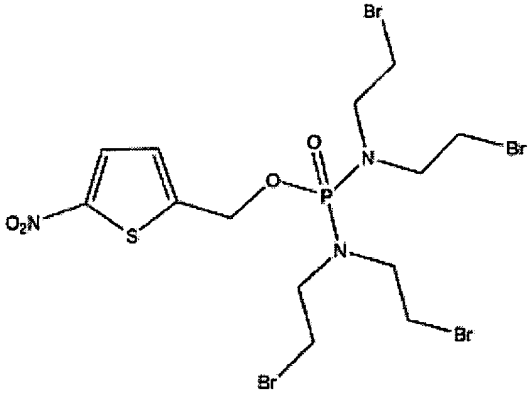


P13

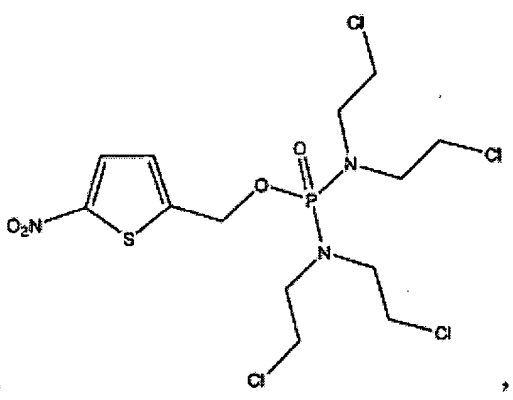


P14 – P17

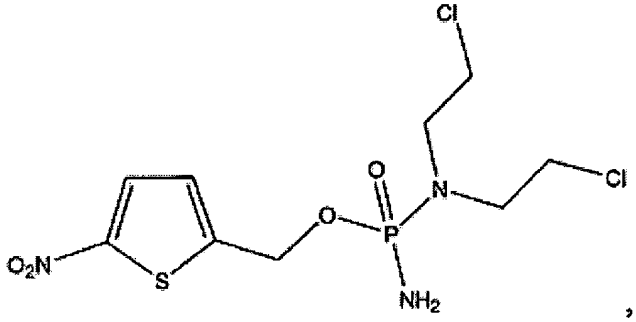
em que R^a é H, Br (P14), NMe_2 (P15), CN (P16), ou $CONH_2$ (P17),



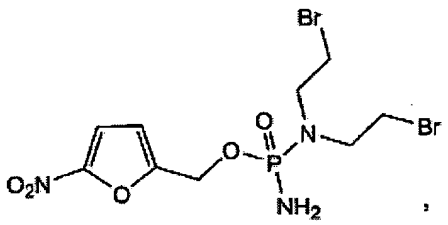
P18



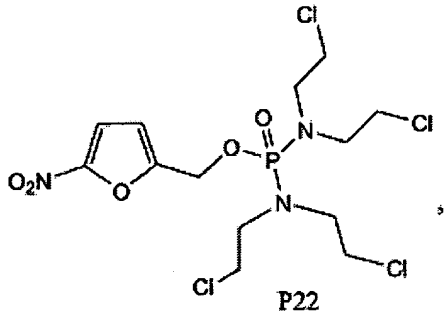
P19



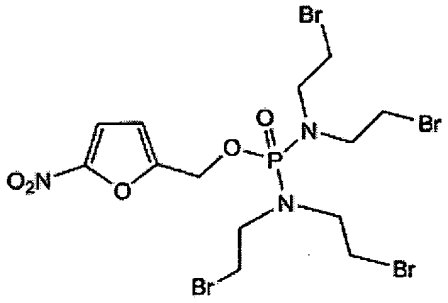
P20



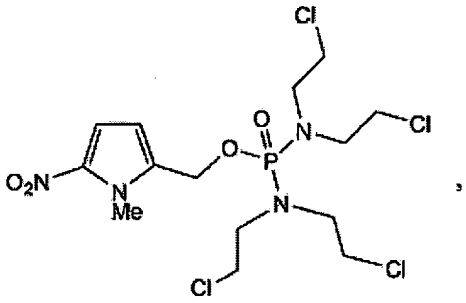
P21 ,



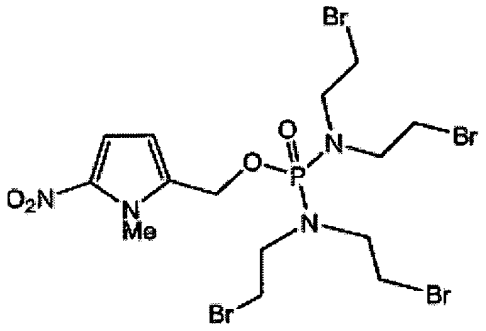
P22 ,



P23 ,

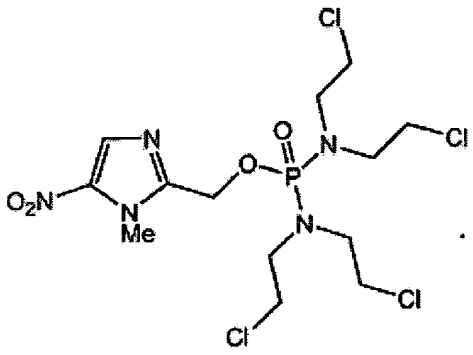


P24 ,

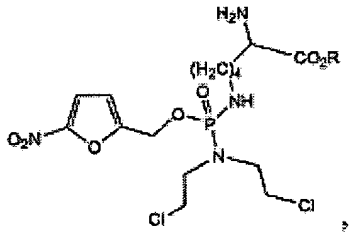


P25 ,

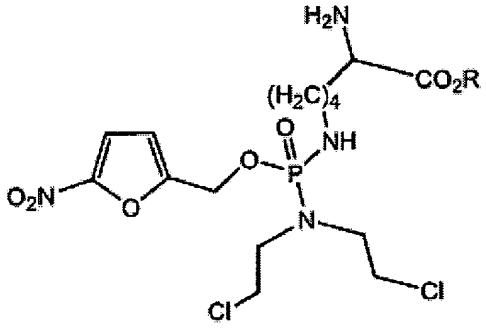
e



P26 .



P36 ,



P37 .

em que R é H, Me ou alila;

bis[N-metil-N-(2- bromoetil)] fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)-metila (P27),

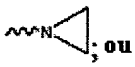
N,N-bis(2-bromoetil)-fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-

indolquinonil)metila (P28),
bis[N-metil-N-(2-bromoetil)]fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P29),
N,N-bis(2-cloroetil)fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P30),
N,N-bis(2-bromoetil)- fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P31),
N,N-bis(2-bromoetil)-fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P32),
bis[N-metil-N-(2-bromoetil)]fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P33),
N,N-bis(2-cloroetil)- fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P34), e
N,N-bis(2-bromoetil)-fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila (P35)

Em uma concretização relacionada, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (I) com a condição de que

(i) pelo menos um de R_1-R_5 sejam selecionados do grupo que consiste de 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila e

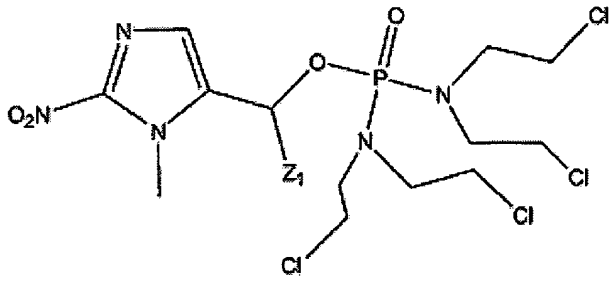
pelo menos um de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; ou

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; ou

(iii) cada um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ;

Em outra concretização relacionada, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (I) com a condição de que a fórmula (I) exclua R_2 e R_3 em conjunto formando um anel morfolina ou R_4 e R_5 em conjunto formam um anel morfolina.

Em uma concretização, a presente invenção exclui um composto com a estrutura a seguir:



em que Z_1 é hidrogênio ou C_1-C_6 alquila.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona compostos em que o disparador T é:

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3\text{-}C(Z_1)_2]_z\text{-}Z_3$;

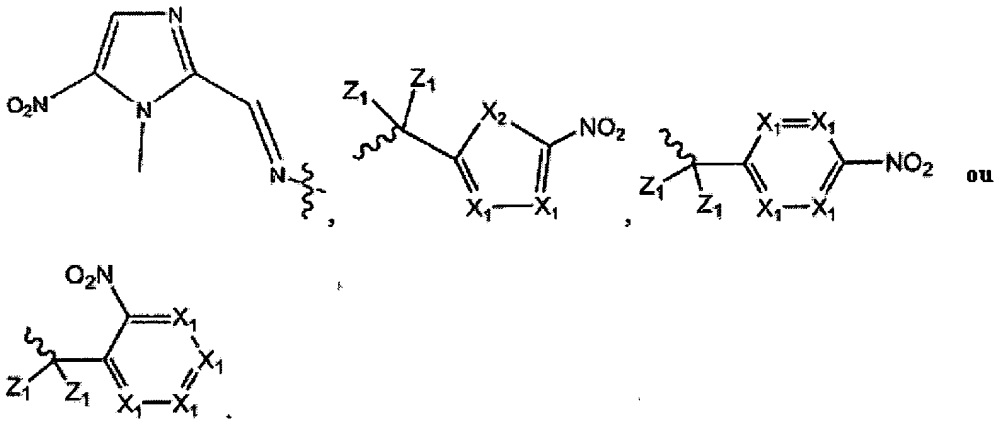
$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}Z_3$;

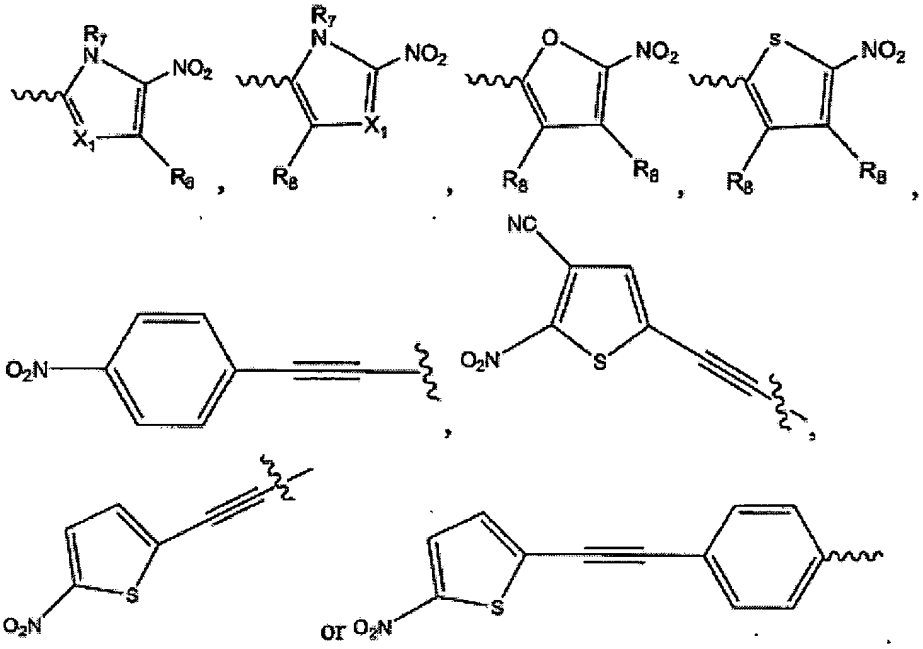
$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;

$[C(Z_1)_2]z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_3$;



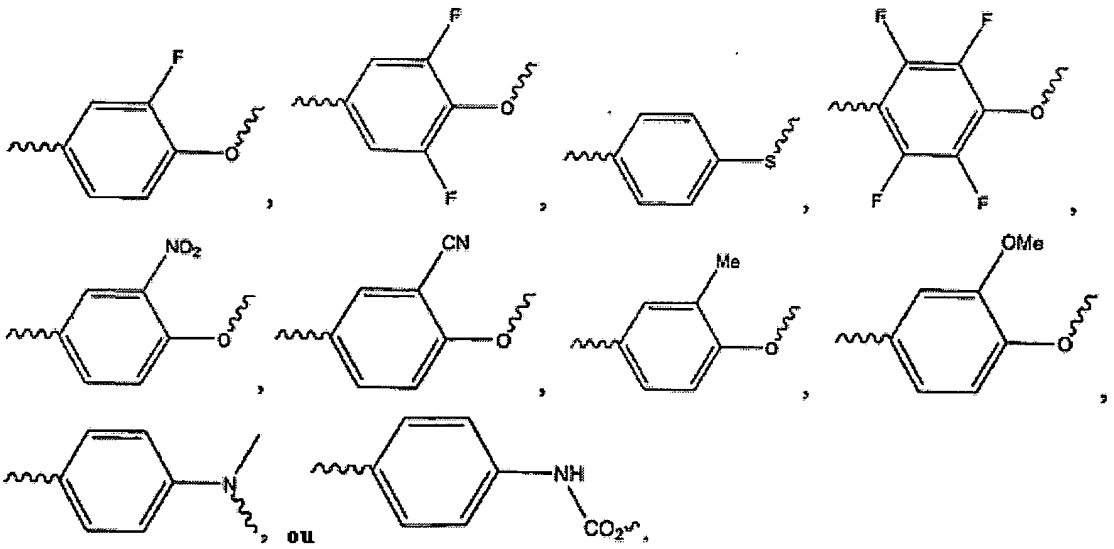
Em uma concretização adicional, Z_3 é:



Em uma concretização, cada um de $-C(Z_1)_2-$ é: $-CH_2-$, -CHMe-, $-CH(CN)-$, $-CH(CO_2H)-$, - $CH(CONH_2)-$, $-CH(CF_3)-$, $-CH(CHF_2)-$, $-C(Me)_2-$, $-C(Et)_2-$, $-CH(CH_2NMe_2)-$, - $CH(CH_2NMe_2)-$, $-C(CH_2NMe_2)_2-$, ou $-C(CH_2CO_2H)_2-$.

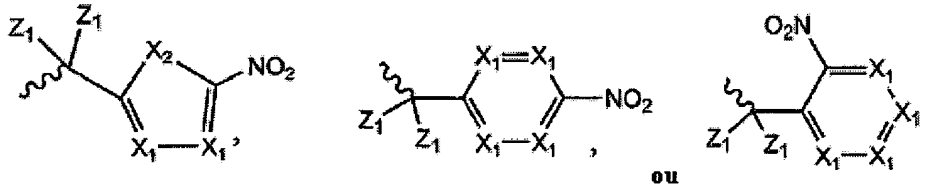
Em uma concretização, $-C(Z_1)_2-Y_3-$ é: $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NMe$, $-CH_2-NH-$, CH(Me)-O-, CH(Me)-S-; -CH(Me)-NMe-, -CH(Me)-NH-; $-CMe_2-NMe-$, $-CMe_2-NMe-$, ou $-CMe_2-NMe-$

Em uma concretização $-Z_2-Y_4-$ em conjunto é:

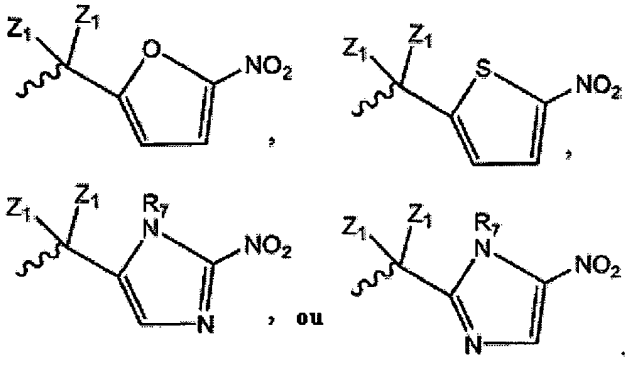


Em uma concretização, -[C(ZO=C(Z_1)]- é: -CH=CH-, -C(CN)=CH-, -CH=C(CN)-, - C(Ar)=CH-, -CH=CAr-, -C(COAr)=CH-,-CH=C(COAr)-, -C(COR_{12})=CH- ou - CH=C(COR_{12})-, em que Ar é arila opcionalmente substituído por até cinco substituintes selecionados do grupo que consiste de OH, OMe, CF_3, O-CHF_2, OCF_3, NO_2, CN, halo, halometila, di-halometila, tri-halometila, hidroximetila, CO_2H, $CONH_2$, $CONMe_2$, e CONHMe; e R_{12} é independentemente hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, ou heterociclila.

Em outra concretização, disparador é:

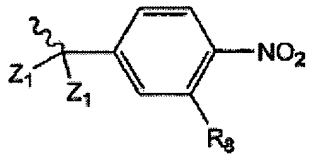


em outra concretização, disparador é



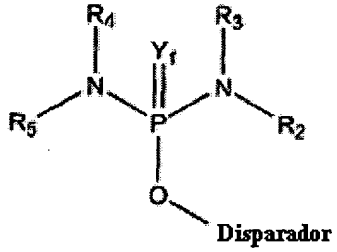
em que cada um de Z_1 é independentemente H ou C_1-C_6 alquila.

Em outra concretização, disparador é:



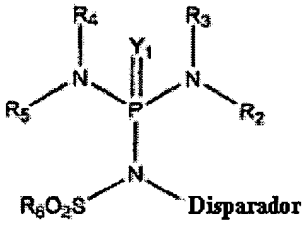
em que cada um de Z_1 é hidrogênio ou C_1-C_6 alquila e R_8 é H, OH, ou -$OP(=O)(OH)_2$.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona compostos de fórmulas (II) e (III):



(II)

e

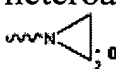


(III)

em que cada R_2-R_5 é independentemente selecionado do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila e heteroarila; ou, em conjunto, quaisquer dois de R_2-R_5 formam um C_3-C_{10} heterociclo; cada Y_1 é independentemente S ou O; e cada disparador T é definido como na fórmula (I);

com a condição de que nas fórmulas (II) ou (III):

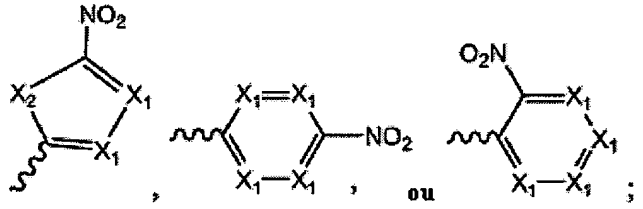
(i) pelo menos dois de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2 heteroalquilsulfoniloxialquila; ou

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; ou

(iii) cada NR_2R_3 e NR_4R_5 são ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteros, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (II) em que disparador T é $-CH_2-Z_3$, $-CH(Z_1)-Z_3$, ou $-C(Z_1)_2-Z_3$ em que Z_1 é C_1-alquila e Z_3 é:



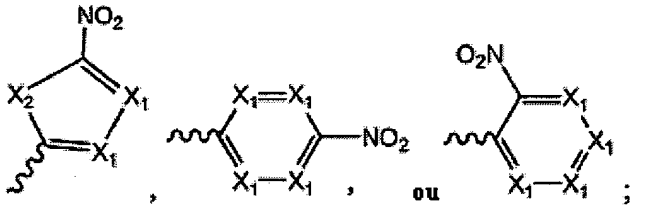
com a condição de que na fórmula (II):

(i) um de R_2 e R_3 é H e um de R_4 e R_5 é H;

(ii) um de R_2 e R_3 é C_1-alquila e um de R_4 e R_5 é C_1-alquila; ou

(iii) pelo menos um de R_2-R_5 é hidroxila, amino, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C6 heteroacila, ou aroíla ou heteroaroíla.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (II) em que Z_3 é um grupo biorredutor selecionado de:

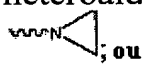


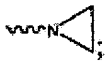
com a condição de que na fórmula (I):

(i) pelo menos um de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila e

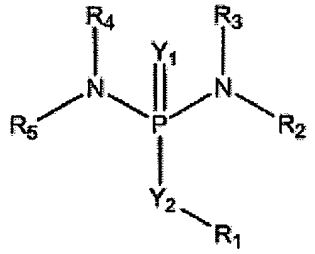
pelo menos um de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-

heteroalquilsulfoniloxialquila; ou

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; ou

(iii) cada um NR_2R_3 e NR_4R_5 são ;

Em um aspecto, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato de fórmula (I):



(I)

em que

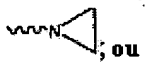
R_1 é um -$[C(Z_1)_2$-$Y_3]_v$-$[C(=O)$-$O]_q$-$[C(Z_1)_2$-Z_2-$Y_4]_u$-Z_3 ou -$[C(Z_1)_2$-$Y_3]_v$-$(S(=O)_2)$q-$[C(Z_1)_2$-Z_2-$Y_4]_u$-Z_3, em que cada v, q, e u é independentemente 0 ou 1; e Z_3 é uma glicose ou um análogo da mesma com a condição de que exclua conjugados de glicose de alquiladores de fosforoamidatos descritos na referência Wiessler *et al.*, Patente dos Estados Unidos nº 5.622.936;

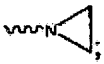
cada um de R_2-R_5 é independentemente hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila e heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla; ou, em conjunto, quaisquer dois de R_1-R_5 formam um C_3-C_{10} heterociclo;

com a condição de que na fórmula (I):

(i) pelo menos dois de R_2-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2,-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-

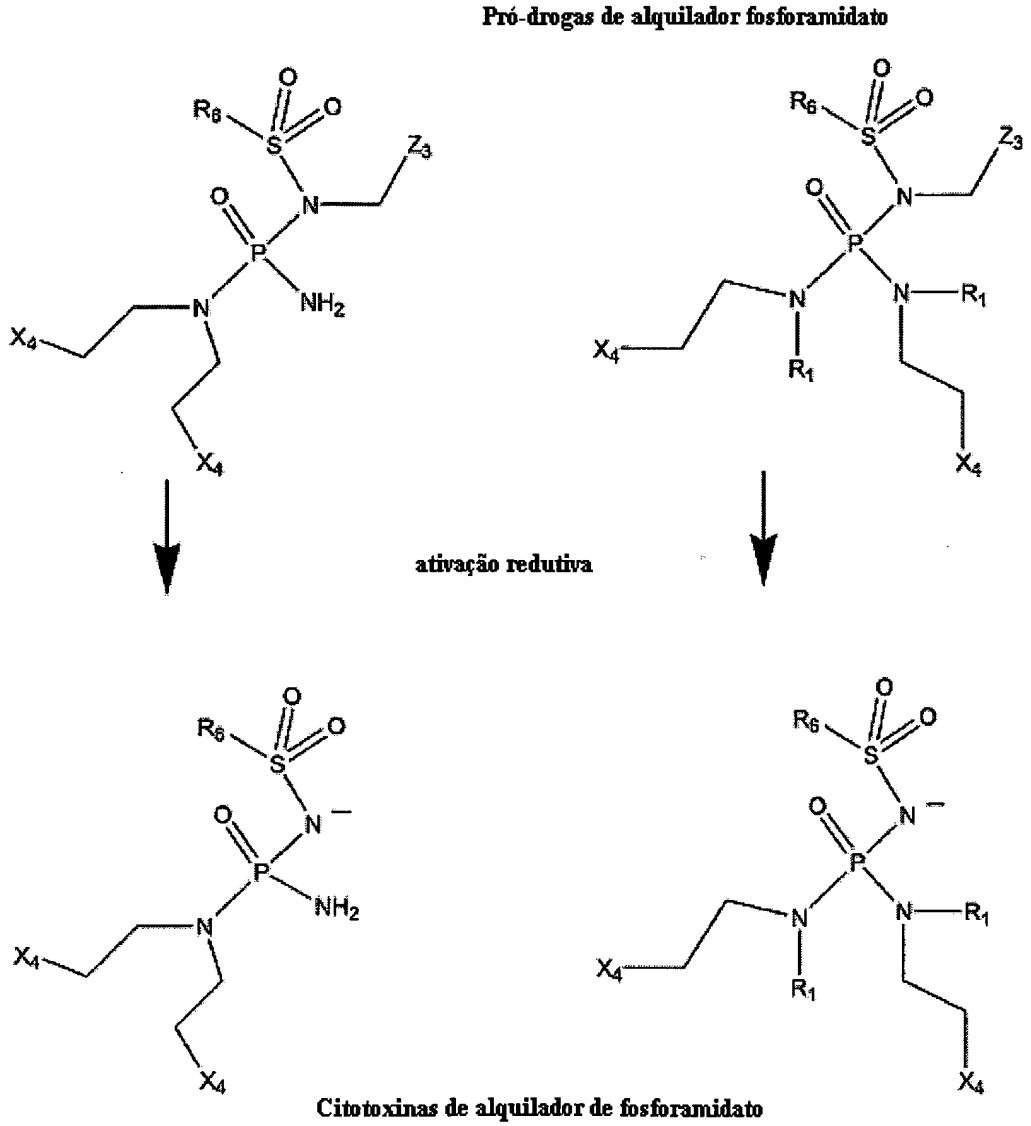
heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_2-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; ou

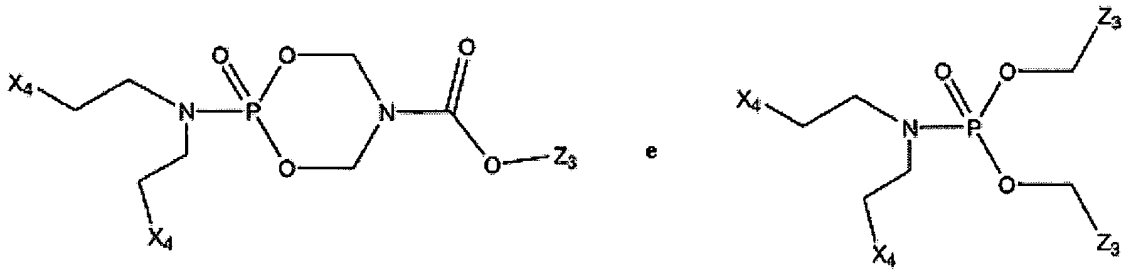
(iii) cada um de NR_2R_3 e NR_4R_5 são ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteros, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos:

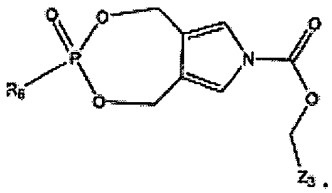


Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos:



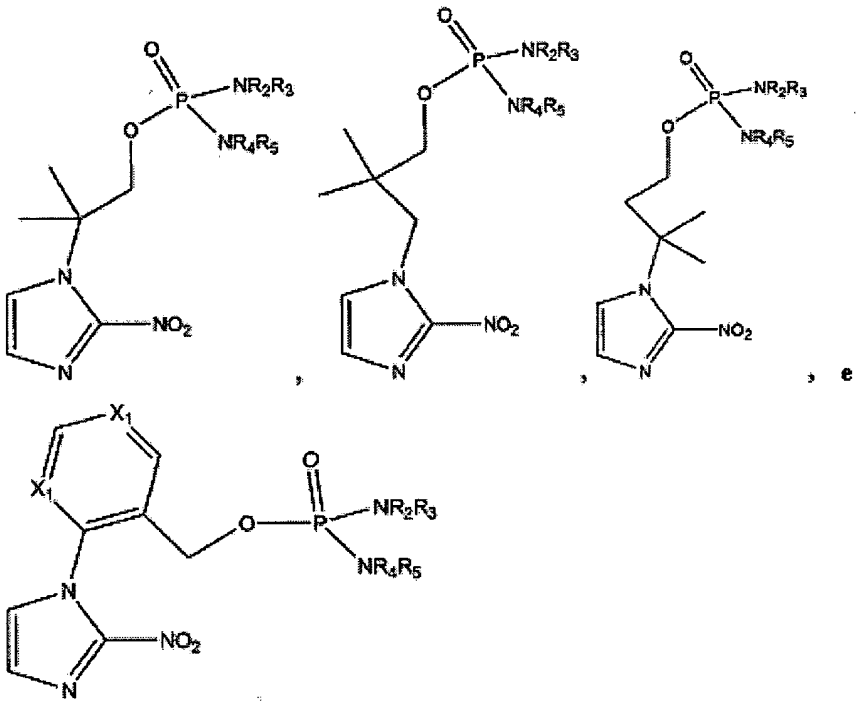
em que X_4 e Z_3 são definidos como acima.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos:



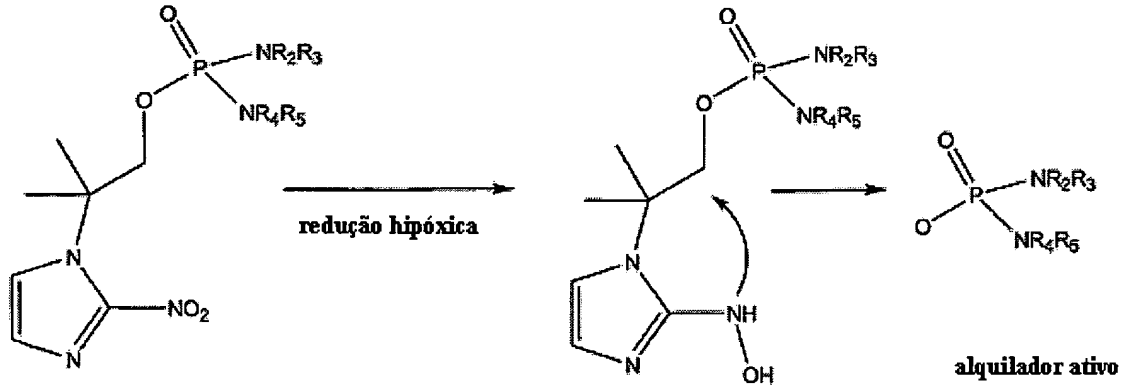
Em uma concretização, R_6 é $-(N\text{-}CH_2CH_2X_4)_2$.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos:



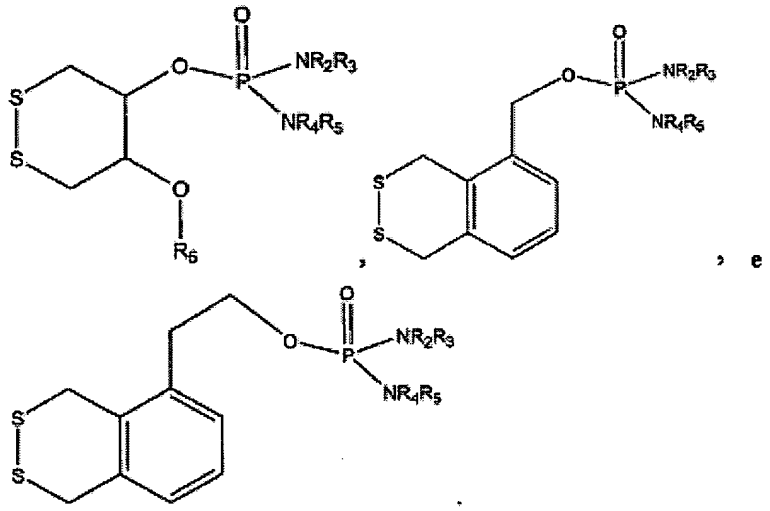
em que R_2 - R_5 são definidos como na fórmula (II)

O esquema a seguir exemplifica redução hipóxica da pró-droga de alquilador de fosforoamidato dando o alquilador de fosforoamidato correspondente.



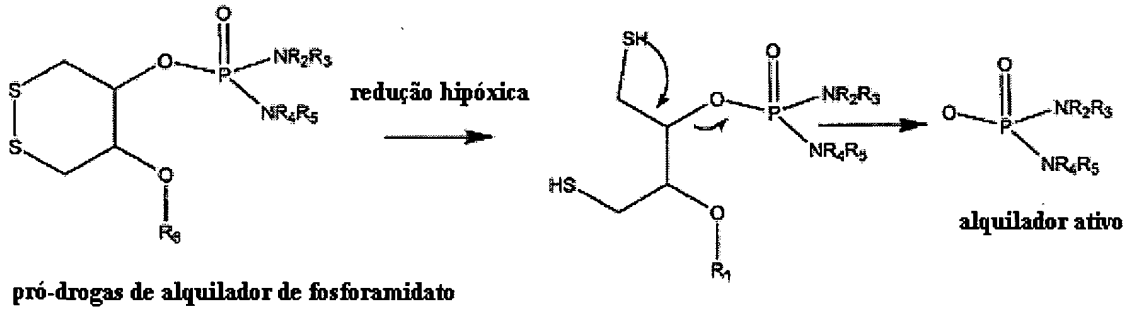
pró-drogas de alquilador fosforamidato

Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos:



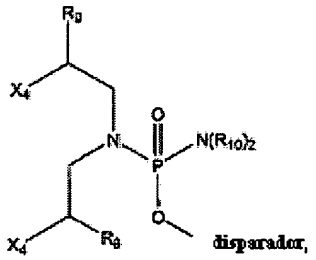
em que R_2-R_5 são definidos como na fórmula (II)

O esquema a seguir exemplifica redução hipóxica da pró-droga de alquilador de fosforoamidato dando o alquilador de fosforoamidato correspondente.

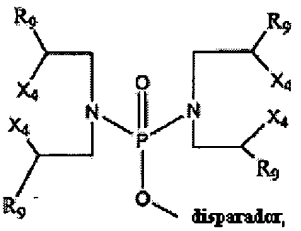


pró-drogas de alquilador de fosforamidato

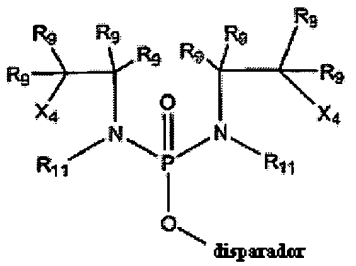
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos das fórmulas (IV) - (VII)



(IV)

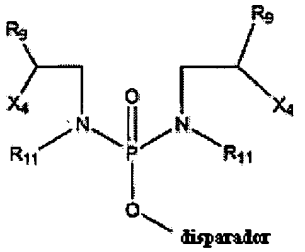


(V)



e

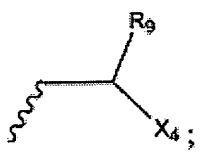
(VI)



(VII)

em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, deutério, arila, heteroarila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, heteroaroíla, C_1-C_6 alcoxicarbonila, C_1-C_6 alquilaminocarbonila, di C_1-C_6 alquilaminocarbonila, ou C_1-C_6 alcóxi; ou, em conjunto, dois grupos R_9 formam um heterociclo; cada R_{10} é hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1- C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila aroíla ou heteroaroíla, ou, em conjunto, dois grupos R_{10} formam um heterociclo;

R_{11} é independentemente hidrogênio, deutério, arila, heteroarila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C6 heteroacila, aroíla, heteroaroíla, C_1-C_6 alcoxicarbonila, C_1-C_6 alquilaminocarbonila, di C_1-C_6 alquilaminocarbonila, ou C_1-C_6 alcóxi; ou, em conjunto, dois grupos R_9 formam um heterociclo com a condição de que quando R_{11} é C_1-C_6 alquila ou C_1-C_6 heteroalquila então R_{11} exclui



;

ou, em conjunto, dois grupos R_{11} formam um heterociclo;

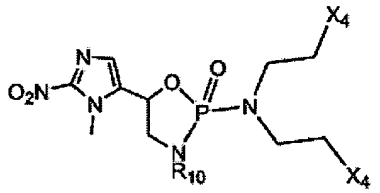
X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroalquilsulfonilóxi; e

Disparador T é $[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}(C(=O)\text{-}O)_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_2\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$.

Em uma concretização relacionada, nas fórmulas (IV) - (VII), cada R_9 é independentemente hidrogênio, deutério, C_1-C_3 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_6 cicloalquila, heterociclila, arila ou heteroarila. Em outra concretização, cada R_9 é independentemente hidrogênio, deutério, ou C_1-C_6 alquila. Em outra concretização relacionada, cada R_9 é independentemente metila, etila, propila, isopropila, isobutila, butila terciária, ou ciclopropila.

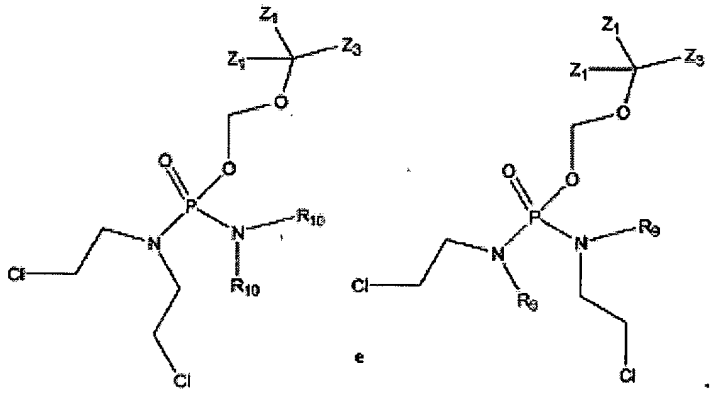
Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (IV) em que um de R_{10} é $-(CH_2)_e$-Intercalador, em que um Intercalador é uma porção aromática ou heteroaromática capaz de intercalar entre um par de bases de ácidos nucleicos.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona o composto:

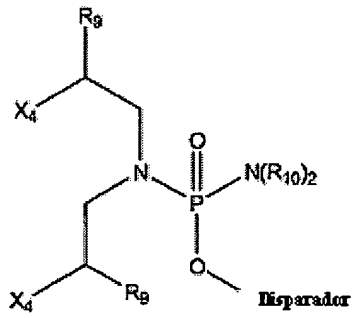


em que X_4 e R_{10} é definido como na fórmula (IV)

Em outra concretização, a presente invenção proporciona o composto:



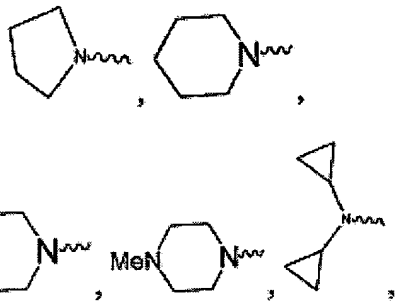
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto de fórmula (VIII):



(VIII)

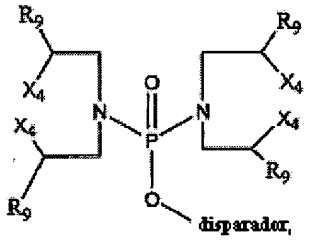
em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila;

e $N(R_{10}))_2$ é selecionado dentre NH_2, NHMe, NMe_2, Net_2,



NHOMe, e NHOH.

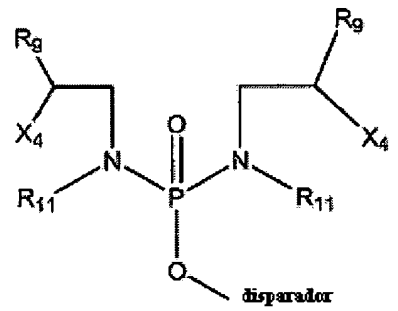
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (IX):



(IX)

em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila.

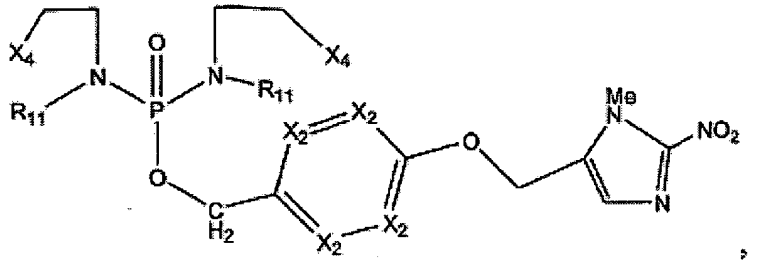
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (X):



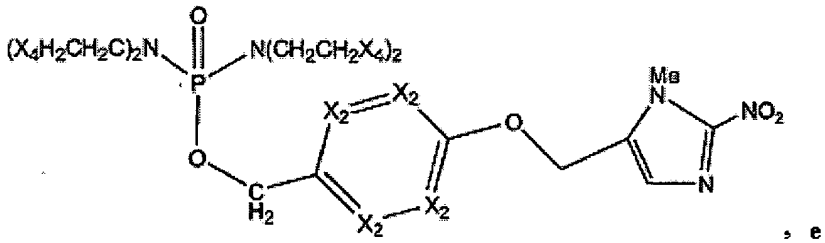
(X)

em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila; e cada R_{11} é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, benzila, metila substituído, ciclopropila, metóxi, e hidroxila; ou, em conjunto, dois R_{11} formam um heterociclo.

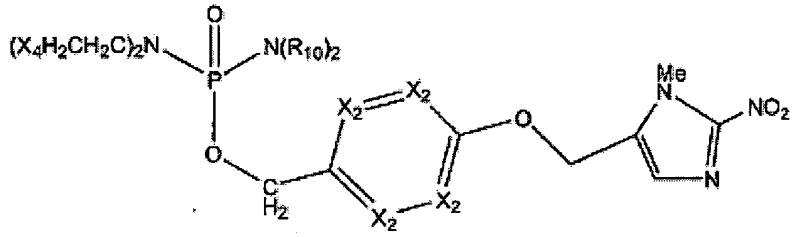
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos das fórmulas (X-A), (X-B) e (X-C):



(X-A)



(X-B)

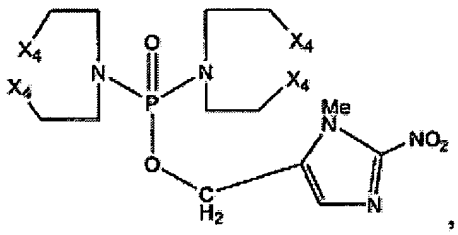


(X-C)

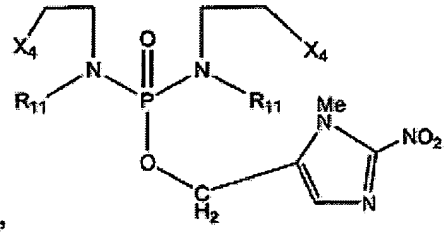
em que X_2 e X_4, são definidos na fórmula (I), e R_{10}, e R_{11} são definidos como

nas fórmulas (IV), (VI) e (VII).

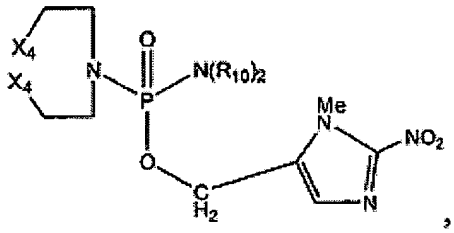
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos da fórmula (XI)-(XV):



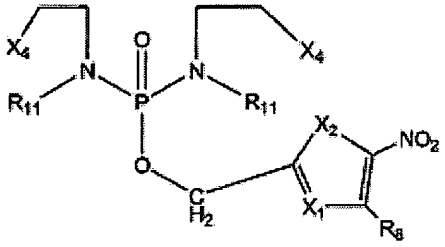
(XI)



(XII)

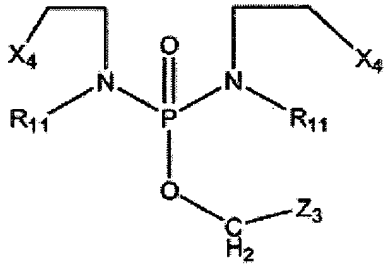


(XIII)



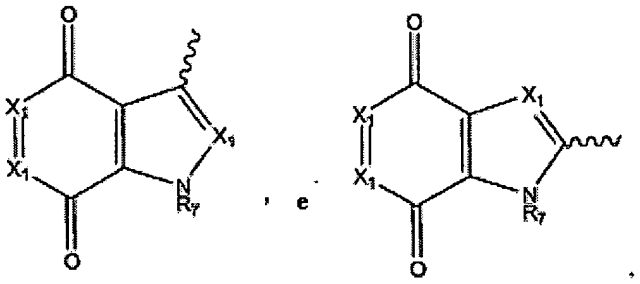
(XIV)

e

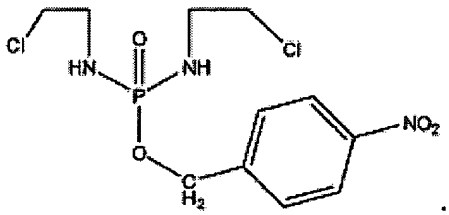


(XV)

em que cada R_{11} é independentemente hidrogênio, metila ou metila substituído, benzila, isopropila, propila, ciclopropila, metóxi, e hidroxila; e X_1, X_2, e Z_3 são definidos como acima; e X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, cicloalquilsulfonilóxi, heterocicloalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi. Em uma concretização, em compostos de fórmulas (XII), (XIV), e (XV), quando X_4 é Cl ou Br então R_{11} exclui isopropila. Em uma concretização, um composto de fórmula (X) exclui um composto, em que Z_3 é

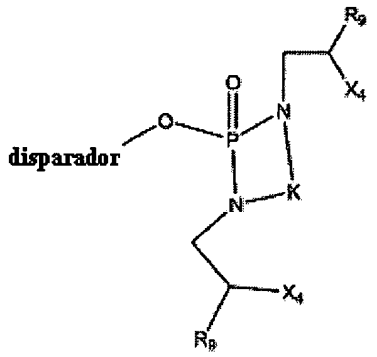


Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (XII), (XIV), ou (XV) em que cada R_{11} é hidrogênio. Exemplos de compostos de fórmula XII, XIV, ou XV incluem compostos 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19, 23, 24, 25, 26, 32, 34, e 36. Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato de fórmulas XII, XIV, ou XV, em que R_{11} exclui propila ou isopropila. Em outra concretização, a presente invenção exclui o composto:



Em uma concretização a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, em que R_{11} é C_3-C_8 cicloalquila. Em outra concretização, o cicloalquila é ciclopropila. De uma forma geral, um grupo ciclopropila pode ser mais estável do que um grupo alquila para metabolizar oxidativamente proteínas na célula, particularmente no fígado, os compostos de pró-droga da invenção proporcionam uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato aperfeiçoado farmacocineticamente em comparação com pró-drogas conhecidas de alquilador de fosforoamidato.

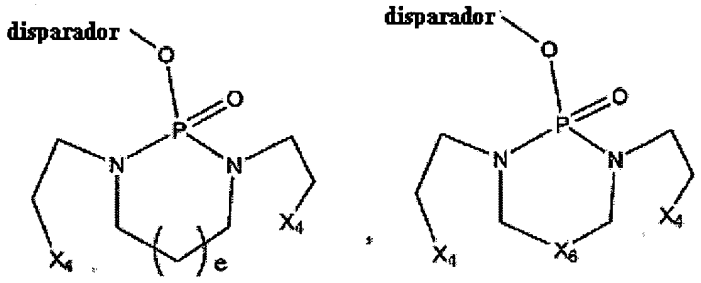
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos da fórmula (XVI)



(XVI)

em que K é C_1-C_6alquileno ou C_1-C_6 heteroalquileno. Em uma concretização K é $(C(R_{12})_2)_e$, $CH_2CH_2(-X_6-CH_2CH_2)_f$, ou $CH_2(-X_6-CH_2)_f$, em que e é 1-10, f é 0-3, e X_6 é O, S, ou NR_{12}, em que cada R_{12} é independentemente definido como acima.

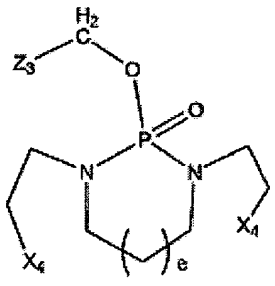
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos da fórmula (XVII - (XVIII)



(XVII) (XVIII)

em que e é 0-4, X_4 é Cl ou Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi; X_6 é O, S, ou NR_{12} em que R_{12} é definido como acima.

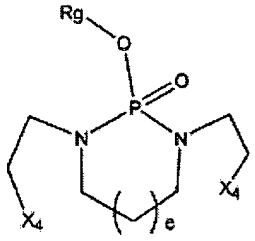
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto de fórmula (XIX):



(XIX)

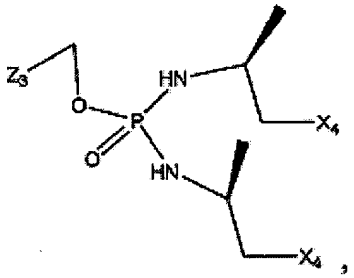
em que e é 0-4, e X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi. Em uma concretização relacionada, a presente invenção proporciona um composto de fórmula (XIX) em que e é 1. Ver Seção de Exemplos para exemplos de composto de fórmulas como descrito aqui.

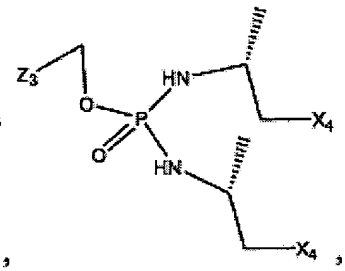
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto de fórmula (XX):

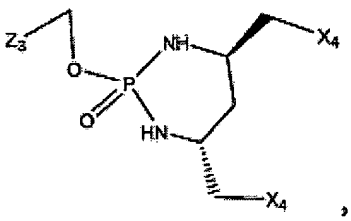


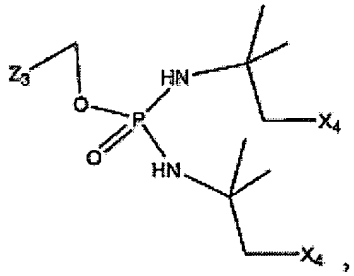
em que R_g é glicose ou um análogo de glicose; e é 0-4, e X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi. Como usado aqui, um análogo de glicose inclui mono, di e tri sacarídeos. Em uma concretização relacionada, a presente invenção proporciona um composto de fórmula XX em que e é 1.

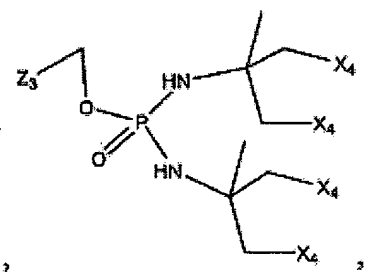
Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos:

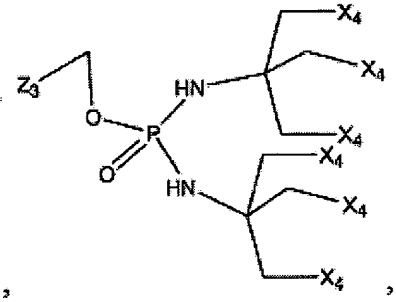


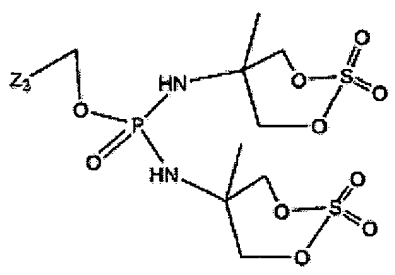




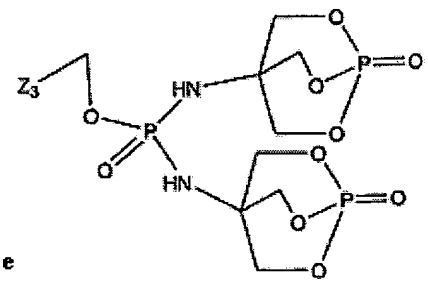






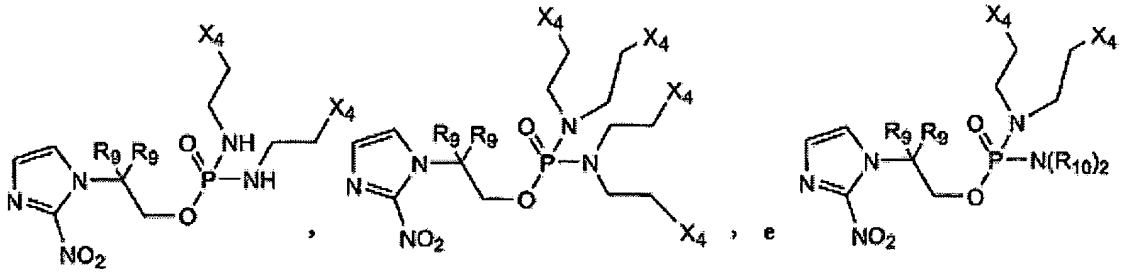


e



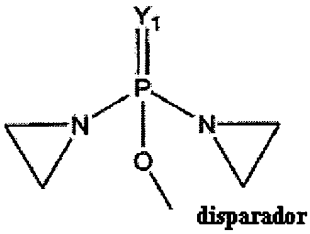
em que X_4 é Cl, Br, ou alquilsulfoniloxi.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona os compostos:



em que R_9 e X_4 são definidos na fórmula VI.

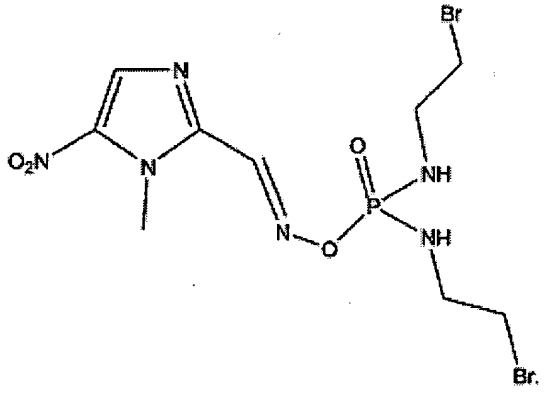
Em uma concretização, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (XXI)



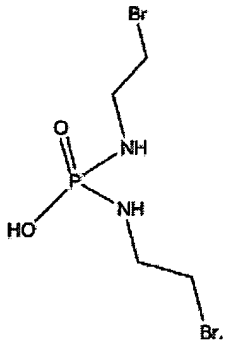
(XXI)

em que Y_1 é S ou O; e disparador T é definido como na fórmula (I).

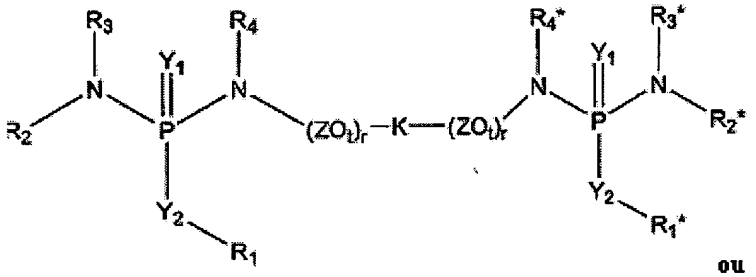
Em outra concretização, a presente invenção proporciona o conjugado de oxima-alquilador de fosforoamidato:



Em uma concretização, um referido conjugado de oxima-alquilador de fosforoamidato pode ser hidrolisado enzimaticamente para produzir



Em outro aspecto, a presente invenção proporciona os compostos da fórmula (XXII):

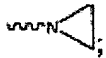


(XXII)

R_1-R_5, Y_1, e Y_2 são definidos na fórmula (I);

cada R_1-R_5 e R_1*-R_5* é selecionado independentemente do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila; ou, em conjunto, R_2 e R_2* formam um heterociclo; ou cada R_1-R_5 e R_1*-R_5* é independentemente um disparador T selecionado do grupo que consiste de $-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-[C(=O)-O]_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[-C(Z_1)=C(Z_1)]_g-Z_3$ e $-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-(S(=O)_2)_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_2-[C(Z_1)=C(Z_1)]_g-Z_3-$; com a condição de que na fórmula (XXII):

(i) pelo menos dois de R_1-R_5 e R_1*-R_5* são 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, ou 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; ou

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 e R_1*-R_5* é 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila ou 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_2*R_3* é ; ou

(iii) cada NR_2R_3 e NR_2*R_3*, ambos ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteros, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

cada Z é independentemente C, S, ou P;

cada t é independentemente 1 ou 2;

cada r é independentemente 0 ou 1;

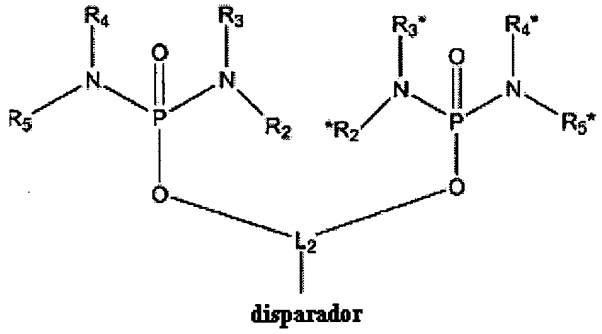
K é selecionado do grupo que consiste de C_1-C_6alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno, arileno, ou heteroarileno, $(C(R_9)_2)_n$; e $(Y_5$-$(C(R_9)_2)_m$-Y_4-$(C(R_9)_2)_m$-$Y_6)n$ em que n é 1-8;

cada m é independentemente de 1 a 4;

cada R_9 é independentemente C_1-C_6 alquila ou heteroalquila, ou, em conjunto, quando ligados covalentemente ao mesmo átomo de carbono ou átomos de carbono adjacentes são cicloalquila ou heterociclila; e

cada Y_4,Y_5, e Y_6 é independentemente O, S, NR_7, ou uma ligação; com a condição de que um de Y_4,Y_5, e Y_6 precisa ser O, S, ou NR_7.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona os compostos da fórmula (XXIII):



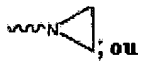
(XXIII)

R_1-R_5, Y_1, e Y_2 são definidos na fórmula (I);

cada R_1-R_5 e R_1*-R_5* é selecionado independentemente do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila; ou, em conjunto, R_2 e R_2* formam um heterociclo; ou cada R_1-R_5* é independentemente um

disparador T selecionado do grupo que consiste de $-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-[C(=O)-O]_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[-C(Z_1)-C(Z_1)]_g-Z_3$ e $-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-(S(=O)_2)_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[C(Z_1)=C(Z_1)]_g-Z_3-$; com a condição de que na fórmula (XXIII)

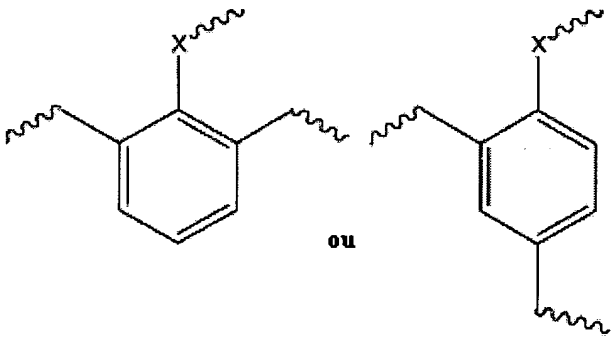
(i) pelo menos dois de R_2-R_5 e R_2*-R_5* são 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, ou 2-heteroalquil-sulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_2-R_5 e R_2*-R_5* é 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, ou 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e um de NR_2R_3 e NR_2*R_3* é ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_2*R_3* em conjunto, são ambos ; ou NR_4R_5 e NR_4*R_5* em conjunto são ambos ; e

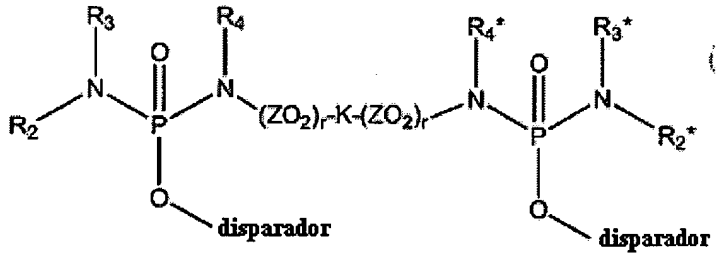
um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteros, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato, ou uma pró-droga farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

L^2 é



em que X é definido como acima.

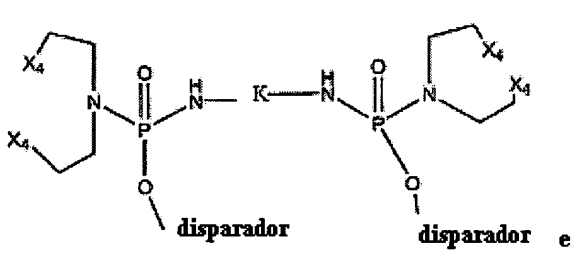
Em outra concretização, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (XXIV):



(XXIV)

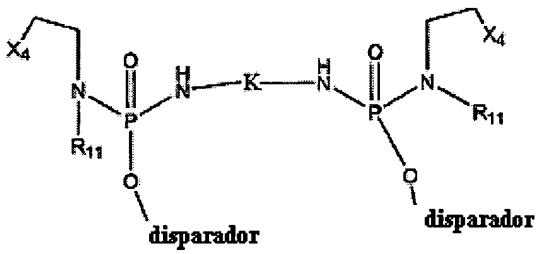
em que R_2, R_3, R_4, R_2*, R_3*, R_4*, Z, K e disparador são como definido na Fórmula (XXII).

Em outra concretização, a presente invenção proporciona os compostos de fórmula (XXIV) apresentando a estrutura de fórmula (XXV) ou (XXVI):



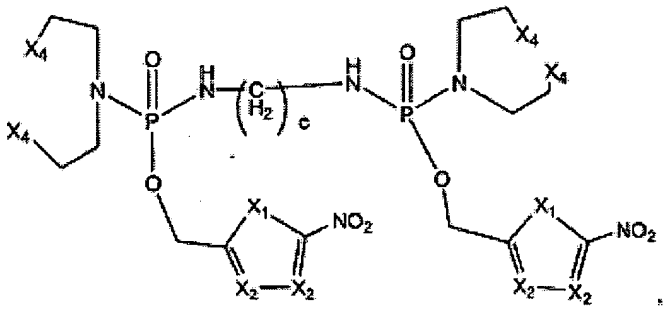
(XXV)

e



(XXVI)

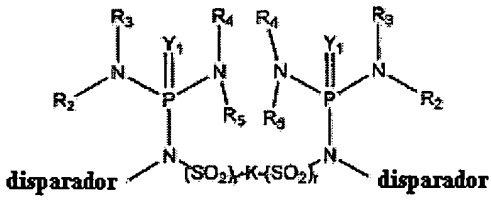
Em outra concretização, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (XXVI):



(XXVI)

em que X_1, X_2, X_4, e são definidos na fórmula (XXV).

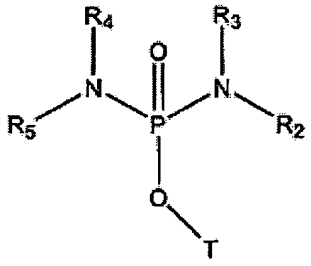
Em outro aspecto, a presente invenção proporciona o composto da fórmula (XXVII):



(XXVII)

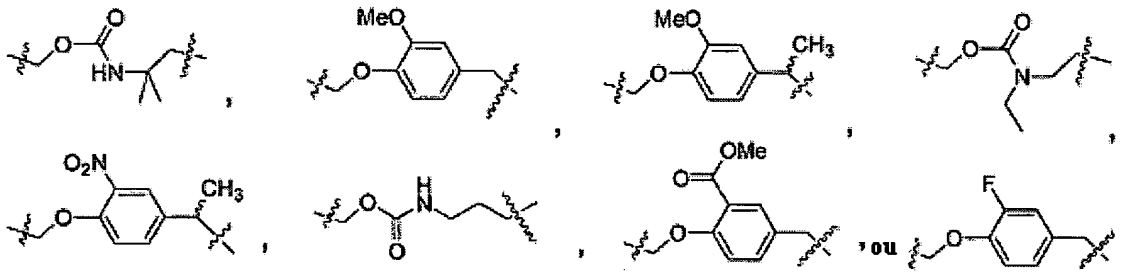
em que R_2-R_5, r, K, Y_1, e disparador T são definidos na fórmula (XXIV).

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto de Fórmula:

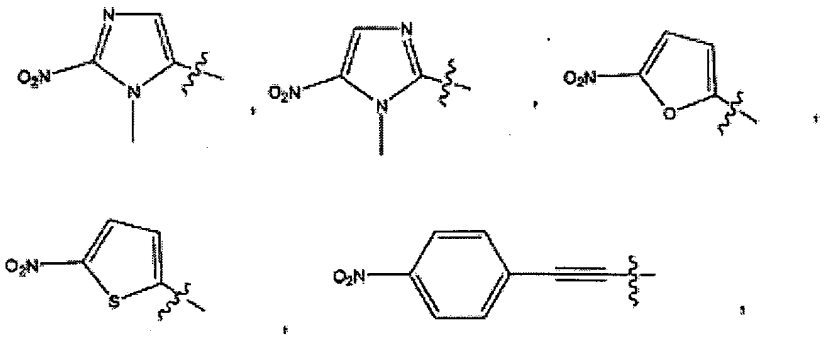


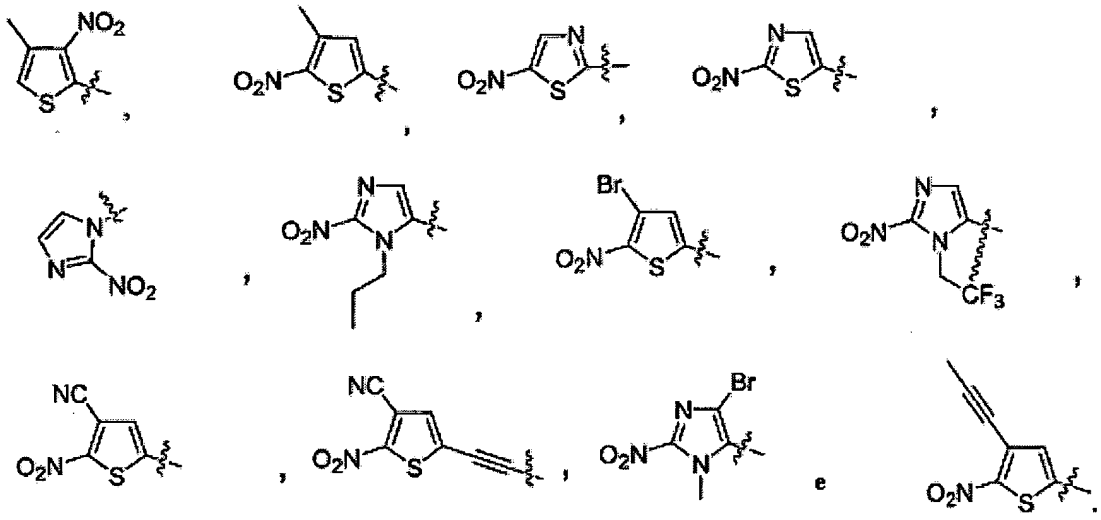
em que T é L-Z_3;

L_1 é CH_2, CHMe, $C(Me)_2$, CH_2OCH_2, $(CH_2)_3$, $CH_2S(CH_2)_2$, $CH_2S(CH_2)_3$,

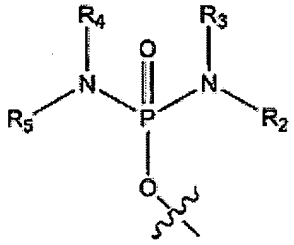


Em outra concretização, a presente invenção proporciona um Z_3 selecionado do grupo que consiste de:

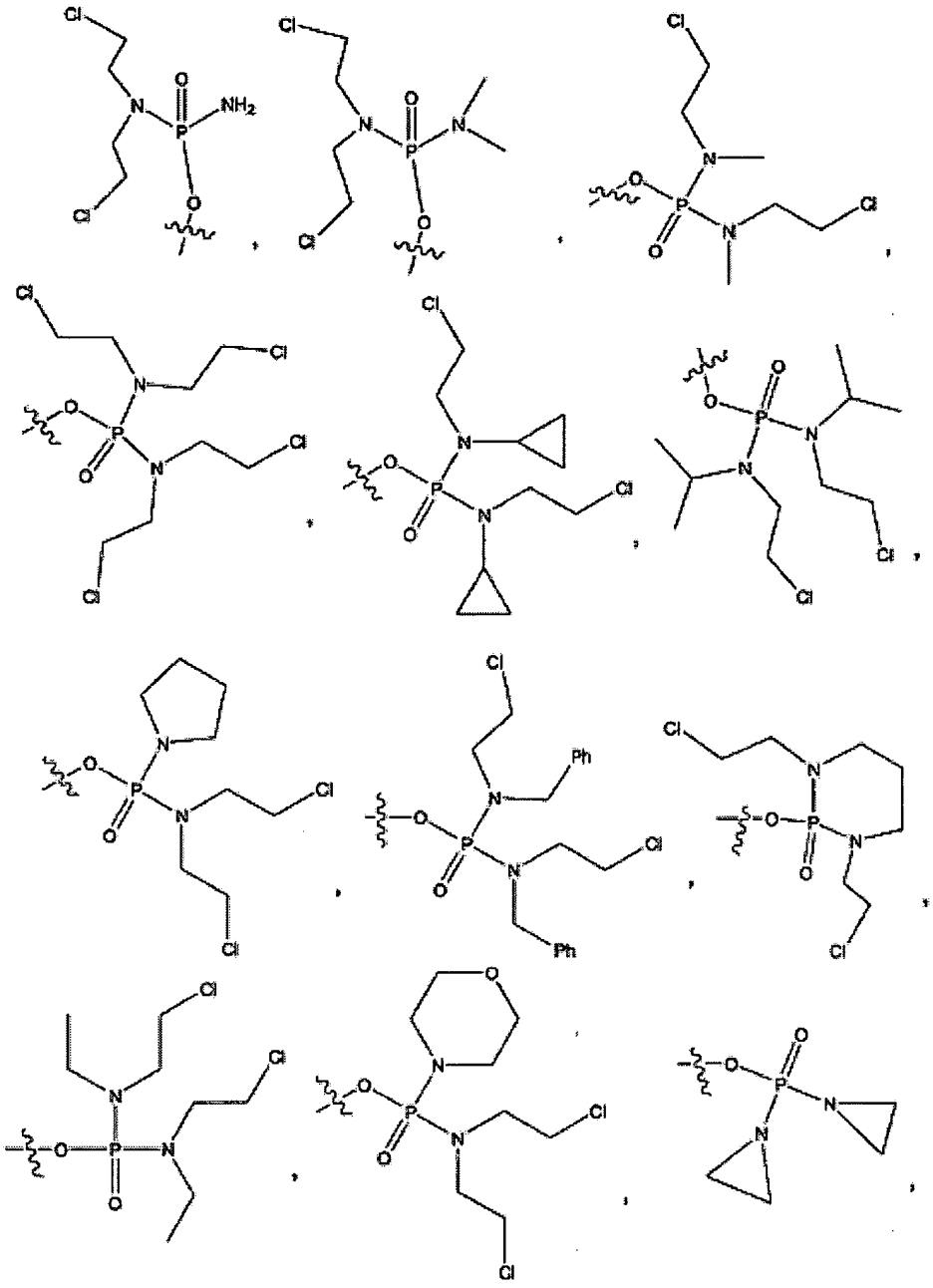


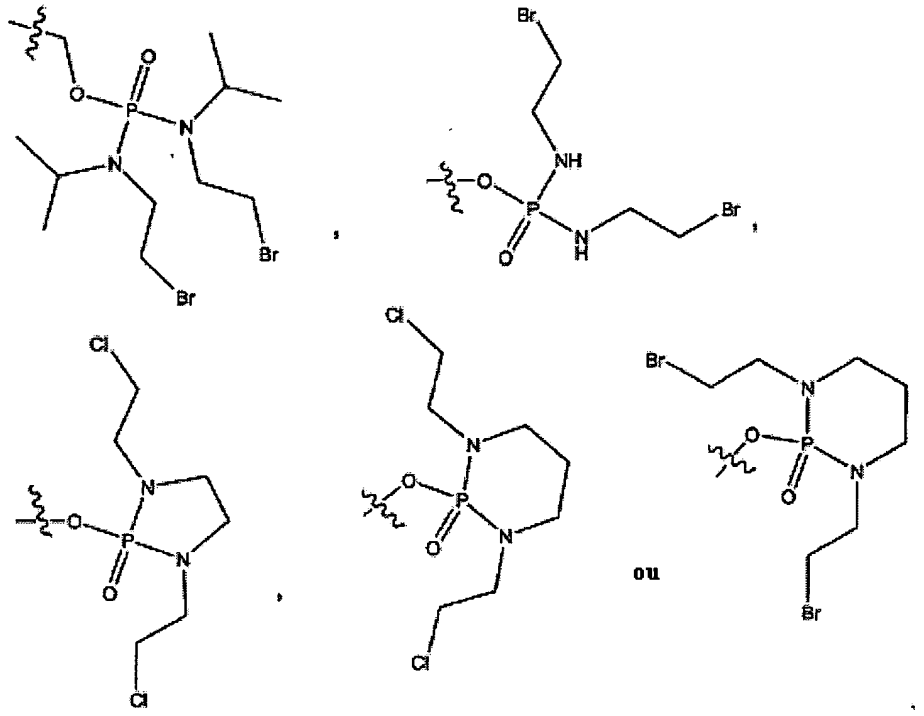


Em outra concretização, a presente invenção proporciona uma porção apresentando a fórmula:

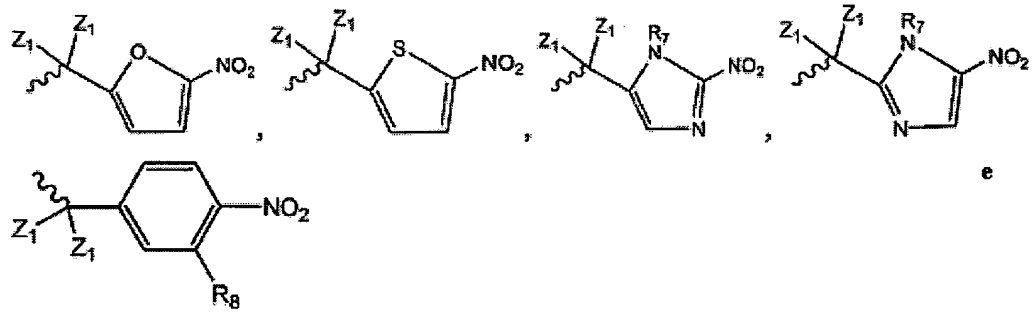


selecionado do grupo que consiste de:

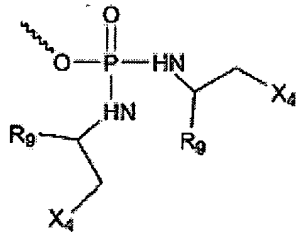




Em outra concretização, a presente invenção proporciona um T selecionado do grupo que consiste de:



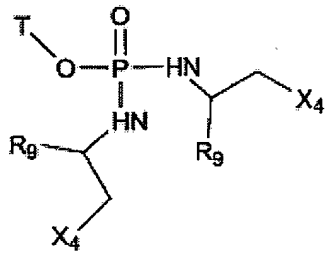
em que cada um de Z_1, R_7, e R_8 é como definido acima. Nesta concretização, Z_1 é hidrogênio, metila, ou etila; R_7 é metila, trifluoroetila, etila, propila, e ciclo-hexila; e R_8 é OH ou $OP(=O)(OH)_2$. Nesta concretização,



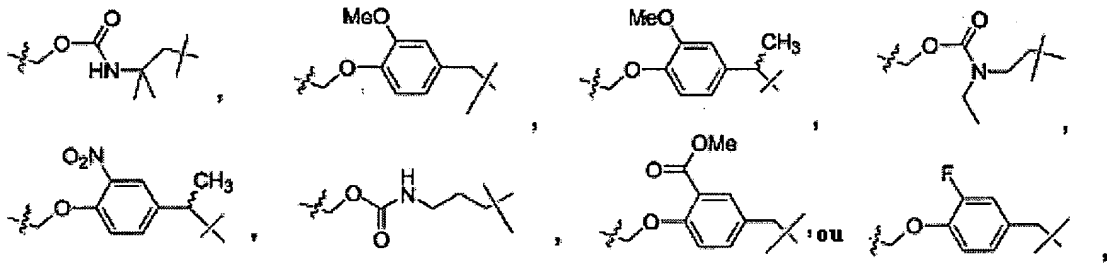
em que cada R_9 é hidrogênio ou C_1-C_6 alquila e cada X_4 é halo ou $R_{sul}S(=O)_2O$-. Em outra concretização, R_9 é hidrogênio, metila, etila, isopropila, ou isobutila; e X_4 é cloro, bromo, ou metanossulfonilóxi.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona um

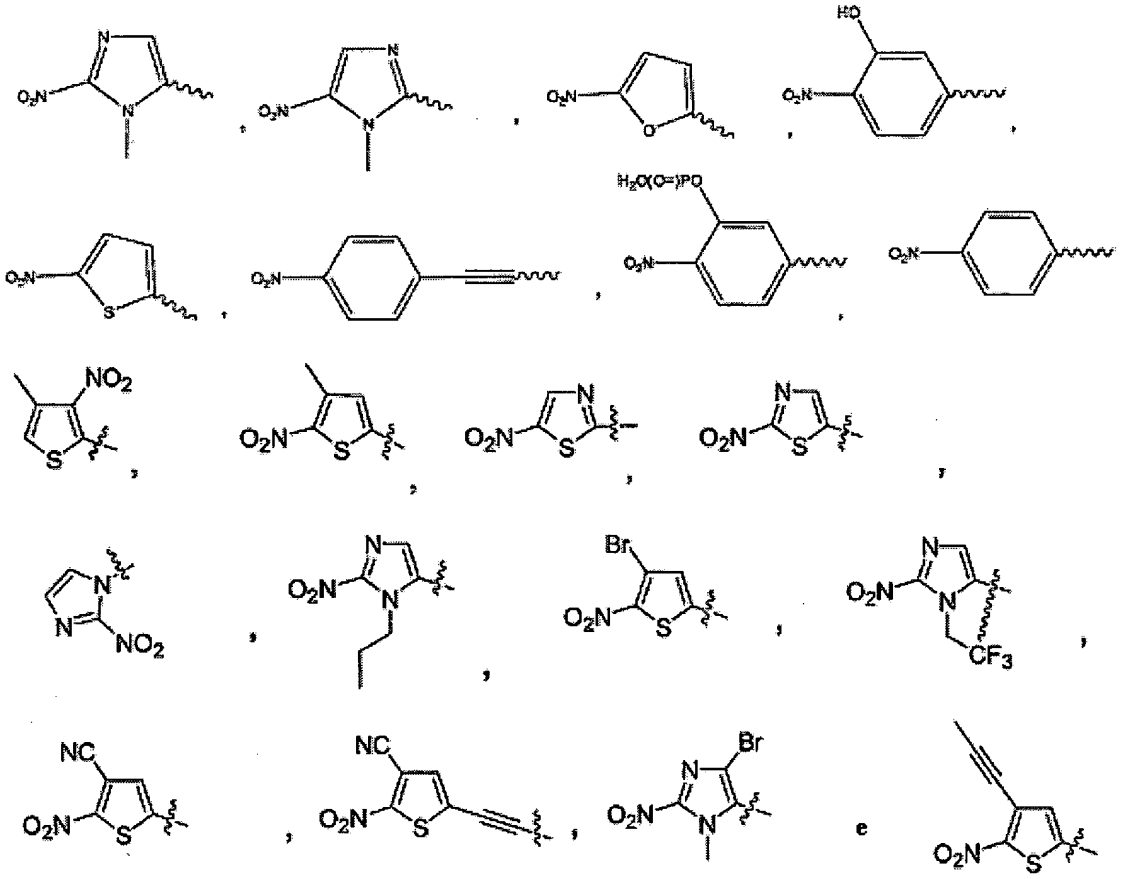
composto de Fórmula:



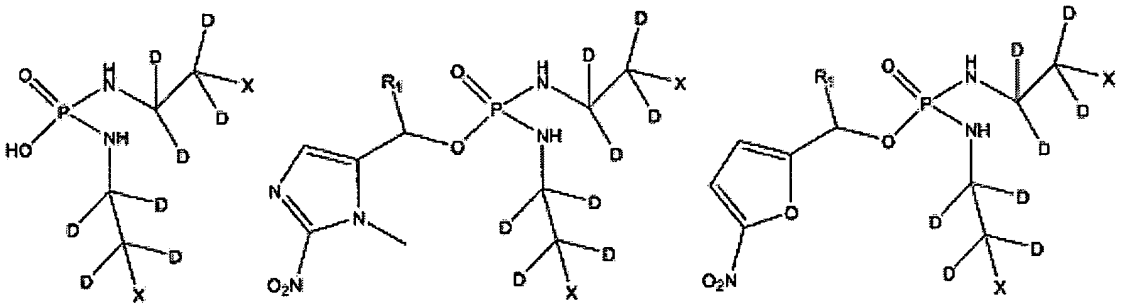
em que T é como definido acima ou mais particularmente T é L-Z_3, em que L CH_2, CHMe, CMe_2,



e Z_3 é

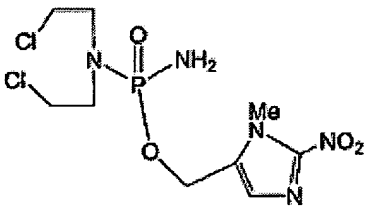


Em um aspecto a presente invenção proporciona alquiladores de fosforoamidatos deuterados e pró-drogas de alquilador de fosforoamidato deuterado de fórmula

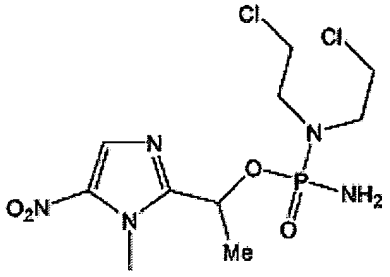


em que X_4 é halo ou $R_{sul}S(=O)_2O$. Em outra concretização, X_4 é Cl ou Br. Referidos alquiladores de fosforoamidatos deuterados e suas pró-drogas são igualmente citotóxicos com relação a tecido de tumor hipóxico quanto análogos não-deuterados ou hidrogenados, como compostos 25, 36 e análogos. No entanto, a presença de referidos análogos deuterados *in vivo*, por exemplo, no plasma sanguíneo, pode ser determinada mais eficientemente em comparação com seus correspondentes alquiladores de fosforoamidatos e/ou pró-drogas de alquilador de fosforoamidato por meio de métodos de ressonância magnética nuclear, e referidos análogos deuterados podem ser úteis na determinação de propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas dos alquiladores de fosforoamidatos e/ou pró-drogas de alquilador de fosforoamidato. Informação farmacocinética e ou farmacodinâmica de alquiladores de fosforoamidatos e/ou pró-drogas de alquilador de fosforoamidato é usado para determinar a dosagem, freqüência de dosagem, e parâmetros similares relacionados com a administração. A síntese de um composto octadeuterado 25 e alquilador de isofosfamida octadeuterado encontra-se descrita na Seção de Exemplos.

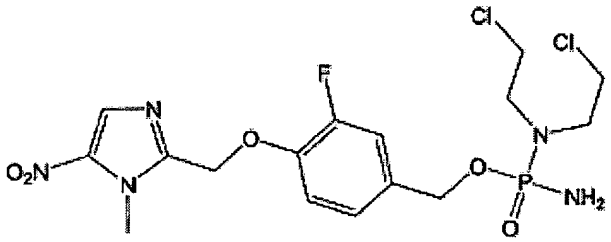
Em outro grupo de concretizações, a presente invenção proporciona os grupamentos individuais e seletivos dos compostos dos Exemplos. Exemplos de compostos da invenção incluem:



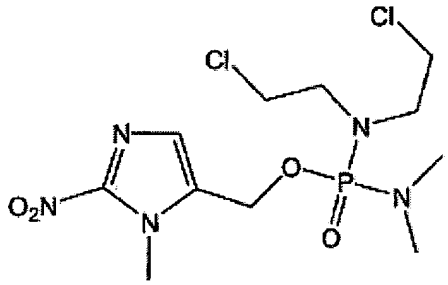
1



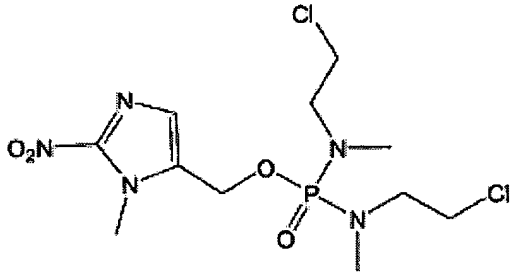
2



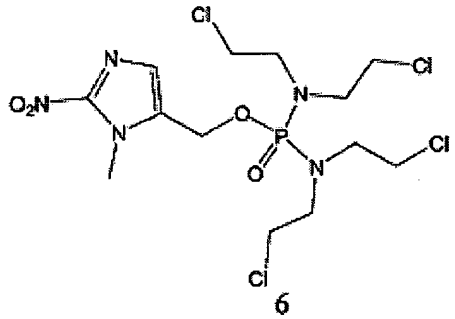
3



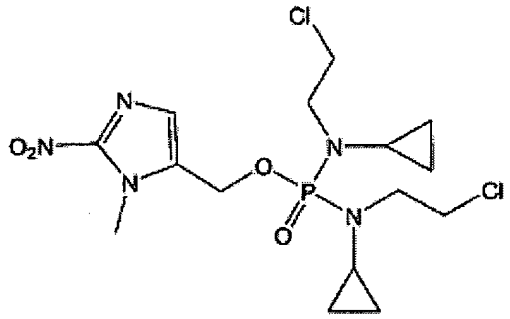
4



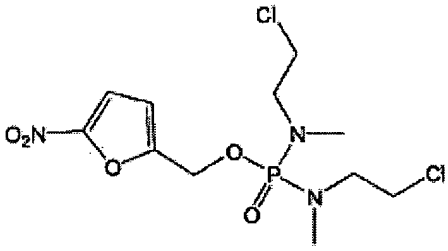
5



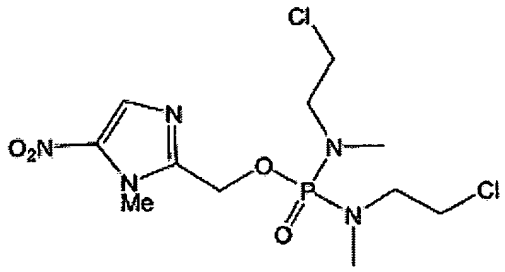
6



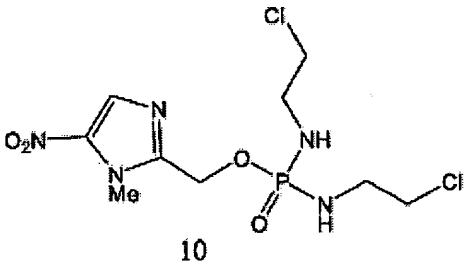
7



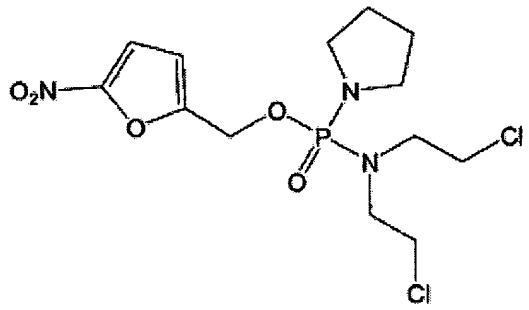
8



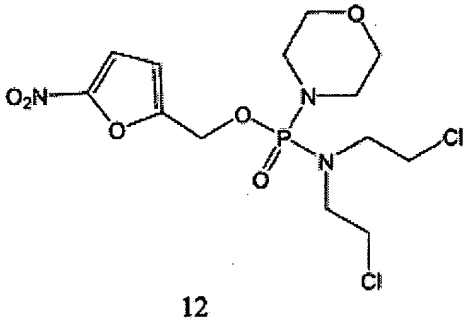
9



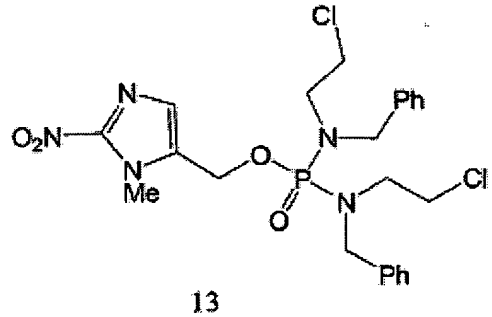
10



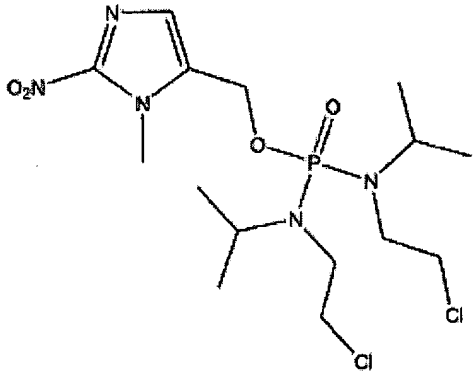
11



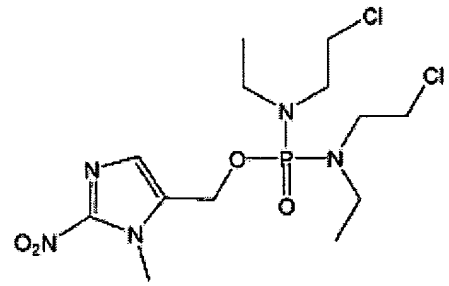
12



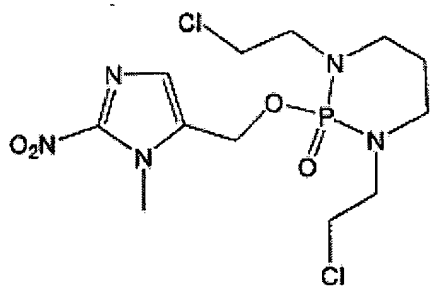
13



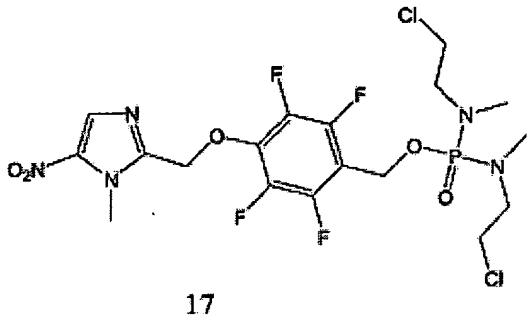
14



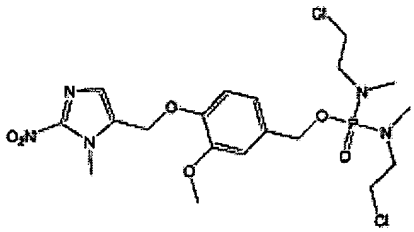
15



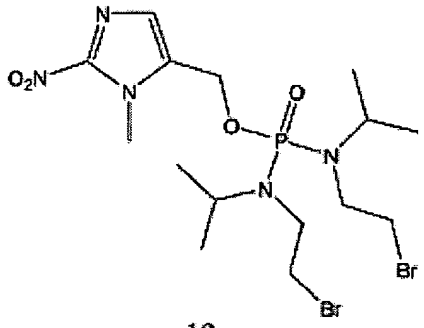
16



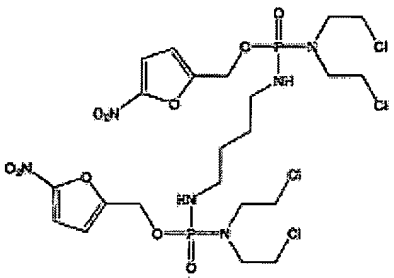
17



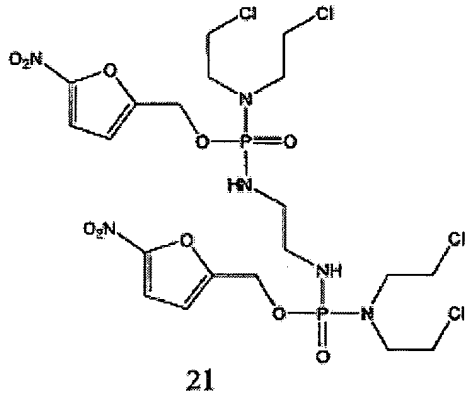
18



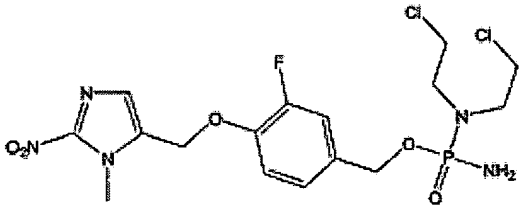
19



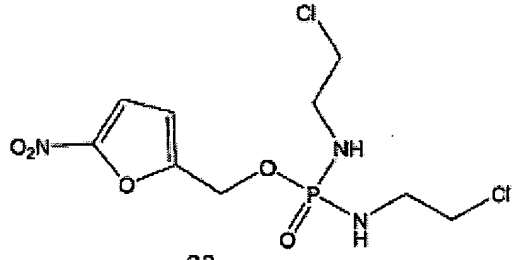
20



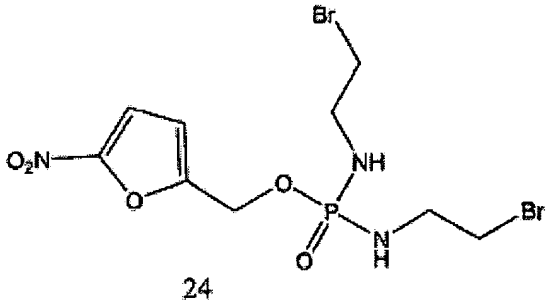
21



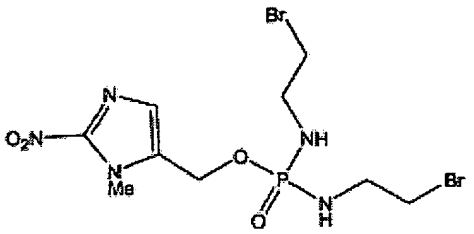
22



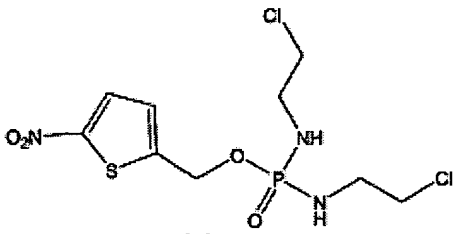
23



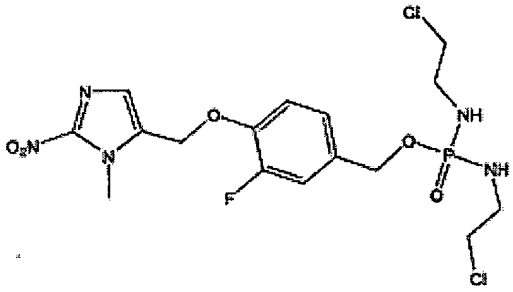
24



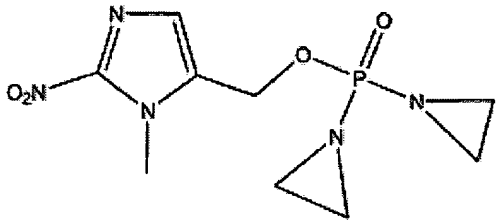
25



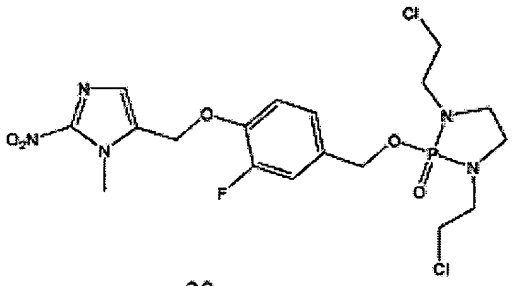
26



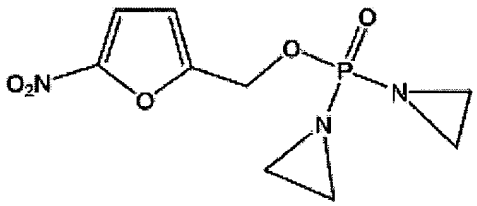
27



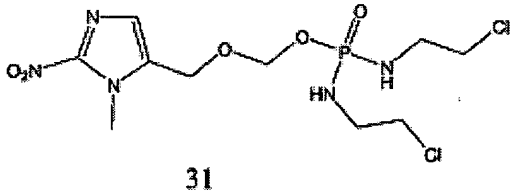
28



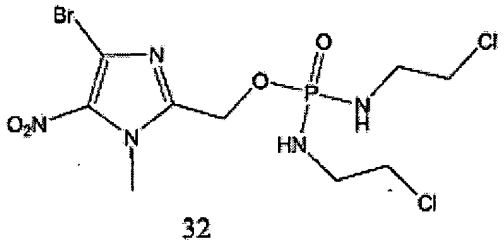
29



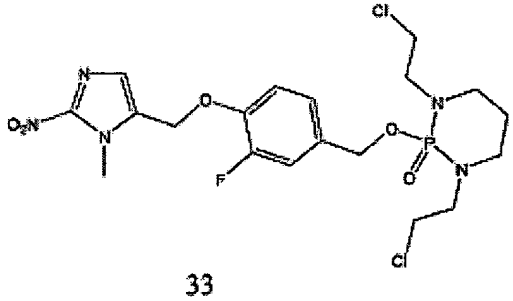
30



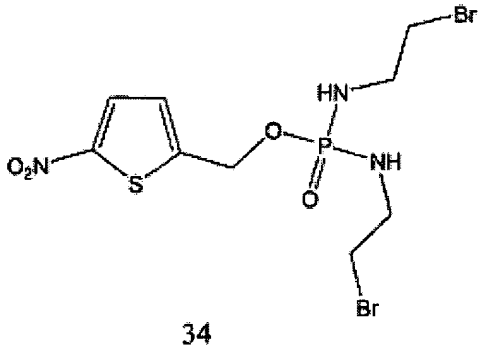
31



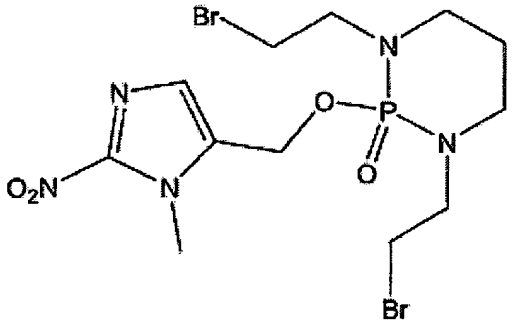
32



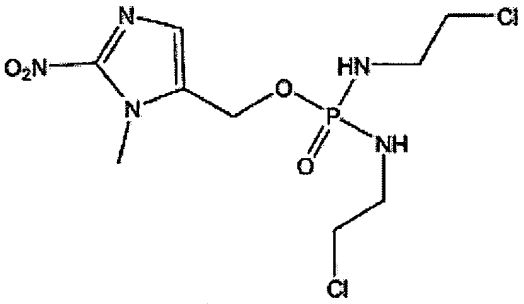
33



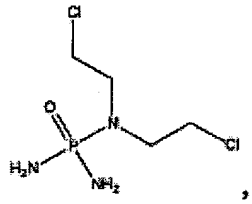
34



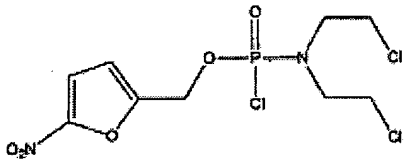
35



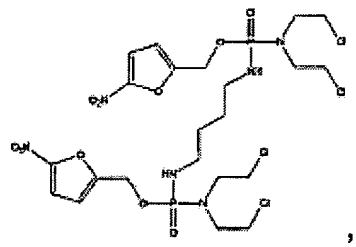
36



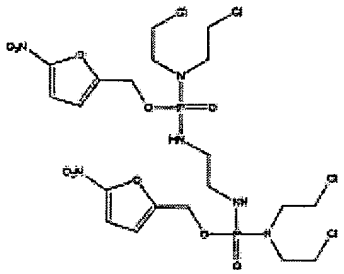
134



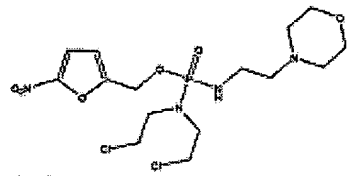
135



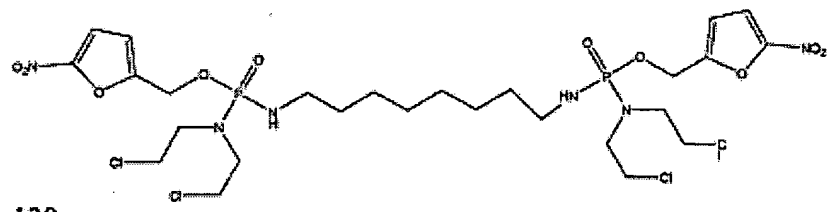
136



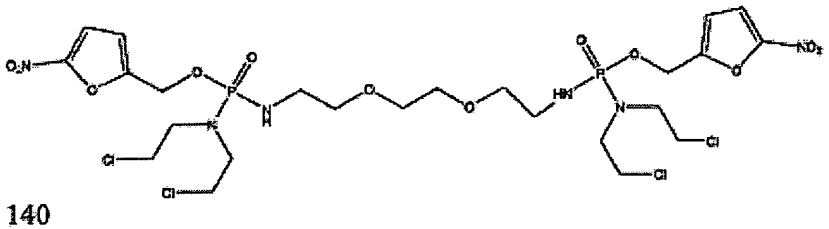
137



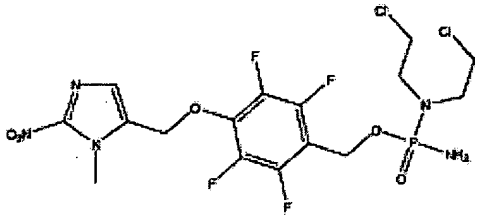
138



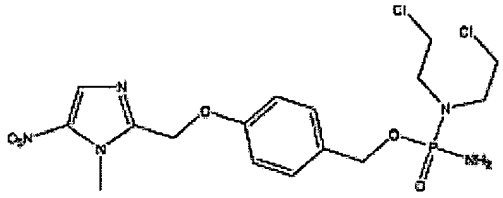
139



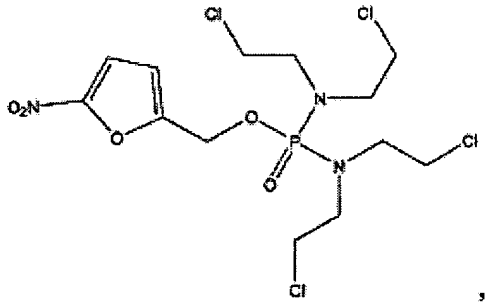
140



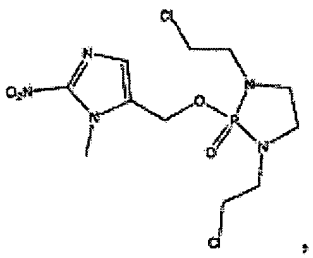
141



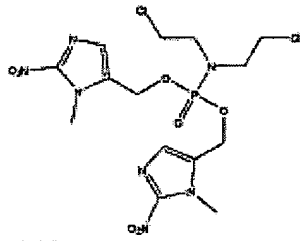
142



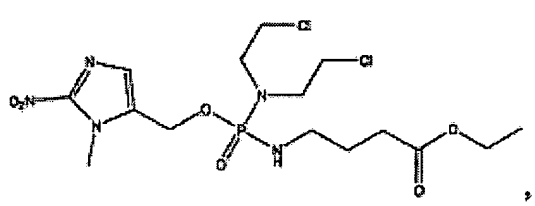
143



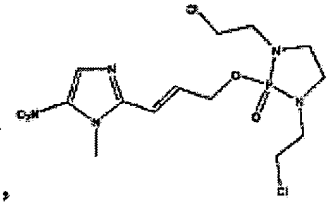
144



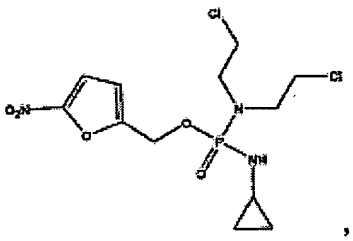
145



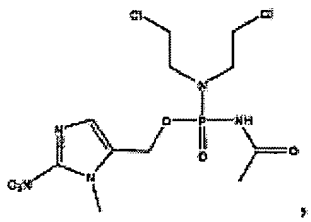
146

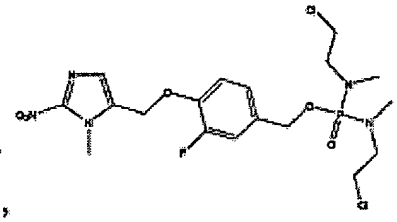


147

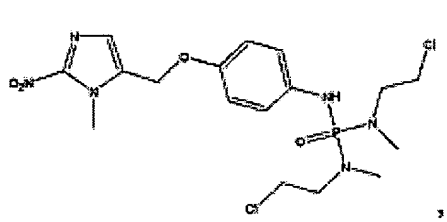


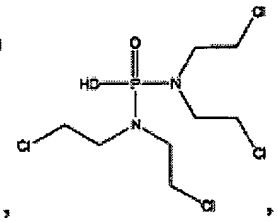
148

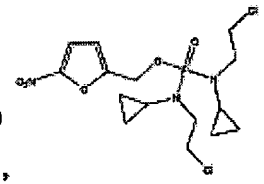




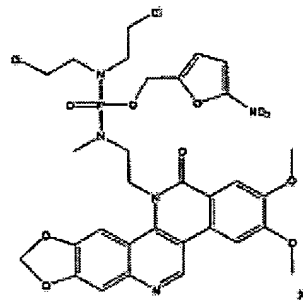
149 150

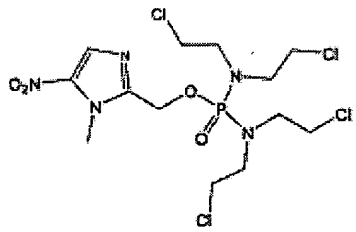






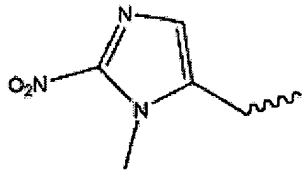
151 152 153





154 155

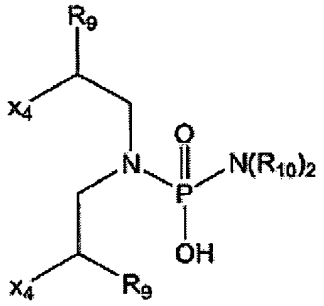
Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato contém



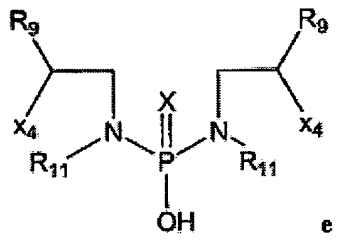
porque Z_3 e mostra toxicidade específica para tumor hipóxico embora seja muito menos tóxica para tecido saudável normóxico.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato inédita que, após biorredução,

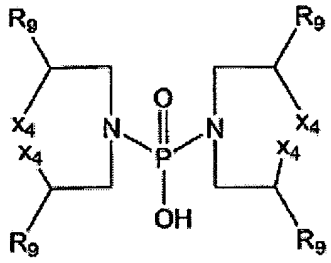
libera o alquilador de fosforoamidato correspondente inédito ou conhecido



1a



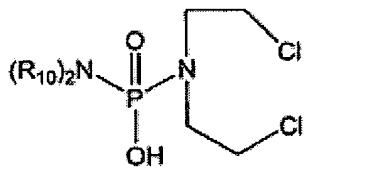
1b



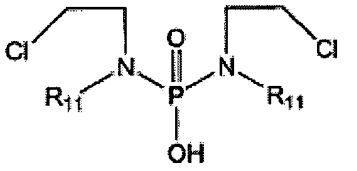
1c

em que X_4 é definido como na fórmula (I), e R_9, $R_{10;}$ e R_{11}, são definidos como nas fórmulas (IV)- (VII), e formas ionizadas dos mesmos. Em uma concretização relacionada, X_4 é Cl, Br, metanossulfoniloxi, benzenosulfoniloxi, ou para-toluenossulfoniloxi.

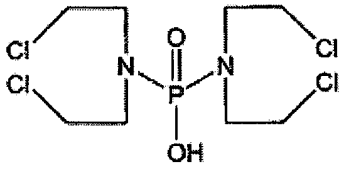
Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato inédita que, após biorredução, libera os correspondentes alquiladores de fosforoamidatos inéditos ou conhecidos



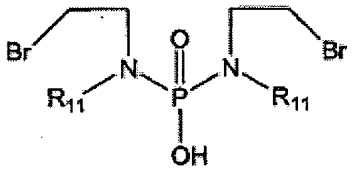
1d



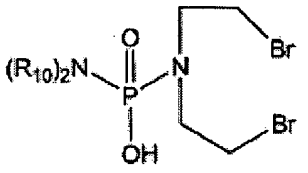
1e



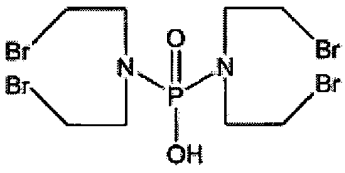
1f



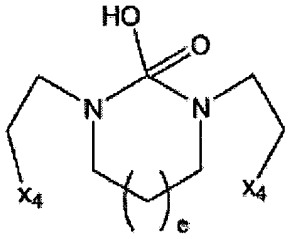
1g



1h



1i

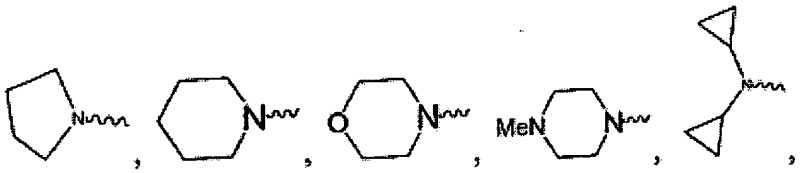


1j

e formas ionizadas dos mesmos;

em que $N(R_{10})_2$ é selecionado do grupo que consiste de NH_2, NHMe, NMe_2,

NEt_2,



NHOMe e NHOH; em que cada R_{11} é independentemente hidrogênio, Me, etila, ciclopropila, isopropila, propila, benzila, metila substituído, ciclopropila, metóxi, e hidroxila; ou, em conjunto, dois R_{11} formam um heterociclo.

O agente anticâncer Ciclofosfamida metaboliza a 1d (R_{10} é hidrogênio) e Ifosfamida metaboliza a 1e (cada R_{11} é hidrogênio), quando usado no tratamento de câncer. Glufosfamida, que está sendo avaliada na clínica para tratamento de câncer, libera um alquilador de fórmula 1e (cada R_{11} é hidrogênio, ver Wiessler *et al*, Patam 5.622.936; Pedido PCT nº US05/03370 intitulado "Terapias Anticâncer", Pedido de Patente dos E.U.A. nº 60/638995 intitulado "Terapia de Combinação com Glufosfamida" e Protocolo do advogado nº 021305- 005900US depositado em 11 de maio de 2005 intitulado "Terapia de Combinação com Glufosfamida"). Telcyta™ que está sendo avaliado na clínica para tratamento de câncer libera 1f (Rosen *et al*, *Clin Cancer Res*. 2004, 10(11):3689-98).

Pró-drogas conhecidas de alquilador de fosforoamidato, como ifosfamida e ciclofosfamida metabolizam para produzir subprodutos citotóxicos, como acroleína e cloroacetaldeído, que causam efeitos colaterais indesejáveis para o paciente, como cistite hemorrágica, coma ou morte. Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato que, ao ser metabolizada, produz subprodutos menos tóxicos por tratamento em comparação com aqueles produzidos pelo metabolismo da ifosfamida e/ou ciclofosfamida. Em uma concretização, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção não produzem acroleína por meio de metabolismo *in vivo*. Exemplos de subprodutos tóxicos resultantes do metabolismo das pró-drogas da invenção incluem cloro, bromo, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi,

arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi-acetaldeído, (para a produção metabólica de cloroacetaldeído de ifosfamida ver a referência Hardman *et al*, supra, página 1396). Em outra concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato que, no metabolismo oxidativo, produz de 5 a 95% tanto cloroacetaldeído ou um equivalente como definido acima, por tratamento, como o produzido pelo metabolismo da ifosfamida.

O derivado de alquilador de fosforoamidato formado quando da redução de Z_3 pode ser diferente do alquilador de fosforoamidato que está sendo protegido e a pró-droga de alquilador de fosforoamidato e é denominado uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato modificada. Por exemplo, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode dar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato modificada Alq-disparador$_{mod}$ quando da redução do grupo biorredutor (Z_3). Quando a redução do grupo biorredutor forma uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato modificada, o ligante (L) ligado ao alquilador de fosforoamidato pode sofrer degradação dando o alquilador de fosforoamidato ou alguma outra pró-droga de alquilador de fosforoamidato modificada.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um composto que demonstra um efeito acessório quando da ativação no tecido hipóxico por meio de incorporação de um ligante (L) como descrito acima. Em uma concretização, o efeito acessório permite que um alquilador de fosforoamidato modificado da presente invenção difunde ou penetra em zonas de tumor que não são suficientemente hipóxicas para ativar os compostos de pró-droga da invenção mas encontra-se próximo da zona de tumor hipóxica que pode ativar estas pró-drogas.

Quando da redução do grupo biorredutor (Z_3) no disparador T é modificado a $Z_{3\text{-mod}}$, dando uma alquilador de fosforoamidato pró-droga modificada, como alquilador de fosforoamidato- T_M ou conjugado Alq- T_M.

Em uma concretização o T_M é selecionado dentre:

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)\text{-}Z_{3\text{-}mod}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$; e

$\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}Z_{3\text{-}mod}$ em que $Z_{3\text{-}mod}$ é Z_3 biorreduzido ou de outra forma reduzido ou modificado.

Em outra concretização, o T_M é selecionado dentre:

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}H$; $[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}H$; e $[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}H$;

Em uma concretização, disparador T inclui os seguintes ligantes (L) apresentando a fórmula:

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}$;

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}C(Z_1)_2\text{-}$;

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$; e

$\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z[(C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$; $\text{-}[C(Z_1)_2]_2\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$ e $\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}$

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um disparador T que, quando da biorredução, é modificado a disparador$_{Mod}$ ou T_M e o alquilador de fosforoamidato é separada de T_M em menos de 0,1 segundo. Em outra concretização, o alquilador de fosforoamidato é separado de T_M

entre de 0,01 a 0.10 segundo.Em outra concretização, o alquilador de fosforoamidato é separado de T_M entre de 0,1 a 1,0 segundo. Em outra concretização, o fosforoamidato ativo é separado de T_M entre de 1,0 a 10,0 segundos. Em outra concretização, o alquilador de fosforoamidato é separado de T_M entre de 10,0 a 100,0 segundos.

Em uma concretização relacionada, quando da ativação ou redução, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato dá uma pró-droga com um disparador T modificado (T_M) que, subseqüentemente, libera o alquilador de fosforoamidato de 20 a 500 μm do sítio de ativação ou redução; ou de 20 a 100 μm do sítio de ativação ou redução. O efeito acessório de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção pode ser medido usando-se esferóides celulares e ensaio celular de camadas múltiplas (por exemplo, de ensaios como em Kyle *et al*, *Cancer Res.* 2004, 64(17):6304-9 e West *et al*, *Cancer Quimiother. Pharmacol*, 1987, 20(2): 109-14); e como descrito em maior detalhe nos Exemplos 35 e 37. Células de tumor podem ser desenvolvidas em cultura como esferóides multicelulares para criar um modelo *in vitro* do microambiente do tumor em tumores sólidos contendo uma região hipóxica e uma população de células quiescentes respondendo aos estresses ambientais de nutrientes limitados e produção incrementada de rejeitos. Estes esferóides têm a propriedade única de desenvolver gradientes de oxigênio e nutrientes como o agregado de células continuam a dividir-se e crescer para fora. Após o rim viável atingir um tamanho de aproximadamente 150 μm, isto impele as células nesta região em um estado quiescente e, eventualmente, a morte celular. Desenvolve-se um núcleo necrótico como um resultado das células que morrem. O esferóide pode ser dividido em 4 compartimentos distintos para modelar a efetividade de uma pró-droga ativada por hipoxia: 1) a região aeróbica exterior e a região de divisão ativa; 2) uma região de hipoxia intermediária; 3) uma região de hipoxia em que células não ciclizam; 4) e um núcleo necrótico contendo

células mortas e fragmentos celulares. A resposta de uma droga dependerá de vários fatores; a capacidade do composto em penetrar nas regiões mais profundas do esferóide. A ativação de pró-droga ativada por hipoxia (HAP) via nitrorredutases; a reatividade da droga ativada na célula em que foi ativada; e a capacidade da droga ativada em deixar o sítio de onde foi ativada e de matar células vizinhas (efeito acessório). Portanto, a avaliação da efetividade de um composto pode ser avaliada em diversos níveis diferentes. O efeito do composto sozinho pode ser comparado com células em cultura de monocamada versus esferóides intactos. A HAP pode ser usada como uma monoterapia. A fração hipóxica do esferóide pode ser modulada variando-se a concentração de O_2 do gás de equilíbrio e, portanto, altera a relação dos compartimentos aeróbicos e hipóxicos. HAPs podem ser combinadas com outros agentes quimioterápicos que, ou objetivam apenas as células aeróbicas exteriores ou são capazes de objetivar todo o esferóide. A morte de células esperada pode ser predita conhecendo-se a fração hipóxica e a morte de células esperada de cada uma das monoterapias.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato que, quando da ativação, como biorredução, libera o alquilador de fosforoamidato com uma meia-vida inferior a 0,1 segundo; entre 0,01 e 0,10 segundo, entre 0,1 e 1,0 segundo, entre 1,0 e 10.0 segundos, e entre 10,0 e 100,0 segundos.

Drogas anticâncer podem ligar-se ao tecido que envolve a vasculatura e/ou apresentar altos pesos moleculares que impedem difusão e não atingem, em concentrações terapeuticamente eficazes, zonas de tumor hipóxicas que podem encontrar-se afastadas em até 150 - 200 μM da vasculatura. Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que podem alcançar células de câncer hipóxicas para além da vasculatura. Alguns métodos para determinar o efeito acessório encontram-se descritos com maior detalhe nos Exemplos 35 e 37. O

alquilador de fosforoamidato usado em uma pró-droga ativada por hipoxia desempenha um papel importante na eliminação eficiente de células de tumor. Por exemplo, no caso de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ativada por hipoxia, a citoxicidade do alquilador de fosforoamidato e sua taxa de alquilação celular, e a permeabilidade da membrana celular da pró-droga e o impacto do alquilador de fosforoamidato [sobre] a seletividade hipóxica e a citotoxicidade hipóxica do pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que são mais seguras do que os alquiladores de fosforoamidatos correspondentes formados *in vivo* (pelo menos dez e até um milhão de vezes mais seguros). Em uma concretização, a segurança incrementada resulta de uma modificação no sítio de ligação do disparador T (ativação da pró-droga de alquilador de fosforoamidato libera o agente alquilador/citotóxico). Em qualquer caso, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato são convertidas ao alquilador correspondente em tecidos hipóxicos em virtude da ativação ou redução do grupo biorredutor (Z_3), resultando em sua remoção e na concomitante ou subseqüente liberação ou geração do alquilador de fosforoamidato.

Em uma concretização, o disparador T é ligado covalentemente ao alquilador de fosforoamidato, de uma maneira que mascara ou reduz a atividade citotóxica do alquilador de fosforoamidato. Este efeito mascarador pode variar e pode depender da atividade citotóxica do alquilador de fosforoamidato. Tipicamente, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato mostrará pelo menos cerca de 10 vezes menos atividade citotóxica do que o alquilador de fosforoamidato correspondente, e pode apresentar uma atividade citotóxica de até cerca de um milhão de vezes, ou menos. Em uma versão, a atividade citotóxica da pró-droga de alquilador de fosforoamidato é de cerca de 100 vezes a cerca de 10.000 vezes menos do que a atividade citotóxica do alquilador de fosforoamidato correspondente. Como

um exemplo, para um alquilador de fosforoamidato com uma IC_{50}, IC_{90}, ou LC_{50} de 1 nM, a IC_{50}, IC_{90}, ou LC_{50} da pró-droga de alquilador de fosforoamidato correspondente pode ser de 1 μM ou maior.

Em uma versão, compostos aqui proporcionados incluem como pró-droga de alquilador de fosforoamidato, qualquer alquilador de fosforoamidato que pode ser ligado a um disparador T de uma maneira que proporcione uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato que é pelo menos cerca de 10 vezes a cerca de 1.000.000 vezes, e, tipicamente, de cerca de 100 a cerca de 10.000 vezes, menos ativa que um agente citotóxico do que o alquilador de fosforoamidato correspondente ou alquilador de fosforoamidato modificado que é liberado dos compostos em condições hipóxicas.

Para determinar se uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é seletivamente ativa em condições anóxicas ou hipóxicas, células são expostas à droga, seja com ar (normóxicas) ou sem oxigênio (anoxia) ou com mui pouco oxigênio (hipoxia). Alguém com prática na técnica perceberá que a citotoxicidade de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato conforme medido em um ensaio anti-proliferação é expressa pela IC_{50}; e a citotoxicidade de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato conforme medida em um experimento de sobrevivência clonogênica é expressa como IC_{10} ou LC_{10}, IC_{90} ou LC_{90}, ou IC_{99} ou LC_{99}. A relação de citotoxicidade conforme medida, por exemplo,, por IC_{50}, IC_{90}, LC_{50}, LC_{90}, ou LC_{99} determinada em normoxia e hipoxia é denominada relação de hipoxia citotoxicidade (HCR) e pode ser uma medida da citotoxicidade seletiva para hipoxia das pró-drogas da presente invenção. Quanto maior a HCR da pró-droga de alquilador de fosforoamidato tanto maior é sua toxicidade seletiva para células hipóxicas, e maior a capacidade de eliminação de tumor hipóxico da pró-droga relativamente a células normóxicas saudáveis. A HCR determinada com base em IC_{99} ou LC_{99} é maior do que aquela determinada com base em IC_{90} ou LC_{90}.

Em uma concretização relacionada, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica de 0,1 nM a 50 μM e uma HCR de 10 a 100.000. Em uma concretização relacionada, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica de 0,1 nM a 50 μM e uma HCR de 25 a 100.000 (ver Seção de Exemplos). Em outra concretização relacionada, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção apresenta uma citotoxicidade hipóxica de 0,1 nM a 5 μM e uma HCR de 50 a 10.000, como, por exemplo, os compostos como descrito em Exemplos 29, 30 e 31.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando toxicidade hipóxica que é de 5 a 1.000.000 vezes maior do que a toxicidade normóxica correspondente. Em outra concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando toxicidade hipóxica que é de 10 a 10.000 vezes maior do que a toxicidade normóxica correspondente. Em outra concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando toxicidade hipóxica que é de 25 a 5.000 vezes maior do que a toxicidade normóxica correspondente.

Tumores apresentam um gradiente de concentração de oxigênio que pode variar de 10%, em tecidos adjacentes à vasculatura, a 0,5% em tecidos afastados em cerca de 150 μM, e menor em tecidos mais distantes da vasculatura e próximos do núcleo necrótico. Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que podem gerar alquiladores de fosforoamidatos, de 5 a 1.000.00; de 10 a 10.00; e de 25 a 5.000 vezes mais tóxicas do que a pró-droga correspondente, numa variedade de concentrações de oxigênio. Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato

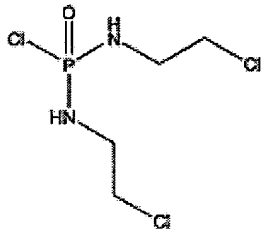
[que] geram alquiladores de fosforoamidatos, de 5 a 1.000.00; de 10 a 10.00; e de 25 a 5.000 vezes mais tóxicos do que a pró-droga correspondente, a concentrações abaixo de 0,5-0,6% de oxigênio.

O logP de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção pode medir a lipofilicidade ou a hidrofilicidade da pró-droga. Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando um logP inferior a 0. Referidas pró-drogas de alquilador de fosforoamidato podem ser hidrofílicas, como uma pró-droga apresentando fórmula XV em que cada R_{11} é H e pode ser facilmente formulada como uma formulação aquosa para injeção i.v. ou i.p. Outro exemplo de referidas pró-drogas são os compostos 24, 25 e 36.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando um logP maior que 0. Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando um logP entre 0 e 4, como aqueles exemplificados pelas fórmulas XIV; XX e XV em que cada R_{11} é metila ou, ciclopropila, e administrada a um paciente, pode atravessar a membrana da célula penetrando no interior de células de câncer. Outro exemplo de uma pró-droga apresentando um logP entre 0 e é 5, 6, 7, ou 16. (para logP medido de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção ver Seção de Exemplos).

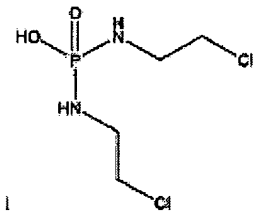
IIb. Método de síntese

A presente invenção ocorreu em parte a partir da descoberta de que o composto 36 que não pôde ser isolado reagindo-se



1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol, e n-butil lítio em um

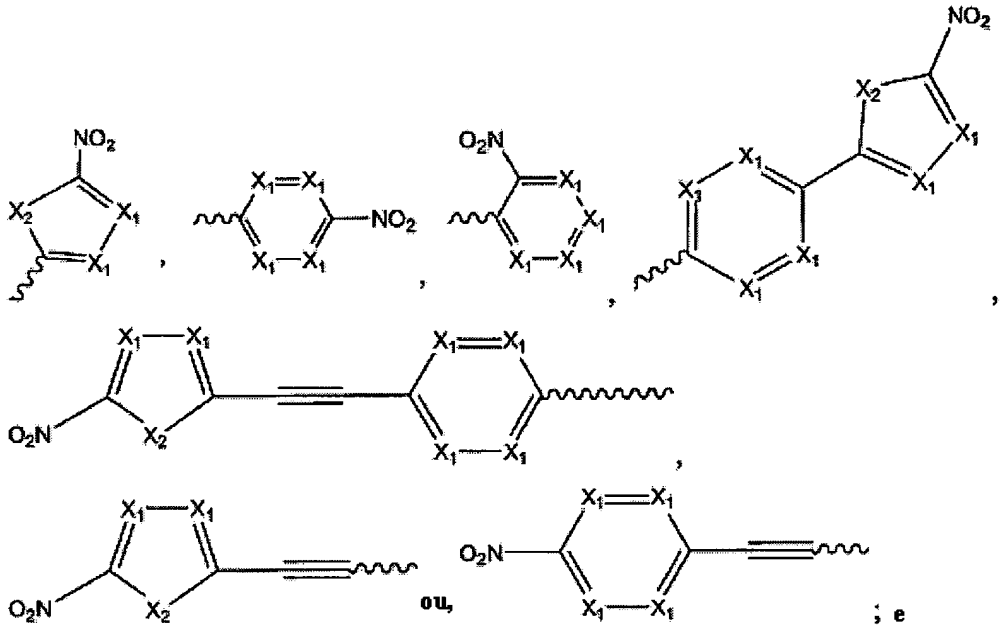
solvente vantajoso, foi facilmente sintetizado empregando-se uma reação de tipo Mitsunobu em que 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol foi ativado por meio da adição de trifenilfosfina e azodicarboxilato de diisopropila, e reagido com



dando composto 36.

Assim, em um aspecto a presente invenção proporciona um método de sintetizar um composto de fosforoamidato compreendendo reagir um ácido fosforamídico ou um ácido fosforodiamídico e um álcool dando um fosforoamidato. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de sintetizar os compostos inéditos de pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção ou aqueles que são conhecidos. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de sintetizar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato compreendendo reagir um alquilador de fosforoamidato inédito ou conhecido, um disparador-OH, uma fosfina trissubstituída, e um azodicarboxilato de dialquila dando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato inédita ou conhecida. Em uma concretização do método, em uma primeira etapa o disparador-OH é reagido com o fosfina trissubstituído e o azodicarboxilato de dialquila dando um intermediário, e em uma segunda etapa, o alquilador de fosforoamidato é adicionado ao intermediário obtido da primeira etapa dando o produto. Uma referida reação do tipo Mitsunobu é particularmente vantajosa para a síntese de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato inéditas ou conhecidas ou derivados, Alq-disparador, em que disparador é

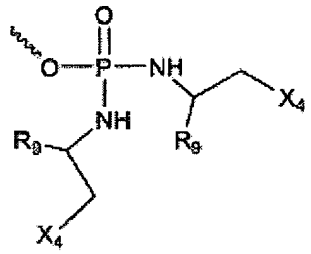
L-Z_3, em que Z_3 é:



ou,

; e

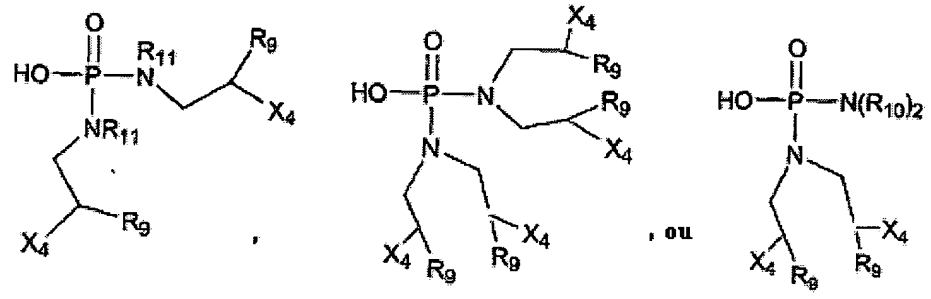
Alq é



(XV)

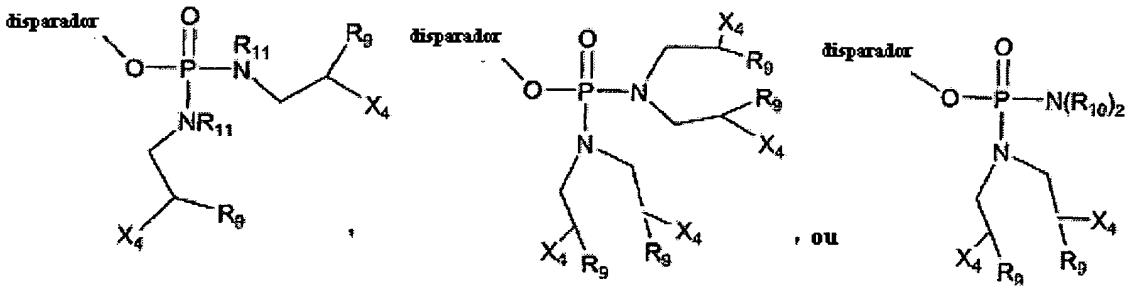
em que R_9 é como definido acima.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de sintetizar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato compreendendo reagir cada um dentre alquiladores de fosforoamidatos inéditos ou conhecidos:



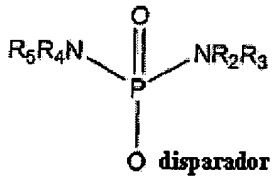
, ou

com um disparador-OH, uma fosfina trissubstituída, e um azodicarboxilato de dialquila dando, respectivamente,

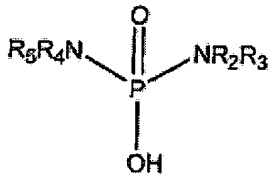


em que X_4, R_5, R_7, e R_8 são como definido como na fórmula (I).

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar um composto de Fórmula:



compreendendo reagir (a) um alquilador de fosforoamidato inédito ou conhecido de Fórmula:



em que R_2-R_5 são definidos na fórmula (I) com a condição de que

(i) pelo menos dois de R_1-R_5 sejam selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

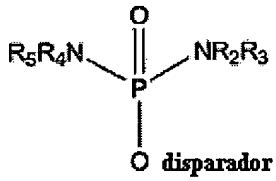
(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_4R_5 são ambos, em conjunto, ;

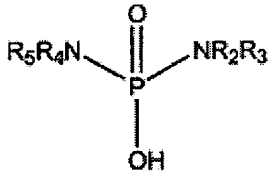
(b) um disparador-OH, em que disparador é definido como na fórmula (I), uma fosfina trissubstituída, e

(c) um azodicarboxilato de dialquila dando o composto de

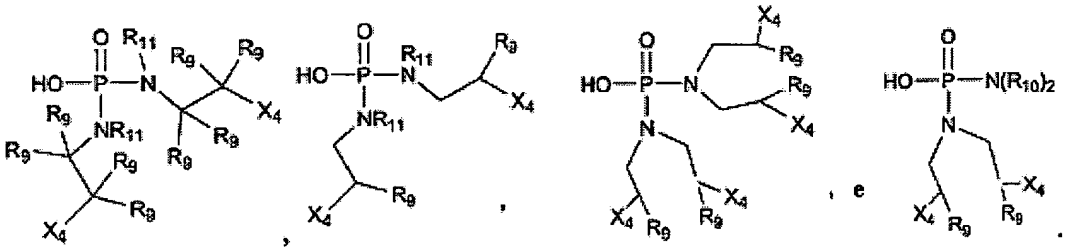
Fórmula:



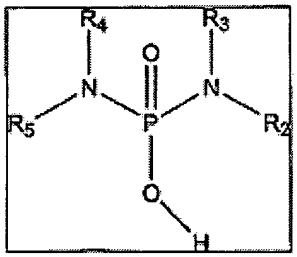
Em uma concretização, o composto de Fórmula:



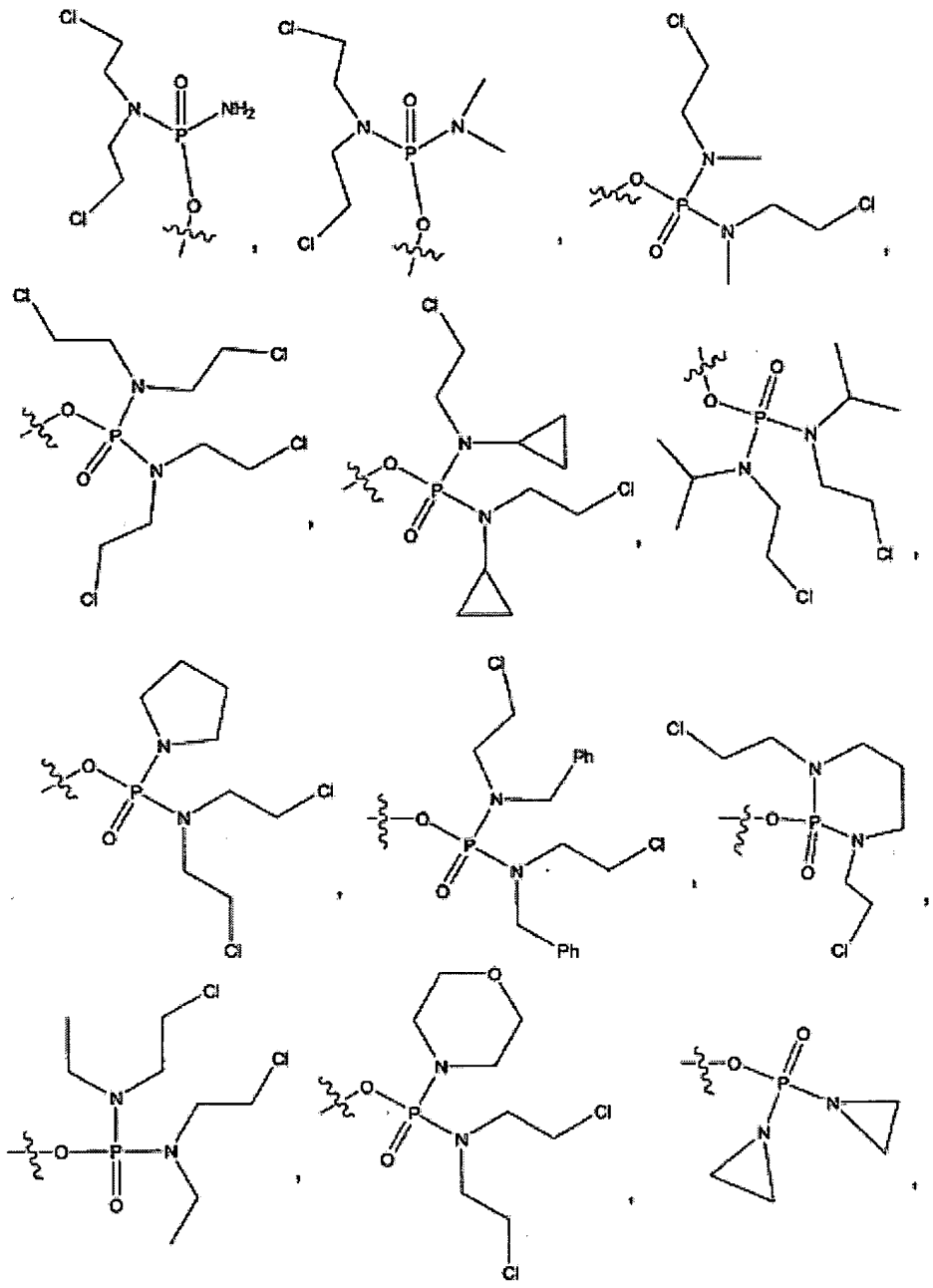
é selecionado do grupo que consiste de:

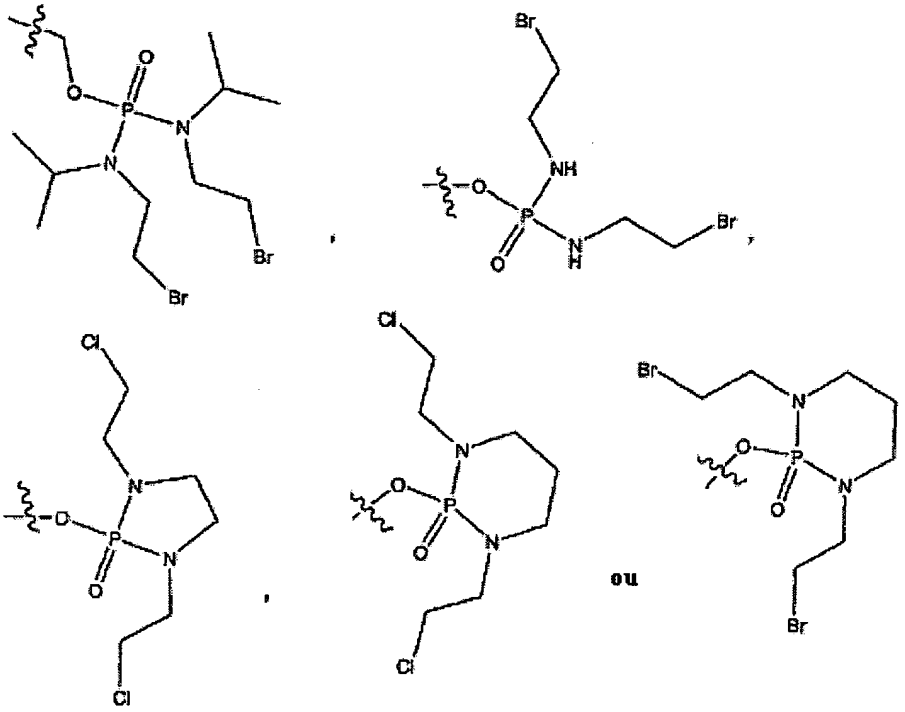


Em outra concretização, o grupo de Fórmula:

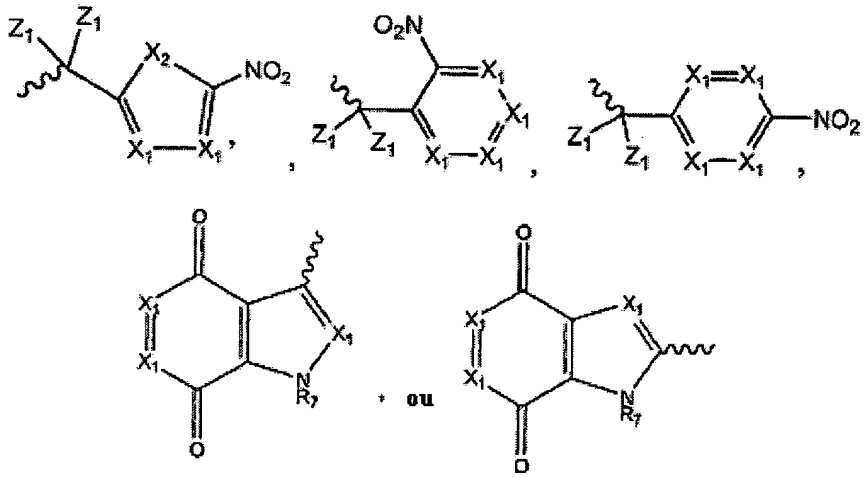


é selecionado do grupo que consiste de:





Em outra concretização, a reação inclui um solvente, como THF, dioxano, um acetato de C_1-C_6 alquila, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila e análogos. Em outra concretização, cada substituinte no fosfina trissubstituído é selecionado independentemente de um substituinte C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, e C_1-C_6 alcóxi. Em outra concretização, disparador T- é

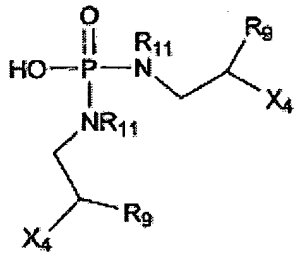


em que X_1, X_2, Z_1, e Z_2 são definidos na fórmula (I).

Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar a pró-droga de alquilador de fosforoamidato compreendendo

(i) reagir, em um solvente selecionado dentre THF, dioxano,

diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetato de propila, acetato de butila, ou acetonitrila, um composto de Fórmula:

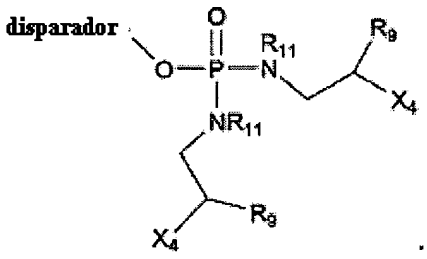


em que cada R_{11} é independentemente hidrogênio, ciclopropila, metila, etila, benzila, ou metóxi; em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, ou ciclopropila; e X_4 é halo, metilsulfonilóxi, fenilsulfonilóxi, 4-metilfenilsulfonilóxi, e 4-halofenilsulfonilóxi;

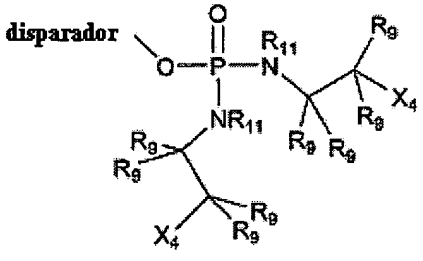
(ii) uma fosfina trissubstituída selecionado dentre trifenilfosfina, tributilfosfina, tributilfosfito; e

(iii) azodicarboxilato de dietila ou diisopropila;

dando um produto de Fórmula:



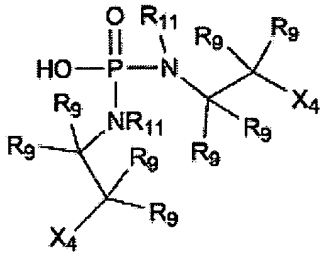
Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método de sintetizar um composto de Fórmula:



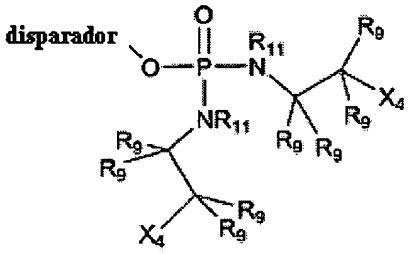
compreendendo as etapas de:

(i) reagir em um solvente aprótico, um disparador-OH, em que disparador é definido como na fórmula (I); uma fosfina trissubstituída; e um azodicarboxilato de dialquila dando um Intermediário (i);

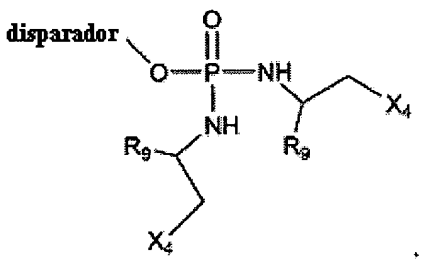
(ii) reagir o Intermediário (i) obtido da etapa (i) com um composto de fórmula



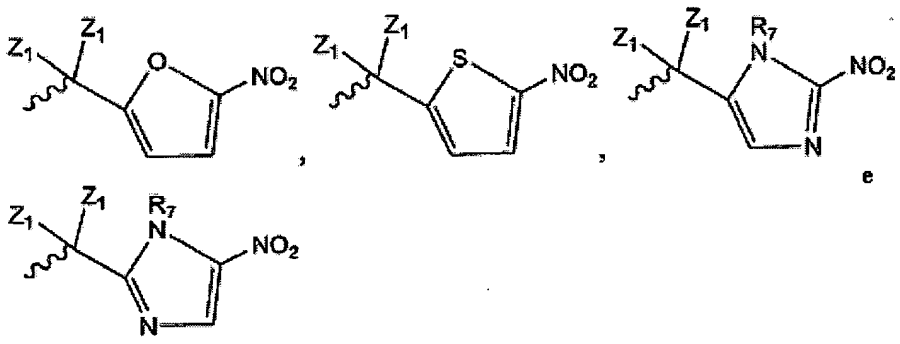
em que cada R_9, R_{11}, e X_4 é definido como na fórmula (I), dando o composto de Fórmula:



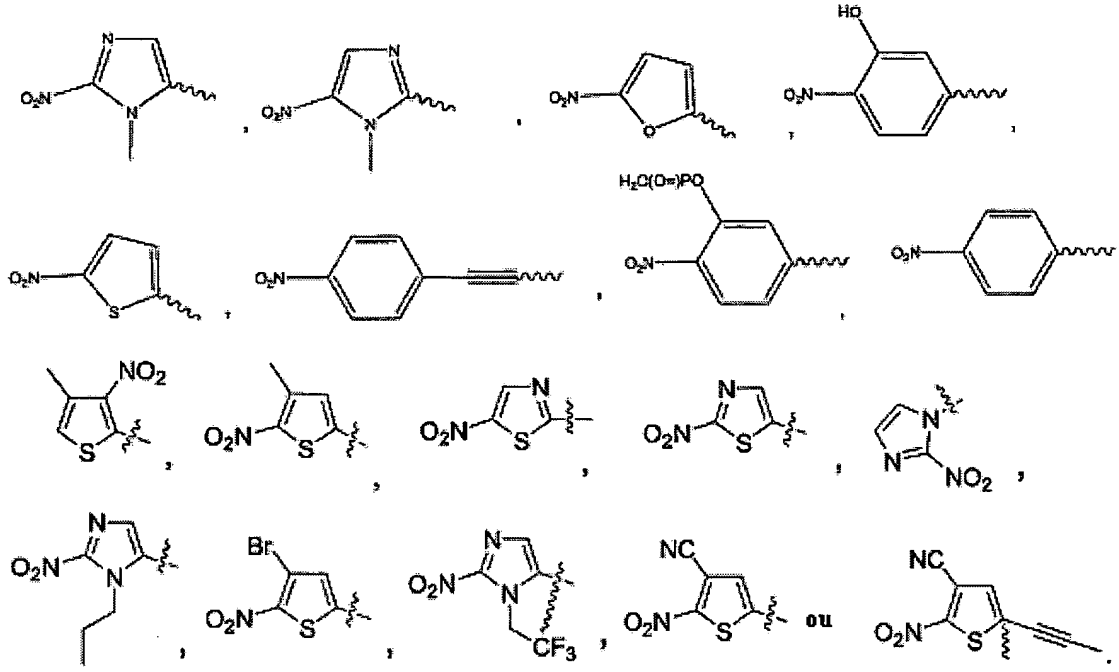
Em outra concretização, o fosfina trissubstituído é $P(R_{12})_3$ em que cada R_{12} é H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, arila, ou heteroarila. Em outra concretização, o fosfina trissubstituído é uma fosfina trissubstituída suportado sobre polímero. Em outra concretização, o fosfina trissubstituído é trifenilfosfina, tributilfosfina, tripropilfosfina, trietilfosfina, ou trimetilfosfina. Em outra concretização, o fosfina trissubstituído é um trifenil fosfina suportado sobre polímero. Fosfinas trissubstituídos suportados sobre polímeros são comercialmente obteníveis, por exemplo, da Varian Inc. de Palo Alto, California. Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método de sintetizar os compostos, em que cada R_{11} é hidrogênio. Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método de sintetizar os compostos



Em outra concretização, a presente invenção proporciona o método de preparar um composto, em que o disparador [é] selecionado do grupo que consiste de:



e Z_3 é



Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar a pró-droga de alquilador de fosforoamidato compreendendo as etapas de:

(a) refluxar $POCl_3$ com um sal de amônio de N-2-haloetil-N-(R_{13})amônio, em que R_{13} é hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, dando um intermediário de diclorofosforoamidato;

(b) reagir o intermediário de diclorofosforoamidato na etapa (a) com um sal de N-2- haloetil-N-(R_{13})amônio, em que R_{13} é hidrogênio, C_1-

C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, e uma base em um solvente dando um intermediário de monoclorofosforoamidato; e

(c) reagir o intermediário de monoclorofosforoamidato obtido na etapa (b) com disparador-OH e uma base em um solvente dando a pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Em uma concretização, o intermediário de diclorofosforoamidato da etapa (a) é separado do restante da mistura de reação antes de se submeter o mesmo à reação na etapa (b). Em outra concretização, a separação é realizada removendo-se primeiramente o excesso de $POCl_3$ em vácuo e, depois, destilando-se o diclorofosforoamidato sob pressão reduzida.

Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da etapa (c) é separada do restante da mistura de reação por meio de cromatografia de coluna de vaporização instantânea em sílica-gel. Em uma concretização, a base empregada na etapa (b) é uma amina terciária. Aminas terciárias vantajosas empregadas na etapa (b) incluem trialquil aminas, como, trietila amina ou diisopropiletilamina. Em uma concretização, o solvente empregado na etapa (b) é tetraidrofurano (THF) ou dioxano.

Em uma concretização, o intermediário de monoclorofosforoamidato da etapa (b) é separada do restante da mistura de reação por meio de cromatografia de coluna de vaporização instantânea em sílica-gel antes de ser submetida à reação na etapa (c). Em uma concretização, a base útil na etapa (c) é hexaalquildissilazida de lítio, sódio, ou potássio; hidreto de sódio ou potássio; ou diisopropilamida de lítio. Em uma concretização, o solvente empregado na etapa (c) é dimetoxietano, diglima, éter de dietila, ou THF.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato

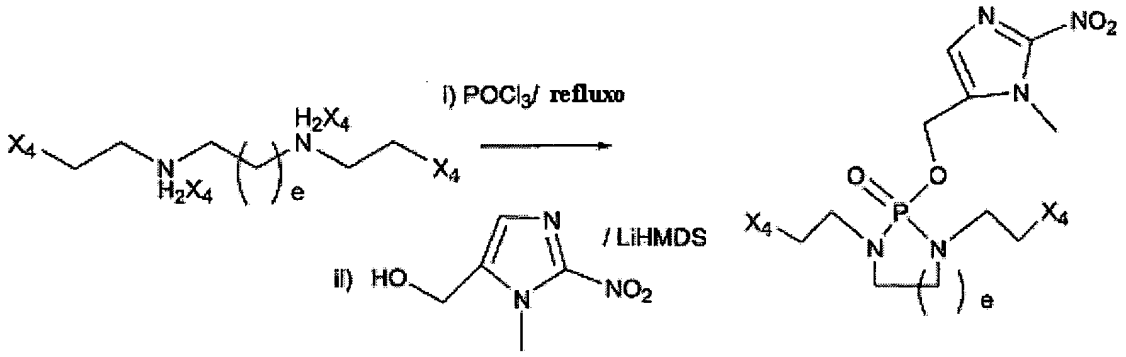
compreendendo as etapas de:

(a) reagir em um solvente cerca de 1 equivalente de cada um de $POCl_3$, um disparador-OH, e uma base dando um intermediário de diclorofosfato; e

(b) reagir o intermediário de diclorofosfato na etapa (a) com um sal de N-2-haloetil-N-(R_{13})amônio, em que R_{13} é hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, e uma base em um solvente dando a pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Em uma concretização, etapas (a) e (b) são realizadas a temperaturas abaixo de O°C. Em outra concretização, a etapa (b) é realizada a uma temperatura de 20 a 100°C maior do que a temperatura da etapa (a).

Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar pró-drogas de alquilador de fosforoamidato heterocíclicas da presente invenção como mostrado abaixo:



em que X_4 = Br ou Cl; e = de 1 a 3

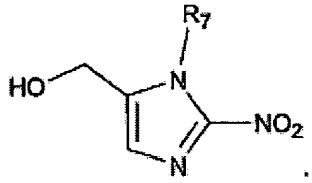
Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método para sintetizar a pró-droga de alquilador de fosforoamidato compreendendo as etapas de:

(a) reagir PCl_3 com um sal de N,N-di(2-haloetil)amônio e uma base em um solvente dando um derivado de monoclorofosfamida;

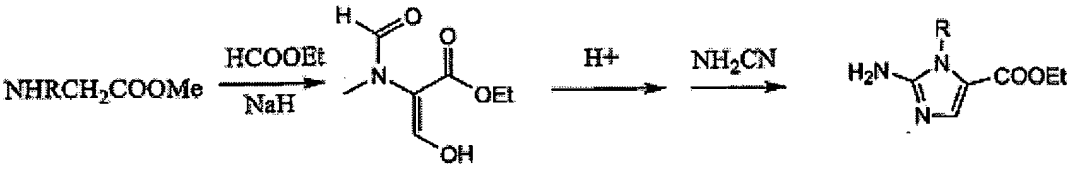
(b) reagir o derivado de monoclorofosfamida com disparador-OH dando um intermediário; e

(c) oxidar o intermediário na etapa (b) dando o pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Em uma concretização, a base usada na etapa (b) é trietilamina. Em outra concretização, o solvente usado na etapa (c) é dimetoxietano, diglima, ou um C_1-C_6 acetato de alquila. Em outra concretização, disparador-OH é etapa (c) é



Vários 1-N-alquil-2-aminoimidazol-5-carboxilato[s] podem ser sintetizados como descrito esquematicamente abaixo:



Os 1-N-alquil-2-aminoimidazol-5-carboxilatos podem ser reduzidos dando vários derivados de 1-N-alquil-2-amino-5-hidroximatilimidazol empregados na presente invenção como grupo biorredutor Z_3.

Os métodos sintéticos são proporcionados de maneira mais detalhada na seção de Exemplos abaixo.

Síntese de grupos biorredutors e pró-drogas de alquilador de fosforoamidato, e métodos da presente invenção pode ser adaptada a partir das referências Matteucci *et al.*, Publ. de Pedido PCT nº WO 04/009667, e pró-drogas ativadas por hipoxia [] Pedido de Pat. dos E.U.A. intitulado. "Hypoxia Activated anti-Cancer Agents"; deGroot *et al*, 2001, *Current Med. Chem.* S: 1093-1122; Denny *et al*, Patams 5.750.782; 5.780.585; 5.872.129; e 6.251.933; Davis *et al*, Pedidos Public. PCT nums. WO 04/85421 e WO 04/85361; e Lin *et al*, Pedidos Public. dos E.U.A. nums. 2004/254103 e 2005/043244, e Borch *et al*, (acima).

Exemplos de métodos para sintetizar pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção são proporcionados de maneira mais detalhada na seção de "Exemplos" abaixo.

IIIa. Métodos de Tratamento

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer em um paciente que necessita de terapia por meio de administração, ao paciente, de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção ou de uma que é conhecida. Alquiladores de fosforoamidatos conhecidos são proporcionados pelas referências Borch *et al*, acima. Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato empregada para tratar câncer de acordo com os métodos proporcionados pela presente invenção apresenta a fórmula selecionada de (I) a (XXVII). Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato empregada para tratar câncer de acordo com os métodos proporcionados pela presente invenção é selecionada dentre os compostos exemplificados na Seção de Exemplos.

Terapia de câncer com agentes alquiladores pode levar ao desenvolvimento de cânceres que são resistentes a estes agentes alquiladores. Agentes alquiladores podem matar células de câncer na região do câncer que se divide mais rapidamente ou que contém maior quantidade de oxigênio em comparação com as células de câncer na região hipóxica do câncer que cresce mais lentamente. As células referidas por último sobrevivem a tratamento por alquiladores e podem produzir células resistentes a referidos alquiladores. Atividade incrementada de guanina-O^6-Alquiltransferase, glutationa, glutationa transferases, a via de reparo de excisão de nucleotídeo, e/ou as proteínas de reparo de malpareamento, e permeação reduzida de drogas ativamente transportadas, como mecloretamina e melfalano, são postuladas como sendo responsáveis pela resistência do câncer a alquiladores (por exemplo, ver, Hardman *et al*,

páginas 1393 e 1433, acima).

As pró-drogas da presente invenção são eficazes para tratar cânceres resistentes a outras terapias. Células de câncer que se dividem lentamente na zona de câncer hipóxica atuam como uma fonte de células de câncer e cepas resistentes e são mortas pelas pró-drogas da presente invenção. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar um câncer resistente a tratamento por meio de um ou mais alquiladores por meio de administração dos compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outro agente anticâncer. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção é administrada em combinação com uma droga que apresenta substancialmente nenhuma nefrotoxicidade. Em uma concretização as pró-drogas de alquiladores de fosforoamidatos são administradas com carboplatina.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquiladores de fosforoamidatos que não são resistentes cruzadamente com alquiladores conhecidos. Em outra concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquiladores de fosforoamidatos que não são resistentes cruzadamente com os alquiladores ciclofosfamida, ifosfamida, glufosfamida, mecloretamina, melfalano, clorambucila, dacarbazina, temozolomida, carmustina, estreptozocina, bendamustina, bussulfano, tiotepa, cisplatina, carboplatina, e oxaliplatina.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração, como uma terapia de primeira linha, os compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer. Em outra concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar um câncer metastático por meio de administração, como uma terapia de primeira linha, os compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar

câncer por meio de administração, como uma terapia de segunda linha, os compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração, como uma terapia de terceira linha, os compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração após um tratamento prévio com cirurgia e/ou terapia de radiação dos compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer. Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer, em que o câncer apresenta-se relapsado após quimioterapia prévia, cirurgia, radiação ou qualquer combinação dos mesmos, por meio de administração dos compostos da presente invenção sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer.

Em métodos para tratar câncer proporcionados pela presente invenção, administra-se uma quantidade eficaz de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato ao sujeito. De uma maneira geral, o sujeito pode ser qualquer humano ou mamífero não-humano. O sujeito preferido é um sujeito humano. Outro sujeitos particulares incluem, embora sem limitação, a primatas não-humanos, cães, gatos, animais agrícolas e cavalos. Em uma versão, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada sozinha. Em uma versão a pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada em combinação com um ou mais agentes anticâncer adicionais. Em uma versão a pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada em conjunto com um tratamento terapêutico de câncer, incluindo embora sem limitação, cirurgia e radiação. A pró-droga de alquilador de fosforoamidato será administrada tipicamente em uma composição farmacêutica. Diversas composições farmacêuticas que podem ser usadas encontram-se descritas na Seção de Formulações abaixo.

A pró-droga de alquilador de fosforoamidato e suas composições farmacêuticas podem ser usadas para tratar qualquer tipo de câncer em um sujeito, particularmente em um sujeito humano. Cânceres que podem ser tratados incluem, embora sem limitação, leucemia, câncer de mama, câncer de pele, câncer ósseo, câncer do fígado, câncer do cérebro, câncer da laringe, vesícula biliar, pâncreas, reto, paratireóide, tireóide, adrenal, tecido neural, cabeça e pescoço, estômago, brônquios, rins, carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerativo e papilar, carcinoma metastático da pele, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células de *veticulum*, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de células pequenas do pulmão, pedras biliares, tumor de células ilhotas, tumor primário do cérebro, tumores granulocítico e linfocítico agudo e crônico, tumor de células peludas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas da mucosa, ganglioneuromas intestinais, tumor hiperplásico do nervo córneo, tumor do habitus marfanóide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de leiomiomater, displasia cervical, e carcinoma *in situ*, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tecido mole, carcinóide maligno, lesão tópica da pele, micose fungóide, rabdomiossarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogênico e outro sarcoma, hipercalcemia maligna, tumor de células renais, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforma, leucemias, linfomas, melanoma malignos, e carcinomas epidermóides.

A pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser usada particularmente no tratamento de cânceres contendo áreas significativas de tecido hipóxico. Referidos cânceres incluem, embora sem limitação, câncer pulmonar, particularmente câncer pulmonar de células não-pequenas, câncer de mama, câncer do colo, câncer da cabeça e pescoço, câncer ovariano, câncer pancreático, e câncer da próstata. Exemplos de tipos de cânceres que podem ser tratados com as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção

são proporcionados nas referências a seguir, em que cada uma delas é incorporada integralmente aqui por referência Tidmarsh *et al*, Pedido de Pat. PCT nº PCT/US2005/047314 depositado em 22 dezembro de 2005, e Pedido de Pat. PCT intitulado "Terapia de Combinação com Glufosfamida", Protocolo do advogado nº 021305-005900PC; e Pedido de Pat. dos E.U.A. nº 60/760.599 e 60/719.787 e Pedido de Pat. Publ. PCT nº WO 2005/076888. Vários destes cânceres são discutidos para fins ilustrativos abaixo. Aqueles com prática na técnica considerarão que quimioterapia de câncer freqüentemente envolve a administração simultânea ou sucessiva de uma variedade de agentes anticâncer, e como discutido adicionalmente abaixo, é possível usar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato em terapias de combinação como proporcionado pelos métodos descritos aqui. Assim, na descrição de cânceres ilustrativos contendo regiões hipóxicas passíveis de tratamento com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, em que exemplos de terapias de combinação também são descritos.

Câncer do pulmão afeta mais de 100.000 elementos do sexo masculino e 50.000 elementos do sexo feminino nos Estados Unidos, em que a maior parte destes morre dentro de 1 ano do diagnóstico, tornando-o a causa principal de morte por câncer. Protocolos correntes para o tratamento de câncer do pulmão envolvem a integração de quimioterapia com ou sem radioterapia ou cirurgia. Uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser usada como um agente simples ou em combinação com terapias de combinação existentes. Uma variedade de regimes de combinações de quimioterapia foi reportada para câncer pulmonar de células pequenas, incluindo as combinações consistindo de ciclofosfamida, doxorrubicina e vincristina (CAV); etoposida e cisplatina (VP-16); e ciclofosfamida, doxorrubicina e VP-16 (CAVP- 16). Reportou-se modestos benefícios de sobrevida devidos a tratamento de combinação com quimioterapia (etoposida mais cisplatina) para câncer pulmonar de células não-pequenas.

Da mesma forma, diversas drogas citotóxicas diferentes produziram pelo menos regressão parcial de câncer ovariano. As drogas mais ativas no tratamento de câncer ovariano têm sido agentes alquiladores, incluindo ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano, clorambucila, tiotepa, cisplatina, e carboplatina. Terapias de combinação correntes para câncer ovariano incluem cisplatina ou carboplatina em combinação com ciclofosfamida em intervalos de 3 a 4 semanas durante de seis a oito ciclos. Os compostos e métodos descritos aqui proporcionam formas de pró-drogas e métodos para tratar câncer ovariano em que uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato como descrito aqui é usada como um agente simples ou na referida terapia de combinação existente, seja para substituir um agente ou adicionalmente ao(s) agente(s) correntemente usados.

Câncer da próstata é a malignidade mais comum em homens nos Estados Unidos, e é a segunda causa de câncer mais comum em homens acima da idade de 55, e reportou-se que este câncer consiste primariamente de tecido hipóxico. Vários protocolos de quimioterapia foram reportados para uso na doença em estágio terminal após recidiva depois de tratamento hormonal. Agentes para o tratamento de câncer da próstata incluem os alquiladores fosfato de estramusina, prednimustina, e cisplatina. Quimioterapia de combinação também é usada para tratar câncer da próstata, incluindo tratamento com fosfato de estramusina mais prednimustina e cisplatina, e 5-fluorouracila, melfalano, e hidroxiuréia. A presente invenção proporciona métodos para tratar câncer da próstata em que uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção é usada em referidas combinações, seja para substituir um agente ou adicionalmente ao(s) agente(s) correntemente usados.

Câncer do intestino grosso é a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos e, da mesma forma, é um câncer caracterizado por regiões hipóxicas. Embora a quimioterapia em pacientes com câncer

colorretal avançado tenha provado proporcionar benefício apenas marginal, 5-fluorouracila é o tratamento mais efetivo para esta doença. 5-Fluorouracila é útil sozinha ou em combinação com outras drogas, mas está associada com uma probabilidade meramente de 15 a 20% de uma redução mensurável das massas tumorais em 50 porcento ou mais. Usando-se 5-FU em combinação com os compostos e métodos descritos aqui, e os métodos para tratar câncer do colo usando-se uma pró-droga podem oferecer significativo benefício terapêutico e potencial para atender a necessidade não atendida de melhores métodos de tratamento para esta doença.

Em uma versão dos métodos de tratamento, é possível usar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato em diversas abordagens conhecidas de terapia do câncer incluindo, embora sem limitação, "terapia com pró-droga de enzima dirigida para anticorpo" (ADEPT), "terapia com pró-droga de enzima dirigida para vírus (VDEPT), " terapia com pró-droga de enzima dirigida para gene" (GDEPT), e " terapia com pró-droga de enzima dirigida para bactérias" (BDEPT). Os usos gerais de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato não se limitam aos métodos de tratamento precedentes.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de tratamento de doenças hiperproliferativas não-câncer caracterizadas por hiperproliferação celular (p. ex., uma quantidade ou taxa anormalmente incrementada de proliferação celular). Em uma concretização, a doença hiperproliferativa tratada de acordo com o presente método é selecionado do grupo que consiste de angiite alérgia e granulomatose (doença de Churg-Strauss), asbestose, astma, gastrite atrófica, hiperplasia prostático benigno, penfigóice buloso, doença abdominal, bronquite crônica e doença obstrutiva crônica das vias aéreas, sinusite crônica, doença de Crohn, neuropatias desmielinadoras, dermatomiosite, eczema incluindo dermatite atópica, doenças do tubo de Eustáquio, arterite de células gigantes, rejeição de

enxerto, pneumonite de hipersensibilidade, vasculite de hipersensibilidade (púrpura de Henoch-Schonlein), dermatite irritante, anemia hemolítica inflamatória, neutropenia inflamatória, doença do intestino inflamatório, doença de Kawasaki, esclerose múltipla, miocardite, miosite, pólipos nasais, doenças dos dutos nasolacrimais, vasculite neoplásica, pancreatite, pênfigo vulgar, glomerulonefrite primária, psoríase, doença periodontal, doença do rim policístico, poliarterite nodosa, síndrome de superposição de poliangite, colangite esclerosante primária, artrite reumatóide, doença do soro, adesões cirúrgicas, estenose ou restenose, esclerite, escleroderma, estreitamentos dos dutos biliares, estreitamentos (do duodeno, intestino delgado, e colo), silicose e outras formas de pneumoconiose, diabetes de tipo I, colite ulcerativa, proctite ulcerativa, vasculite associada com distúrbios do tecido conectivo, vasculite associada com deficiências congênitas do sistema de complemento, vasculite do sistema nervoso central, e granulomatose de Wegener.

Em algumas concretizações da invenção, um composto da presente invenção é administrado para tratar uma doença hiperproliferativa selecionada do grupo que consiste de psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatóide, restenose, e hiperplasia prostática benigna. Em uma concretização, a doença hiperproliferativa tratada é psoríase, uma doença caracterizado pela hiperproliferação celular de queratinócitos que se forma sobre a pele formando lesões escamadas elevadas. Em outra concretização, a doença hiperproliferativa tratada é esclerose múltipla, uma doença caracterizado por desmielinação progressiva no cérebro. Em outra concretização, a doença hiperproliferativa tratada é artrite reumatóide, uma doença inflamatória, recidivante, crônica de multisistemas que pode levar à destruição e anquilose de juntas afetadas. Em outra concretização, os compostos da presente invenção são administrados para prevenir uma doença hiperproliferativa resultante de proliferação celular em uma prótese implantada em um sujeito por meio de revestimento de prótese com uma

composição contendo um composto da presente invenção. Em outra concretização, a doença hiperproliferativa tratada é hiperplasia prostática benigna, uma doença em que células epiteliais da próstata crescem anormalmente e, com isso, bloqueiam o fluxo de urina.

IIIb. Formulações, modos de administração, dosagens

Uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato será formulada tipicamente como formulações farmacêuticas para administração a um sujeito. Descreve-se nesta seção modos de administração, formulações, e dosagens que podem ser usadas quando se trata cânceres usando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato descrita aqui.

Administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato para o tratamento de câncer pode ser efetuada por meio de qualquer método que permite o fornecimento das pró-drogas no sítio de ação, a região hipóxica de um tumor. Muitas drogas para câncer são administradas por meio de injeção intravenosa, e uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser formulada para referida administração, incluindo não só formulações prontas para injeção, mas também formulações liofilizadas ou concentradas que precisam ser reidratadas ou diluídas, respectivamente, antes da injeção. Adicionalmente a estas formulações, é possível formular uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato para administração por vias orais, intraduodenais, injeção parenteral (incluindo intravenosa, subcutânea, intramuscular, intravascular ou infusão), tópica, e via retal. Aqueles com prática na técnica perceberão que uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser ativada por bactérias no intestino. Se referida ativação não for desejada, então o praticante pode empregar uma via de administração ou uma formulação que resulta em absorção de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato antes de sua entrada no intestino grosso ou colo. A via de administração eficaz e a correspondente formulação da pró-droga de alquilador de fosforoamidato dependerá do tipo de câncer que está

sendo tratado, da pró-droga de alquilador de fosforoamidato selecionada para administração, da gravidade do câncer, e da idade, peso, e condição do paciente, entre outros fatores.

A quantidade de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato administrada, e, portanto, a quantidade da pró-droga de alquilador de fosforoamidato contida na dose administrada e o produto que compreende aquela dose, dependerá do sujeito a ser tratado, da gravidade do câncer, da localização do câncer, da taxa de administração, da disposição da pró-droga (p. ex., peso molecular, solubilidade e citotoxicidade normóxica e hipóxica), do agente citotóxico liberado por uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, e do critério do médico prescrevente.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratamento de câncer em um paciente em que uma dosagem eficaz encontra-se tipicamente na faixa de cerca de 0,001 a cerca de 0,1 g por kg de peso corporal, ou de cerca de 0,1 a cerca de 35 mg/kg/dia em doses simples ou divididas. Para um humano de 70 kg, isto poderia compreender de cerca de 0,05 a cerca de 7 g/dia, de cerca de 0,2 a cerca de 2,5 g/dia. Em alguns casos, níveis de dosagem abaixo do limite inferior da faixa previamente indicada podem ser mais do que adequados, enquanto que, em outros casos, é possível empregar doses ainda maiores sem causar qualquer efeito colateral nocivo; também é possível dividir doses maiores em várias doses pequenas para administração ao longo do dia por meio de infusão durante uma hora, ou continuamente usando-se um cateter central inserido perifericamente (linha de PICC) e bomba e bolsa intravenosa portátil.

Em uma concretização, a dose eficaz de um composto da presente invenção para tratamento de câncer e outras doenças hiperproliferativas situa-se na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 35 mg/kg/dia; de cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg/dia; de cerca de 0,5 a cerca de 15 mg/kg/dia; de cerca de 0,5 a cerca de 10 mg/kg/dia; de cerca de 0,5 a cerca de

8 mg/kg/dia; e de cerca de 1 a cerca de 5 mg/kg/dia em doses simples ou divididas. Em uma concretização, a dose eficaz de um composto da presente invenção para tratamento de câncer e outras doenças hiperproliferativas situa-se na faixa de cerca de 2 a cerca de 8 mg/kg/dia; de cerca de 2 a cerca de 4 mg/kg/dia; e de cerca de 2 mg/kg/dia em doses simples ou divididas. Em uma concretização, a dose eficaz de um composto da presente invenção para tratamento de câncer e outras doenças hiperproliferativas situa-se na faixa de cerca de 0,25 a cerca de 2,5 mg/kg/dia; de cerca de 0,25 a cerca de 1 mg/kg/dia; e de cerca de 0,25 a cerca de 0,5 mg/kg/dia em doses simples ou divididas. Em uma concretização, a dose é administrada IV, diariamente, seja como uma monoterapia (composto da presente invenção sozinho) ou em conjunto (combinação) com terapias de tratamento convencionais. Em uma concretização, a dose eficaz para tratamento de câncer e outras doenças hiperproliferativas situa-se na faixa descrita previamente administrada uma vez por semana.

Em uma concretização, uma dose maior é administrada intermitentemente (menos freqüentemente); uma dose na faixa de cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg; de cerca de 6 a cerca de 10 mg/kg; ou de 8 mg/kg é administrada uma vez a cada três dias durante duas semanas. Em outra concretização, uma dose na faixa de cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg; de cerca de 10 a cerca de 15 mg/kg; ou de 12,5 mg/kg da pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada uma vez por semana durante quatro semanas. Em uma concretização, uma dose na faixa de cerca de 0,5 a cerca de 8 mg/kg/dia é administrada durante 5 dias ao longo de ciclos de duas semanas.

Em outra concretização, para o tratamento de pacientes humanos, a dose diária máxima de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato não é maior do que 500 mg/kg de peso do paciente e, correspondentemente, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada numa dose diária na faixa de cerca de 1 mg de um alquilador de

fosforoamidato pró-droga/kg de peso do paciente a cerca de 500 mg de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato/kg de peso do paciente. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada numa dose diária na faixa de cerca de 5 mg/kg a cerca de 500 mg/kg do peso corporal do paciente a ser tratado. Em outra concretização, a dose terapeuticamente eficaz é uma dose diária de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é de cerca de 10 mg/kg a cerca de 250 mg/kg do peso corporal do paciente a ser tratado. Em outra concretização, a dose terapeuticamente eficaz de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é de cerca de 25 mg/kg a cerca de 150 mg/kg do peso corporal do paciente a ser tratado. Em outra concretização, a dose terapeuticamente eficaz de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é de cerca de 25 mg/kg a cerca de 50 mg/kg de peso corporal do paciente a ser tratado. Em outra concretização, a dose terapeuticamente eficaz de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é de cerca de 1,25 mg/kg a cerca de 12,5 mg/kg de peso corporal do paciente a ser tratado.

Orientação referente à administração também pode ser proporcionada por e de estudos em humanos e outros animais mamíferos. Uma dose terapeuticamente eficaz determinada para um animal pode ser convertida à dose equivalente humana correspondente (HED) como descrito na tabela abaixo:

Animal	**Fato de conversão da Dose Equivalente Humana (HED)** [a]
camundongo	12,3
hâmster	7,4
rato	6,2
furão	5,3
porquinho-da-índia	4,6
micro-porco	1,4
mini-porco	1,1
coelho	3,1
cão	1,8
macacos[b]	3,1
marmota	6,2
saimiri	5,3
babuíno	1,8

[a] Para converter dose animal em mg/kg a HED (presume-se um humano de 60 kg) em mg/kg, dividir a dose animal pelo fator de conversão de HED. Para espécies não listadas ou para pesos fora das faixas convencionais, a dose equivalente humana (HED) pode ser

calculada a partir da fórmula: HED = dose animal em mg/kg x (peso do animal em kg/peso humano em kg)$^{0.33}$.

[b] Por exemplo, *cynomolgus*, *rhesus*, ou cauda de toco.

Para se obter efetividade terapêutica, a dose diária terapeuticamente eficaz de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada usualmente múltiplas vezes ao paciente. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada diariamente durante um intervalo de tempo. Tipicamente, empregar-se-á administração diária durante pelo menos 3 dias consecutivos. Em concretizações relacionadas, a administração é durante pelo menos 5 dias consecutivos, pelo menos 7 dias consecutivos, ou pelo menos 10 dias consecutivos. Dependendo da dose, formulação, e via de administração selecionada pelo praticante e a conveniência do paciente, a dose diária inteira pode ser administrada uma vez ao dia, ou a dose diária pode ser administrada em múltiplas doses diárias uma vez ao dia, ou a dose diária pode ser administrada em múltiplas doses menores ao longo de um dia (incluindo por meio de infusão com uma bomba ou administração intravenosa). Por exemplo, a dose pode ser dividida em duas doses menores e administrada duas vezes ao dia, ou dividida em três doses menores e administradas três vezes ao dia. Alguém com prática na técnica de tratamento de câncer perceberá que, como usado aqui, administração "diária" não é limitada a uma administração por dia, mas pode incluir múltiplas administrações.

Também é possível usar programas de administração diferentes de administração diária consecutiva. Administração em dias alternados (qod) é particularmente vantajosa, e administração uma vez a cada terceiro dia, ou uma vez por semana pode ser apropriada em alguns casos, mas, em qualquer caso, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada repetidamente durante um determinado período. Por exemplo, se a administração for diária (incluindo, como indicado, uma dose diária dividida), em dias alternados, ou menos freqüentemente, em uma concretização uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada

pelo menos 2 dias por semana durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas consecutivas, ou, alternativamente, durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas em um intervalo de tempo de seis meses, ou, alternativamente, durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas em um intervalo de tempo de doze meses. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada pelo menos 3 dias por semana durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas consecutivas, ou, alternativamente, durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas em um intervalo de tempo de seis meses, ou, alternativamente, durante pelo menos duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis semanas em um intervalo de tempo de doze meses. Em uma concretização uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada pelo menos 10 dias por mês, opcionalmente pelo menos 20 dias por mês, durante pelo menos um mês ou pelo menos dois, três, quatro, cinco ou pelo menos seis meses consecutivos, ou, alternativamente, pelo menos um, duas, três, quatro, cinco ou pelo menos seis meses durante um período de 6 meses.

Em uma concretização, a administração da dose terapeuticamente eficaz é continuada durante vários dias, tipicamente durante pelo menos três dias consecutivos, e freqüentemente durante pelo menos de cinco a dez dias consecutivos, ou durante uma semana, ou durante várias semanas ou mais. Assim, um paciente pode receber administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato de acordo com os presentes métodos durante vários dias, uma semana, um mês, dois meses, três meses, seis meses, ou um ano ou mais tempo.

De forma consistente com regimes de administração de outros agentes anticâncer, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser administrada em múltiplos "ciclos" de administração. Por exemplo, em algumas concretizações, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode

ser administrada uma vez ao dia durante pelo menos de três a dez, ou pelo menos de cinco a dez dias consecutivos, e referidos tratamentos de três a dez ou de cinco a dez dias podem ser repetidos uma vez, duas vezes, ou três ou mais vezes, algumas vezes com um período sem tratamento (com um alquilador de fosforoamidato pró-droga) compreendendo de uma a várias semanas entre cada tratamento de múltiplos dias. De forma similar, em algumas concretizações, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada em dias alternados durante de duas a dez administrações, mais freqüentemente de três a dez administrações, ou de cinco a dez administrações, e referidas duas, três ou de cinco a dez administrações qod podem ser repetidas uma vez, duas vezes, ou três ou mais vezes com um período sem tratamento (com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato) compreendendo de uma a várias semanas entre cada tratamento de múltiplos dias. Outros programas de administração de múltiplos ciclos serão compreensíveis para o praticante versado guiado por esta descrição.

Em um aspecto, "administrar uma dose terapeuticamente eficaz ou regime de um alquilador de fosforoamidato pró-droga" refere-se a (i) administrar uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato nas faixas indicadas (p. ex., de 1 mg a 1 g de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato por kg de peso do paciente, tipicamente de 5 a 150 mg de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato por kg de peso do paciente) durante um número mínimo especificado de dias dentro de um período de tempo especificado, em que a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresenta um efeito terapêutico sobre o câncer no paciente. Regimes ilustrativos de doses terapeuticamente eficazes para uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato incluem aqueles descritos aqui, como administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato durante 3 dias consecutivos, 5 dias consecutivos, 7 dias consecutivos, 10 dias consecutivos, pelo menos 3 dias por semana, pelo menos 3 dias por semana

durante um mês, pelo menos 10 dias por mês, e pelo menos 20 dias por mês.

Na otimização de um regime de tratamento com pró-droga de alquilador de fosforoamidato de acordo com a presente invenção, a dose e freqüência de uma administração de pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser selecionada para se obter uma área sustentada máxima sob a curva de concentração de plasma (AUC) durante o curso de tratamento. O regime de dosagem teoricamente ótimo resultará numa exposição máxima das células de tumor a uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, conforme medido com AUC, ao mesmo em que se minimiza a concentração plasmática máxima (C_{max}) para uma qualquer administração simples. Uma C_{max} mais elevada contribuirá para a toxicidade, enquanto que a AUC determinará a eficácia. Como se compreende na técnica relativamente a outras drogas terapêuticas para câncer, tratamento com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser suspenso temporariamente caso não se observar toxicidade, ou visando a conveniência do paciente, sem afastar-se do escopo da invenção, e então reiniciado.

Em uma concretização, a farmacocinética da pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção empregada para o tratamento de câncer pode determinar a dose, o método de administração, e o tipo de câncer que é tratado com a pró-droga de alquilador de fosforoamidato. Em uma concretização, a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção pode apresentar uma meia-vida *in vivo* entre de 1 a 300 minutos. Em uma concretização, os compostos da presente invenção podem apresentar uma meia-vida *in vivo* entre de 3 a 10 minutos. Em uma concretização, os compostos da presente invenção podem apresentar uma meia-vida *in vivo* entre de 10 a 30 minutos. Uma meia-vida curta de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode requerer um tempo de infusão no tratamento que é mais longo do que aquele requerido para uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato apresentando uma meia-vida mais longa. Uma

meia-vida curta da pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode incrementar a dose máxima tolerada (MTD) para aquela pró-droga.

Em outra concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que permanecem até 20% inalteradas quando incubadas com proteína de microssoma de fígado de camundongo (atualização com exemplo humano e dados, se disponíveis) durante 30 minutos. Em outra concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que permanecem de 20 a 80% inalteradas quando incubadas com proteína microssômica de fígado de camundongo durante 30 minutos. Em outra concretização, a presente invenção proporciona pró-drogas de alquilador de fosforoamidato que permanecem mais de 80% inalteradas quando incubadas com proteína microssômica de fígado de camundongo durante 30 minutos. Em outra concretização, exemplos de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção que, quando incubados com proteína microssômica de fígado de camundongo durante 30 minutos permanecem acima de 80% inalterados incluem 1, 25, e 36. Quanto maior a estabilidade MLM de uma pró-droga da invenção, sua dose terapeuticamente eficaz e efeitos colaterais indesejáveis para o paciente serão menores.

Em uma concretização relacionada, o grupo biorredutor das pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção, após redução/ativação em uma zona de tumor hipóxica forma um conjugado de alquilador de fosforoamidato- T_M. O conjugado de alquilador de fosforoamidato- T_M pode difundir-se e atingir outras partes do tumor ou outros tumores no caso de uma doença metastática. Vários parâmetros farmacocinéticos, como volume de distribuição em estado estacionário (Vss), eliminação (CL), área sob a curva (AUC), estabilidade microssômica de fígado de camundongo (MLM), estabilidade plasmática, e C_{max} de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção foram medidas e

listadas na seção de Exemplos (ver também Hardman *et al*, supra).

Em regimes de re-tratamento, a dose pode ser ajustada para refletir a tolerância do paciente relativamente ao tratamento anterior. Em qualquer caso, à medida que se observa toxicidade durante a administração repetida, a dosagem pode ser interrompida temporariamente à medida que se observa sintomas graves. O período de interrupção temporária da administração (feriado de droga) pode ser encerrado no momento em que o primeiro órgão de toxicidade não contém mais concentrações significativas de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ou um alquilador de fosforoamidato liberado da mesma (o que pode ser medido ou determinado indiretamente por meio da cessação dos sintomas). Portanto, um período de dosagem intermitente pode ser definido não só por meio de dias específicos, mas individualizado com feriados de droga que se baseiam em sintomas e eliminação normal pelo órgão de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ou um alquilador de fosforoamidatos liberado da mesmo.

Uma formulação de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode encontrar-se, por exemplo, numa forma vantajosa para administração oral como um tablete, cápsula, pó de pílulas, formulação de liberação sustentada, solução, e suspensão; para injeção parenteral como uma suspensão, emulsão ou solução estéril; para administração tópica como um ungüento ou creme; e para administração como um supositório. Uma formulação de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser uma forma de dosagem unitária apropriada para administração simples de dosagens precisas e incluirá tipicamente um excipiente ou veículo farmacêutico convencional.

Veículos farmacêuticos vantajosos incluem cargas ou diluentes inertes, água e vários solventes orgânicos. As composições farmacêuticas podem conter, se desejado, ingredientes adicionais, como aromatizantes, ligantes, excipientes, e análogos. Assim,, para administração oral, tabletes

contendo vários excipientes, como ácido cítrico, podem ser empregados juntamente com vários desintegrantes, como amido, ácido algínico, e determinados silicatos complexos, e com agentes ligantes, como sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, é possível usar agentes lubrificantes, como estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, e talco para preparar as formas de tabletes de formulações de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato descrita aqui. Composições sólidas de um tipo similar podem ser empregadas em cápsulas de gelatina moles e duras enchidas. Portanto, materiais preferidos, incluem lactose ou açúcar do leite e polietileno glicóis com alto peso molecular. Quando se deseja suspensões aquosas ou elixires para administração oral, em que a pró-droga presente pode ser combinada com vários agentes adoçantes ou aromatizantes, materiais de tingimento ou corantes e, se desejado, agentes emulsificantes ou agentes de suspensão, juntamente com diluentes, como água, etanol, propileno glicol, glicerina, ou combinações dos mesmos.

Formas de administração parenteral exemplares incluem soluções ou suspensões de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato em soluções aquosas estéreis, por exemplo, polietileno glicóis aquosos, soluções de propileno glicol ou dextrose. Referidas formas de dosagem podem ser tamponadas de maneira vantajosa, se desejado.

Aqueles versados na técnica conhecem métodos de preparação de várias composições farmacêuticas com uma quantidade específica de droga ativa, ou serão compreensíveis mediante a leitura desta descrição. Para exemplos, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17ª edição (1984).

Os métodos de tratamento de câncer empregando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da presente invenção são efetivos para matar as células de câncer mais difíceis de matar que crescem na região hipóxida de um tumor. Uma vez liberada na região hipóxica uma pró-droga

de fosforoamidato pode difundir-se das células hipóxicas e matar as células de câncer em regiões adjacentes contendo populações crescentes de células que se dividem rapidamente. A região hipóxica atua como uma fábrica de droga para produzir, no interior de um tumor, um alquilador para matar células de câncer normóxicas adjacentes levando a uma maior concentração do alquilador de fosforoamidato no interior do tumor, relativamente a tecidos normais. O uso da pró-droga para gerar o alquilador de fosforoamidato no interior do tumor pode reduzir efeitos colaterais tóxicos causados pela toxicidade celular normal. Após a célula de câncer na região normóxica do tumor ter sido destruída, uma região hipóxica pode tornar-se normóxica e começar a dividir-se. Neste ponto, referidas células podem ser mortas pelos alquiladores de fosforoamidatos gerados de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato desta invenção ou aqueles conhecidos, ou por outros agentes anticâncer ou citoxinas administradas em combinação com a pró-droga de alquilador de fosforoamidato, como descrito na seção a seguir.

IIIc. Terapias de combinação

De acordo com os métodos da invenção, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser co-administrada em combinação com outros agentes anticâncer ("agente anticâncer"). Sem desejar ligar-se a qualquer efeito ou mecanismo particular, referida co-administração pode, em alguns casos, proporcionar uma ou mais de várias vantagens relativamente a terapias de câncer conhecidas, como, por exemplo, a co-administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e o agente anticâncer apresenta um efeito sinérgico sobre a indução de morte celular do câncer. A co-administração proporciona um melhor resultado terapêutico do que a administração do agente anticâncer sozinho, p. ex., maior alívio ou melhoramento de um ou mais sintomas do câncer, diminuição da extensão da doença, retardo ou desaceleração da progressão da doença, melhoramento, paliativo ou estabilização do estado da doença, remissão parcial ou completa,

sobrevida prolongada ou outros resultados terapêuticos benéficos.

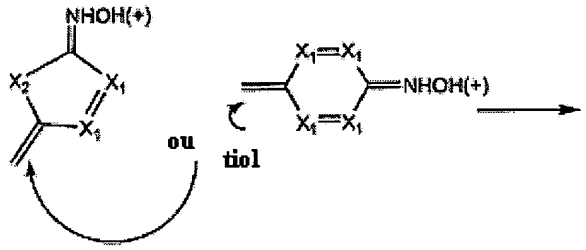
A co-administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato aumenta a sensibilidade de células de câncer ao agente anticâncer, permitindo administrar doses menores do agente anticâncer ao paciente ou permitindo o uso de um agente anticâncer para tratamento de células de outra forma resistentes ao agente anticâncer ou de outra forma refratárias a tratamento. Embora os agentes anticâncer conhecidos em geral objetivem as células que se dividem rapidamente na região normóxica, as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção objetivam as células hipóxicas nas regiões de tumores que não mortas eficientemente pelo agente anticâncer apenas.

Como usado aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é "co-administrada" com outro agente anticâncer (também referido aqui como, "Agente") quando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e Agente são administrados como parte do mesmo curso de terapia. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada primeiramente antes da administração do Agente, (i.e., o início da outra terapia contra o câncer), e o tratamento com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é continuado durante o curso de administração do Agente (i.e., o curso da outra terapia). Em outra concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada após o início ou o término da outra terapia contra o câncer. Em outras concretizações, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada primeiro contemporaneamente com o início da outra terapia contra o câncer. Ver, por exemplo, terapias de combinação como descrito na Seção de Exemplos.

Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada primeiro antes da administração do Agente, e tratamento com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é continuado

após cessar a administração do Agente. Em uma concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada primeiro antes da administração do Agente, e tratamento com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é continuado durante parte do período de administração do Agente. Para determinadas drogas, como determinados inibidores de topoisomerase, a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser iniciada e completada antes da administração a segunda droga pode ser iniciada e completada antes da administração da segunda droga.

Na presença de oxigênio, o ânion de radical formado após a redução de Z_3 reage com oxigênio dando superóxido e Z_3. Superóxido é uma citotoxina e a produção de superóxido em tecidos normóxicos pode levar a efeitos colaterais indesejados. Em uma concretização, a presente invenção proporciona uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato administrada em combinação com um agente quimioprotetor ou um quimioprotetor. Agentes quimioprotetores protegem tecido saudável contra efeitos tóxicos de drogas anticâncer. Em uma concretização, o agente quimioprotetor é um tiol ou um disulfeto. Em uma concretização, o quimioprotetor pode reduzir superóxido. em outra concretização, o quimioprotetor pode reagir com o "receptor de Michael" gerado de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e prevenir que o "receptor de Michael" venha a reagir com proteínas e ácido nucleico (ver abaixo).



Terapia com droga anticâncer envolve hoje em dia múltiplas operações, ou "ciclos", de administração do(s) agente(s) anticâncer. No contexto da administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato,

cada ciclo de administração (e também um conjunto completo de ciclos) pode ser considerado como administração de uma segunda droga. Uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser administrada em qualquer um ou em todos os múltiplos ciclos de tratamento com o outro Agente; de uma forma geral, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada numa base diária durante pelo menos dois ou mais dias durante cada ciclo. Em um aspecto da invenção, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com o Agente de acordo com um programa repetido a cada ciclo.

Em uma versão do método de tratar câncer usando-se uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada em combinação com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes quimioterápicos, uma quantidade eficaz de radioterapia, um procedimento cirúrgico apropriado, ou qualquer combinação de referidas terapias adicionais.

Quando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é usada em combinação com uma ou mais das terapias adicionais, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e terapia adicional podem ser administradas ao mesmo tempo, ou podem ser administradas separadamente. Por exemplo, se uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada com um agente quimioterápico adicional, os dois agentes podem ser administrados simultaneamente ou podem ser administrados seqüencialmente com algum intervalo entre as administrações. Alguém com prática na técnica compreenderá métodos de administração dos agentes simultâneos e seqüenciais e possíveis intervalos de tempo entre as administrações. Ver, por exemplo, terapias de combinação como descrito na Seção de Exemplos.

Os Agentes podem ser administrados como as mesmas formulações ou como formulações diferentes e podem ser administrados pelas

mesmas vias ou por vias diferentes.

Agentes quimioterápicos que podem ser usados em combinação com a pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção incluem, embora sem limitação, bussulfano, improsulfano, piposulfano, benzodepa, carboquona, 2-desóxi-D-glicose, lonidamina e análogos dos mesmos (referência apps), glufosfamida, gemcitibina, erlotiniba, meturedepa, uredepa, altretamina, imatiniba, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida, trimetilolomelamina, clorambucila, cloronafazina, estramustina, ifosfamida, gefitiniba, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenosterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda uracila, carmustina, clorozotocina, fotemustina, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, aclacinomicinas, actinomicina F(I), antramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carubicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-fluorouracila, tegafur, L-asparaginase, pulmozima, aceglatona, glicosídeo de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, amsacrina, bestrabucila, bisantreno, carboplatina, defofamida, demecolcina, diaziquona, elfornitina, acetato de eliptínio, etoglucida, flutamida, nitrato de gálio, hidroxiuréia, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama, interleucina-2, lentinano, mitoguazona, mitoxantrona, mopidamol, nitracrina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, ácido podofilínico, 2-etil-hidrazida, procarbazina, razoxano, sizofirano, espirogermânio, paclitaxel, tamoxifeno, erlotonib, teniposida, ácido tenuazônico, triaziquona, 2,2',2''-triclorotrietilamina,

uretana, vinblastina, ciclofosfamida, e vincristina. Outros agentes quimioterápicos que podem ser usados incluem derivados de platina, incluindo, embora sem limitação, cis platina, carboplatina, e oxoplatina.

Em uma versão, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato descrita aqui pode ser usada em combinação com um inibidor anti-angeogênese incluindo, embora sem limitação, Avastina e terápicos similares. Em uma versão dos métodos de tratamento de combinação, um sujeito é tratado com um inibidor de anti-angeogênese e é tratado subseqüentemente com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato. Em uma versão dos métodos de tratamento de combinação, um sujeito é tratado com um inibidor de anti-angeogênese e subseqüentemente tratado com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato com outro agente quimioterápico, incluindo, embora sem limitação, Cisplatina, e carboplatina. Em uma versão destes métodos de tratamento de combinação usando-se um inibidor de anti-angiogênese, o método é usado para tratar câncer de mama.

Em outra concretização, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada com um agente anticâncer que atua, quer diretamente ou indiretamente, inibindo o fator de crescimento epidérmico ou receptor EGFR. Inibidores de EGFR vantajosos para co-administração com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção incluem gefitiniba e erlotoniba.

Em outra versão, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada com um agente anticâncer que atua, seja diretamente ou indiretamente, inibindo o fator induzível com hipoxia 1 alfa (HIF1a) ou inibindo uma proteína ou enzima, como um transportador de glicose ou VEGF, cuja expressão ou atividade é incrementada com níveis incrementados de HIF1a. Inibidores de HIF1a vantajosos para uso nesta versão dos métodos e composições descritos aqui incluem inibidores de quinase P13; LY294002; rapamicina; inibidores de histona desacetilase, como

[(E)- (1S,4S,10S,21R)-7-[(Z)-etilideno]-4,21-diisopropil-2-oxa-12,13-ditia-5,8,20,23- tetraazabiciclo-[8,7,6]-tricos-16-eno-3,6,9,19,22-pentanona (FR901228, depsipeptídeo); inibidores de proteína de choque com calor 90 (Hsp90), como geldanamicina, 17-alilamino-geldanamicina (17- AAG), e outros análogos de geldanamicina, e derivados de radicicol e radicicol, como KF58333; genisteína; indanona; estaurosporina; inibidores de proteína quinase-1 (MEK-1), como PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona); PX-12 (1-dissulfeto de metilpropil 2-imidazolila); pleurotina PX-478; 1,4-dióxidos de quinoxalina; butirato de sódio (NaB); nitropurrusida de sódio (SNP) e outros doadores de NO; inibidores de microtúbulos, como novobiocina, panzem (2-metoxiestradiol ou 2-ME2), vincristinas, taxanos, epotilonas, discodermolida, e derivados de qualquer um dos seguintes; coumarinas; análogos de ácido barbitúrico e tiobarbitúrico; camptotecinas; e YC-1, um composto descrito em *Biochem. Pharmacol.*, 15 de abril de 2001, 61(8):947-954, incorporado aqui por referência, e seus derivados.

Em outra versão, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada com um agente anti-angiogênico, incluindo, embora sem limitação, agentes anti-angiogênicos selecionados do grupo que consiste de angiostatina, um agente que inibe ou, de outra forma, antagoniza a ação do VEGF, batimastato, captopril, inibidor de derivado de cartilagem, genisteína, endostatina, interleucina, lavendustina A, acetato de medroxiprogesterona, fator de plaquetas humanas recombinante 4, Taxol, tecogalano, talidomida, trombospondina, TNP -470, e Avastina. Outros inibidores de angiogênese úteis para os fins das terapias de combinação proporcionadas pelos presentes métodos e composições aqui descritos incluem inibidores de Cox-2, como celecoxiba (Celebrex), diclofenaco (Voltaren), etodolaco (Lodine), fenoprofeno (Nalfon), indometacina (Indocin), cetoprofeno (Orudis, Oruvail), cetoralaco (Toradol), oxaprozina (Daipro), nabumetona (Relafen), sulindaco (Clinoril), tolmetina (Tolectin),

rofecoxib (Vioxx), ibuprofeno (Advil), naproxeno (Aleve, Naprosyn), aspirina, e acetaminofeno (Tylenol).

Adicionalmente, como o ácido pirúvico desempenha um papel importante na angiogênese, emuladores de piruvato e inibidores glicolíticos, como halopiruvatos, incluindo bromopiruvato, podem ser usados em combinação com um composto anti-angiogênico e uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato para tratar câncer. Em outra versão, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada com um agente anti-angiogênico e outro agente anticâncer, incluindo, embora sem limitação, um agente citotóxico selecionado do grupo que consiste de alquiladores, Cisplatina, Carboplatina, e inibidores de aglomeração de microtúbulos, para tratar câncer.

Adicionalmente à combinação de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato com os Agentes descritos acima, os presentes métodos e composições aqui descritos proporcionam uma variedade de combinações sinérgicas de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e outras drogas anticâncer. Aqueles com prática na técnica poderão determinar facilmente que as drogas anticâncer agem "sinergicamente" com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato como descrito aqui. Por exemplo, a referência Vendetti, "Relevance of Transplantable Animal-Tumor Systems to the Selection of New Agents for Clinical Trial", Pharmacological Basis of Cancer Quemotherapy, Williams e Wilkins, Baltimore, 1975, e Simpson Herren *et al.*, 1985, "Evaluation of *in vivo* Tumor Models for Predicting Clinical Activity for Anticancer Drugs", *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 26: 330, em que cada uma é incorporada aqui por referência, descrevem métodos para auxiliar na determinação de se duas drogas atuam sinergicamente.

Embora não seja necessária sinergia para o benefício terapêutico de acordo com os métodos aqui descritos, em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratamento de câncer, em que

há sinergia entre uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato e outro agente anticâncer. Diz-se que duas drogas apresentam sinergia terapêutica se um regime de combinação de doses das duas drogas produzir uma eliminação significativamente melhor de células de tumor do que a soma dos Agentes individualmente mesmo com doses ótimas ou máximas toleradas. O "grau de sinergia" pode ser definido como log puro da eliminação de células de tumor por meio do regime de combinação ótimo, menos o log puro da eliminação de células de tumor com a dose ótima do Agente simples mais ativo. Diferenças na eliminação celular acima de dez vezes (um log) são consideradas conclusivamente indicativas de sinergia terapêutica.

Quando uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é usada com outro agente anticâncer, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato será administrada, pelo menos em algumas concretizações, antes do início da terapia com a outra droga ou drogas, e a administração será tipicamente continuada durante o curso de tratamento com a outra droga ou drogas. Em algumas concretizações, a droga co-administrada com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato será fornecida numa dose menor e, opcionalmente, durante períodos mais prolongados, do que seria o caso na ausência de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato. Tais terapias "de dose baixa" podem envolver, por exemplo, a administração de uma droga anticâncer, incluindo, embora sem limitação, paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina, cisplatina, ou carboplatina, numa dose inferior à dose aprovada e durante um período mais longo juntamente com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato administrada de acordo com os métodos descritos aqui.

Estes métodos podem ser usados para melhorar os resultados dos pacientes relativamente a terapias praticadas correntemente por meio da eliminação mais eficaz de células de câncer ou da interrupção do crescimento de células de câncer, e também diminuindo efeitos colaterais indesejados da

outra terapia. Quando empregados em combinação com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato, o agente(s) anticâncer adicional/adicionais é/são dosado(s) usando-se as dosagens convencionais empregadas por aqueles Agentes (i.e., quando usados sem uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato) foram inferiores àquelas dosagens.

Portanto, a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato de acordo com os métodos descritos aqui podem permitir que o médico trate câncer com drogas existentes (ou aprovadas mais tarde) em doses mais baixas (do que usado correntemente), desta forma melhorando alguns ou todos os efeitos colaterais tóxicos de referidas drogas. A dosagem exata para um dado paciente varia de paciente para paciente, dependendo de uma variedade de fatores incluindo a combinação de drogas empregada, da doença particular que está sendo tratada, e da condição e da história prévia do paciente, mas pode ser determinada usando apenas a prática da pessoa com prática ordinária na técnica considerando os ensinamentos aqui contidos.

Regimes de doses específicos para agentes quimioterápicos ou agentes anti-neoplásicos conhecidos ou aprovados (i.e., a dose eficaz recomendada) são conhecidos pelos médicos e são indicados, por exemplo, nas descrições de produtos encontradas na obra *Physician's Desk Reference* 2003, (*Physicians' Desk Reference*, 57ª ed.) Medical Economics Company, Inc., Oradell, NJ e/ou podem ser obtidos junto à *Federal Drug Administration*. Regimes ilustrativos de dosagens para determinadas drogas anticâncer também são fornecidos abaixo.

Drogas contra o câncer podem ser classificadas de uma maneira geral como alquiladores, antraciclinas, antibióticos, inibidores de aromatase, bisfosfonatos, inibidores de ciclo-oxigenase, moduladores de receptor de estrogênio, antagonistas de folato, aresenatos inorgânicos, inibidores de microtúbulos, modificadores, nitrosouréias, análogos de nucleosídeo, inibidores de osteoclastos, compostos contendo platina,

retinóides, inibidores de topoisomerase 1, inibidores de topoisomerase 2, e inibidores de tirosina quinase. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser co-administrada com qualquer droga anticâncer de qualquer uma destas classes ou pode ser administrada antes ou após o tratamento com qualquer uma destas drogas ou combinação destas drogas. Adicionalmente, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato pode ser administrada em combinação com uma terapia biológica (p. ex., tratamento com interferons, interleucinas, fatores estimuladores de colônias e anticorpos monoclonais). Biologias usadas para tratamento de câncer são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, trastuzumab (Herceptin), tositumomab e ^{131}I Tositumomab (Bexxar), rituximab (Rituxan).

Alquiladores úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, bussulfano (Myleran, Busulfex), clorambucila (Leukeran), ifosfamida (com ou sem MESNA), ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), glufosfamida, melfalano, L-PAM (Alqeran), dacarbazina (DTIC-Dome), e temozolamida (Temodar). De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um alquilador para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é leucemia mielógena crônica, mieloma múltiplo, ou astrocitoma anaplásico.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer tratável por meio de administração de um alquilador por meio de administração das pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção ou daquelas sozinhas ou em combinação com pelo menos outro alquilador ou uma pró-droga do mesmo. Alquiladores, como, por exemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, glufosfamida, mecloretamina, melfalano, clorambucila, dacarbazina, temozolomida, carmustina, estreptozocina, bendamustina, bussulfano, tiotepa, cisplatina, carboplatina, e oxaliplatina, e tipos de cânceres tratados usando-se qualquer um de referidos

alquiladores sozinhos ou em combinação com outros agentes anticâncer ou quimioprotetores encontram-se descritos, por exemplo, na referência Hardman *et al*, (acima).

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de co-administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato com, pelo menos, o alquilador Ciclofosfamida, no tratamento de linfomas malignos em Estágios III e IV, mieloma múltiplo, leucemia, micose fungóide, neuroblastoma, adenocarcinoma ovariano, retinoblastoma, e carcinoma da mama. Ciclofosfamida é administrada para terapia de indução em doses de 1500-1800 mg/m^2 que são administrados intravenosamente em doses divididas ao longo de um período de três a cinco dias; para terapia de manutenção administra-se de 350 a 550 mg/m^2 a cada de 7 a 10 dias, ou administra-se de 110 a 185 mg/m^2 intravenosamente duas vezes por semana. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com ciclosfosfamida administrada em doses como as referidas ou em doses mais baixas e/ou durante um período mais longo do que o normal para administração de Ciclosfosfamida apenas.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção juntamente com um regime de tratamento de câncer usando-se pelo menos o alquilador Mecloretamina. Por exemplo, Mecloretamina é usada na regime de quimioterapia de combinação MOPP (mecloretamina, Oncovina (vincristina), procarbazina, e prednisona) em pacientes com doença de Hodgkin e administrada por meio de administração de bolo em doses de 6 mg/m^2 nos dias 1 e 8 do ciclo de 28 dias de cada curso de tratamento.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de

alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer em que se usa pelo menos o alquilador Ifosfamida. Ifosfamida é usada para tratar sarcomas pediátricos e adulstos, carcinomas do cérvice e do pulmão, e em combinação com outras drogas para câncer testicular de células germinativas. Ifosfamida é usada como parte dos regimes ICE (Ifosfamida, Carboplatina, e Etoposida) e RICE (Rituxan e ICE) para tratar linfomas (ver Hardman *et al*, acima).

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos o alquilador Glufosfamida. Glufosfamida encontra-se na clínica para o tratamento de câncer pancreático ou Câncer pancreático resistente ao Gemzar. Glufosfamida pode ser usada para tratar câncer de mama, Morbus Hodgkin, câncer do trato gastrintestinal, ou como parte do regime GCE (Glufosfamida, Carboplatina, e Etoposida) ou RGCE (Rituxano e GCE), para tratar linfomas. (Tidmarsh *et al*, Pedido de Pat. PCT nº PCT/US2005/047314 depositado em 22 de dezembro de 2005, e Pedido de Pat. PCT intitulado "Terapia de Combinação com Glufosfamida", Protocolo do advogado nº 021305-005900PC; e Pedido de Pat. dos E.U.A. nº 60/760.599 e 60/719.787 e Pedido de Pat. Publ. PCT nº WO 2005/076888, incorporados aqui integralmente por referência).

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos um alquilador selecionado do grupo que consiste de etileniminas e metilmelaminas. Em outra concretização, a etilenimina é Trietilenomelamina ou Tiotepa.

Tiotepa pode ser usada para tratar adenocarcinomas da mama, ovário, e bexiga, linfomas malignos, carcinomas bronquiogênicos, e tumor de

Wilms. Usou-se Tiotepa em altas doses na quimioterapia de combinação com ciclofosfamida em pacientes com tumores malignos refratários tratados com transplante de osso autólogo e para tratar uma variedade de cânceres incluindo da bexiga, ovário, mama, pulmão, cérebro, e linfomas (ver, *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 1975, 9: 286, Lyon, França; International Agency for Research on Câncer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1990, 50: 415, Lyon, França; e MEDLINEplus, 2003, *Drug Information: Tiotepa, National Library of Medicine*). A metilmelamina Altretamina é usada para tratar câncer ovariano avançado após falha das primeiras terapias cíclicas.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos o alquilador Melfalano, Clorambucila, ou Bendamustina. Melfalano é usado para tratar mieloma múltiplo e pode ser administrado oralmente. Clorambucila é usada para tratar leucemia lipocítica crônica e macroblobulinemia primária. Bendamustina, desenvolvida pela Salmedix Inc. pode ser usada para tratar tumores malignos hematológicos, como, por exemplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, e mieloma múltiplo.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos o alquilador Bussulfano. Bussulfano é usado para tratar leucemia granulocítica crônica e leucemia mielógena crônica. É possível usar altas doses de bussulfano em combinação com Ciclofosfamida para tratar pacientes com leucemia mielógena aguda antes de transplante da medula óssea.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos um alquilador de nitrosouréia. Em outra concretização, o alquilador de nitrosouréia é Carmustina. Carmustina pode ser usada para tratar doença de Hodgkin, linfomas, mielomas, astrocitomas malignos, tumores metastáticos do cérebro, melanoma, e tumores gastrintestinais. Em outra concretização, a nitrosouréia é Estreptozocina que é usada para tratar carcinoma de células ilhotas pancreáticas.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos um alquilador de triazeno. Em uma concretização, o alquilador de triazeno é Dacarbazina. Dacarbazina é usada para tratar melanoma maligno, doença de Hodgkin, e sarcona adulto. Em outra concretização, o alquilador de triazeno é Temozolomida. Temozolomida pode ser usada para tratar gliomas malignos.

Em uma concretização, a presente invenção proporciona um método de tratar câncer por meio de administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato da invenção com um regime de tratamento de câncer usando pelo menos um alquilador de complexo de coordenação de platina. Em uma concretização, o alquilador de complexo de coordenação de platina é Cisplatina. Cisplatina pode ser usada para tratar câncer da bexiga, cabeça e pescoço, endométrio, carcinoma de células pequenas do pulmão, e alguns neoplasmas da infância. Cisplatina sozinha ou com ciclofosfamida é usada para tratar câncer ovariano avançado. Quimioterapia de combinação de Cisplatina com Bleomicina, Etoposida, e Vinblastina é usada para tratar câncer testicular avançado; e com um de Paclitaxel, Ciclofosfamida, ou Doxorrubicina para tratar carcinoma ovariano.

Antraciclinas úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, doxorrubicina (Adriamicina, Doxil, Rubex), mitoxantrona (Novantrona), idarubicina (Idamicina), valrubicina (Valstar), e epirubicina (Ellence). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com uma antraciclina para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é leucemia não-linfocítica aguda, sarcoma de Kaposi, câncer da próstata, câncer da bexiga, carcinoma metastático do ovário, e câncer de mama.

Como um exemplo, o composto (8S,10S)-10-[(3-Amino-2,3,6-tridesóxi-alfa-L-lixo-hexopiranosil)óxi]-8-glicoloil-7,8,9,10 a tetraidro-6,8,11-triidróxi-1-metóxi-5,12-naftacenodiona, conhecida mais comumente como doxorrubicina, é um antibiótico citotóxico de antraciclina isolado de culturas de Streptomyces peucetius var. caesius. Doxorrubicina tem sido usada com êxito para produzir regressão em condições neoplásicas disseminadas, como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilm, neuroblastoma, sarcomas dos tecidos macios e dos ossos, carcinoma da mama, carcinoma ovariano, carcinoma da bexiga de células transicionais, carcinoma da tireóide, linfomas de tipos Hodgkin e não-Hodgkin, carcinoma broncogênico, e carcinoma gástrico. Doxorrubicina é administrada tipicamente em uma dose na faixa de 30 a 75 mg/m^2 como uma injeção intravenosa simples administrada em intervalos de 21 dias; injeção intravenosa semanal em doses de 20 mg/m^2; ou doses de 30 mg/m^2 em cada um dos três dias sucessivos e foi repetida a cada quatro semanas. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada começando antes e continuando após a administração de doxorrubicina em doses como as referidas (ou em doses mais baixas). Pró-drogas de citotoxina de antraciclina cíclica úteis na prática dos métodos descritos aqui são proporcionados pela referência Matteuci *et al*, Pedido de Patente PCT nº US05/008161.

Antibióticos úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, dactinomicina, actinomicina D (Cosmegen), bleomicina (Blenoxano), daunorrubicina, e daunomicina (Cerubidina, DanuoXome). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um antibiótico para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é um câncer selecionado do grupo que consiste de leucemia linfocítica aguda, outras leucemias, e sarcoma de Kaposi.

Inibidores de aromatase úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, nastrozol (Arimidax) e letroazol (Femara). De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de aromatase para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer de mama.

Inibidores de bisfosfonato úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, zoledronato (Zometa). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrado com um inibidor de bifosfonato para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é um câncer selecionado do grupo que consiste de mieloma múltiplo, metástases ósseas de tumores sólidos, ou câncer da próstata.

Inibidores de ciclooxigenase úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, celecoxiba (Celebrex). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de ciclo-oxigenase para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer do colo ou uma condição pré-cancerosa conhecida como polipose adenomatosa familiar.

Moduladores de recetor de estrogênio úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, tamoxifeno (Nolvadex) e fulvestrant (Faslodex). De acordo com os métodos descritos

aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um modulador de receptor de estrogênio para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer de mama ou o tratamento é administrado para prevenir a ocorrência ou recorrência de câncer de mama.

Antagonistas de folato úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, metotrexato e tremetrexato. De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co- administrada com um antagonista de folato para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é osteosarcoma.

Como um exemplo, o composto N-[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil memilamino]benzoil]-L-ácido glutâmico, comumente conhecido como metotrexato, é uma droga antifolato que tem sido usada no tratamento de coriocarcinoma gestacional e no tratamento de pacientes com *chorioadenoma destruens* e *hydatiform mole*. Também é útil no tratamento de estágios avançados de linfoma maligno e no tratamento de casos avançados de micose fungóide. Metotrexato é administrado como a seguir. No caso do coriocarcinoma, administra-se injeções intramusculares de doses de 15 a 30 mg diariamente durante um curso de cinco dias, em que referidos cursos são repetidos conforme necessário com período de descanso de uma ou mais semanas interpostas entre cursos de terapia. No caso de leucemias, duas vezes por semana administra-se injeções intramusculares em doses de 30 mg/m^2. No caso da micose fungóide, injeções intramusculares semanais de doses de 50 mg ou, alternativamente, de 25 mg são administradas duas vezes por semana. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com metotrexato administrado em doses como as referidas (ou em doses mais baixas). 5-Metil-6-[[(3,4,5-trimetoxifenil)-amino]metil]-2,4-quinazolinodiamina (comumente conhecida como trimetrexato) é outra droga antifolato que pode ser co-administrada com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Arseniatos inorgânicos úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, trióxido arsênico (Trisenox). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrado com um arseniato inorgânico para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é leucemia promielocítica aguda refratária (APL).

Inibidores de microtúbulos (como usado aqui, um "inibidor de microtúbulos" é qualquer agente que interfere com a montagem ou desmontagem de microtúbulos) úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, vincristina (Oncovin), vinblastina (Velban), paclitaxel (Taxol, Paxene), vinorelbina (Navelbine), docetaxel (Taxotere), epotilona B ou D ou um derivado de um destes, e discodermolida ou seus derivados. Drogas anticâncer de ligação de tubulina e pró-drogas das mesmas que podem ser usadas na prática dos métodos da presente invenção são proporcionadas na referência Matteucci *et al*, Pedido de Patente PCT nº PCT/US2005/042095; Pedidos de Patentes dos E.U.A. intitulados "Tubulin Binding Anti Cancer Agents e Prodrugs Thereof (referências do advogado nums. 021305-008500US, 021305- 008400US e 021305-004520US). De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de microtúbulos para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer ovariano, câncer de mama, câncer pulmonar de células não-pequenas, sarcoma de Kaposi, e câncer metastático de origem mamária ou ovariana. Como um exemplo, o composto 22-oxo-vincaleucoblastina, também comumente conhecido como vincristina, é um alcalóide obtido da planta pervinca comum (*Vinca rosea*, Linn.) e é útil no tratamento de leucemia aguda. Verificou-se também que é útil em combinação com outros agentes oncolíticos no tratamento de doença de Hodgkin, linfossarcoma, sarcoma de células do retículo, rabdomiossarcoma, neuroblastoma, e tumor de Wilm. Vincristina é administrada em doses

intravenosas semanais de 2 mg/m^2 para crianças e de 1,4 mg/m^2 para adultos. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com vincristina administrada em doses como as referidas. Em uma versão, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato não é administrada antes do tratamento com um inibidor de microtúbulos, como um taxano, mas, ao invés, a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é administrada simultaneamente com, ou dentro de alguns poucos dias até uma semana após início do tratamento com um inibidor de microtúbulos.

Modificadores úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, Leucovorina (Wellcovorin), que é usada com outras drogas, como 5-fluorouracila para tratar câncer colorretal. De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um modificador e outro agente anticâncer para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer do colo. Em uma versão, o modificador é um composto que aumenta a capacidade de uma célula em absorver glicose, incluindo, embora sem limitação, o composto N-hidroxiuréia. Reportou-se que a N-hidroxiuréia incrementa a capacidade de uma célula em absorver 2-desoxiglicose (ver a referência Smith *et al.*, 1999, *Cancer Letters* 141: 85, incorporada aqui por referência), e administração de N-hidroxiuréia em níveis que, reporta-se, incrementam a absorção de 2-desoxiglicose ou para tratar leucemia juntamente com a administração de 2-desoxiglicose e uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato como descrito aqui é uma versão dos métodos terapêuticos aqui proporcionados. Em outra versão do tipo referido, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com óxido nítrico ou um precursor de óxido nítrico, como um nitrito orgânico ou um esperminaNONOato, para tratar câncer, porque os compostos referidos por último estimulam a absorção de glicose.

Nitrosouréias úteis na prática dos métodos descritos aqui

incluem, embora sem limitação, procarbazina (Matulane), lomustina, CCNU (CeeBU), carmustina (BCNU, BiCNU, Gliadel Wafer), e estramustina (Emcyt). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com uma nitrosouréia para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer da próstata ou glioblastoma, incluindo glioblastoma multiforme recorrente.

Análogos de nucleosídeos úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, mercaptopurina, 6-MP (Purinethol), fluorouracila, 5-FU (Adrucil), tioguanina, 6-TG (Tioguanina), hidroxiuréia (Hydrea), citarabina (Cytosar-U, DepoCyt), floxuridina (FUDR), fludarabina (Fludara), azacitidina (Vidaza), pentostatina (Nipent), cladribina (Leustatin, 2-CdA), gemcitabina (Gemzar), e capecitabina (Xeloda). De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um análogo de nucleosídeo para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é leucemia linfocítica de células B (CLL), leucemia de células peludas, adenocarcinoma do pâncreas, câncer metastático de mama, câncer pulmonar de células não-pequenas, ou carcinoma colorretal metastático. Como um exemplo, o composto 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona, também comumente conhecido como 5-fluorouracila, é um análogo de nucleosídeo antimetabólito efetivo no controle paliativo de carcinoma do colo, reto, mama, estômago, e pâncreas em pacientes que são considerados incuráveis por meios cirúrgicos ou outros meios. 5-Fluorouracila é administrada na terapia inicial em doses de 12 mg/m^2 administradas intravenosamente uma vez ao dia durante 4 dias sucessivos, em que a dose diária não deve exceder 800 mg. Caso não se observe toxicidade a qualquer momento durante o curso da terapia, 6 mg/kg são dados intravenosamente no 6°, 8°, 10°, e 12° dias. Não se administrou terapia no 5°, 7°, 9°, ou 11° dias. Em pacientes de baixo risco ou no caso daqueles que não se encontram em um estado nutricional adequado, uma dose diária de 6 mg/kg

é administrada durante três dias, em que a dose diária não excede 400 mg. Não se observando qualquer toxicidade a qualquer momento durante o tratamento, é possível administrar 3 mg/kg no 5°, 7°, e 9° dias. Não se administrou qualquer terapia no 4°, 6°, ou 8° dias. Uma seqüência de injeções em qualquer programa constitui um curso de terapia. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com 5-FU que é administrado em doses do tipo referido ou com a forma de pró-droga Xeloda com doses correspondentemente ajustadas. Como outro exemplo, o composto 2-amino-1,7-diidro-6H-purina-6-tiona, também comumente conhecido como 6-tioguanina, é um análogo de nucleosídeo efetivo na terapia de leucemias não-pinfocíticas agudas. 6-Tioguanina é administrada oralmente em doses de cerca de 2 mg/kg de peso corporal por dia. A dose diária total pode ser dada de uma só vez. Se após quatro semanas de dosagem neste nível não ocorrer melhora, a dosagem pode ser cuidadosamente incrementada a 3 mg/kg/dia. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com 6-TG administrado em doses do tipo referido (ou em doses mais baixas).

Inibidores de osteoclastos úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, pamidronato (Aredia). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de osteoclasto para tratar câncer. Em uma versão, o câncer consiste de metástases ósseas osteolíticas de câncer de mama, e um ou mais agentes anticâncer adicionais também são co-administrados com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Compostos de platina úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, cisplatina (Platinol) e carboplatina (Paraplatin). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um composto de platina

para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é câncer testicular metastático, câncer ovariano metastático, carcinoma ovariano, e câncer da bexiga de células transicionais. Como um exemplo, o composto cis-Diaminadicloro-platina (II), comumente conhecido como cisplatina, é útil no tratamento paliativo de tumores ovarianos e testiculares metastáticos, e para o tratamento de câncer da bexiga de células transicionais que não é passível de cirurgia ou radioterapia. Cisplatina, quando usada para câncer da bexiga avançado, é administrada em injeções intravenosas de doses de 50 a 70 mg/m^2 uma vez a cada três a quatro semanas. De acordo com os métodos descritos aqui, uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com cisplatina administrada nestas doses (ou em doses mais baixas). Um ou mais agentes anticâncer adicionais podem ser co-administrados com o composto de platina e uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato. Como um exemplo, Platinol, Blenoxano, e Velbama podem ser co-administrados com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato. Como outro exemplo, Platinol e Adriamicina podem ser co-administrados com uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato.

Retinóides úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, tretinoína, ATRA (Vesanoid), alitretinoína (Panretin), e bexaroteno (Targretin). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um retinóide para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é um câncer selecionado do grupo que consiste de APL, sarcoma de Kaposi, e linfoma de células T.

Inibidores de topoisomerase 1 úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, topotecano (Hycamtin) e irinotecano (Camptostar). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de topoisomerase 1 para tratar câncer. Inibidores de topoisomerase e pró-drogas

dos mesmos que são úteis na dos métodos da presente invenção são indicados na referência Matteucci *et al.*, Pedido de Patente PCT nº PCT/US2005/041959. Em uma versão, o câncer é carcinoma metastático do ovário, do colo, ou reto, ou câncer pulmonar de células pequenas. Como indicado acima, no entanto, em uma versão dos métodos descritos aqui, a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ou precede ou segue, ou ambos, a administração de um inibidor de topoisomerase 1, mas não é administrado concorrentemente com o mesmo.

Inibidores de topoisomerase 2 úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, etoposida, VP-16 (Vepesid), teniposida, VM-26 (Vumon), e fosfato de etoposida (Etopophos). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de topoisomerase 2 para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é um câncer selecionado do grupo que consiste de tumores testiculares refratários, leucemia linfoblástica aguda refratária (ALL), e câncer pulmonar de células pequenas. Como indicado acima, no entanto, em uma versão dos métodos descritos aqui, a administração de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ou precede ou segue, ou ambos, a administração de um inibidor de topoisomerase 2, mas não é administrado concorrentemente com o mesmo.

Inibidores de tirosina quinase úteis na prática dos métodos descritos aqui incluem, embora sem limitação, imatiniba (Gleevec). De acordo com os métodos descritos aqui uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato é co-administrada com um inibidor de tirosina quinase para tratar câncer. Em uma versão, o câncer é CML ou um tumor de estroma gastrintestinal maligno metastático ou não-ressectável/.

Análogos de Lonidamina úteis na prática da presente invenção são proporcionados em Matteucci *et al.* Pedidos de Pat. dos E.U.A. nums. 11/346632; 60/764.427; 60/764.438; e pedidos intitulados "Heterocyclic

Lonidamine Analogs" (Protocolo do advogado nº 021305-007220US; 021305-007900US) e Publicação PCT nums. WO 2006/015191, WO 2006/015263 e WO 2006/01007 A2.

Assim, descreve-se aqui métodos de tratar câncer em que uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma e um ou mais agentes anticâncer adicionais são administrados a um paciente. Versões específicas de referidos outros agentes anticâncer incluem sem limitação 5-metil-6-[[(3,4,5-trimetoxifenil)amino]-metil]-2,4-quinazolinodiamina ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, (8S,10S)-10-(3-amino- 2,3,6-tridesóxi-alfa-L-lixo-hexopiranosil)óxi]-8-glicoloil-7,8,9,10 a tetraidro-6,8,11 a triidróxi-1-metóxi-5,12-naftacenodiona ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma; 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma; 2-amino-1,7-diidro-6H-purina-6-tiona ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma; 22-oxo- vincaleucoblastina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma; 2-bis[(2- cloroetil)amino]tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina, 2-óxido, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; ácido N-[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]-metilamino]benzoil]-L-glutâmico, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; ou cisdiaminodicloro-platina (II).

IV. Exemplos

Nos exemplos a seguir, qualquer referência a um composto designado com uma letra é uma referência à estrutura mostrada próxima ou acima daquela letra nos esquemas de reação correspondentes.

Síntese

Métodos para sintetizar as pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção são proporcionados na seção IIb. Adquiriu-se materiais de partida usados na síntese das pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção, quando disponíveis, junto

a fabricantes comerciais, como, por exemplo, a Sigma-Aldrich Co. 1-N-Metil-2-nitroimidazol-5-metanol foi adquirido da Syngene, Índia. Materiais de partida que não são obtidos comercialmente podem ser sintetizados por meio de procedimentos convencionais não-comerciais via procedimentos convencionais da literatura. Referidos procedimentos podem ser identificados por meio de ferramentas de busca da literatura, como SciFinder, obtenível junto à American Chemical Society, ou Beilstein, obtenível junto à MDL Software.

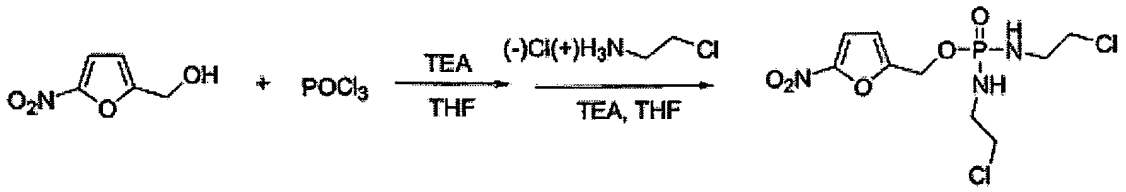
Reações com compostos sensíveis à umidade, como, por exemplo, $POCl_3$ e PCl_3, e seus derivados mono e di-cloro foram realizados empregando-se solventes anidros e sob nitrogênio ou argônio. A separação de um produto da mistura de reação foi realizada empregando-se um tratamento onde necessário, seguido de destilação a vácuo, cristalização, cromatografia de coluna, ou cromatografia de camada espessa preparativa. Um eluente vantajoso para a cromatografia de coluna de um composto pode ser determinado mediante a leitura desta revelação e/ou determinando-se o R_f do composto por meio de cromatografia de camada fina e selecionando-se um solvente que segue a separação do composto desejado de compostos indesejados. A escolha de um eluente particular pode depender, entre outros fatores, da natureza polar do composto, da existência de outros compostos de eluição próxima, do tipo da fase estacionária, como o sílica-gel ou a alumina usada, e da quantidade de pressão usada para eluir o solvente através da fase estacionária. Na prática, é possível usar diferentes composições de solventes para separar o mesmo composto.

Compostos separados foram analisados quanto a sua pureza por meio de técnicas analíticas convencionais, como TLC, espectroscopia de RMN, e LC-MS, e armazenados em um freezer ou uma geladeira, evitando-se umidade, luz ou ar. Soluções de consumo de compostos de pró-droga de alquilador de fosforoamidato foram preparados em DMSO e armazenados em

um freezer.

Exemplo 1

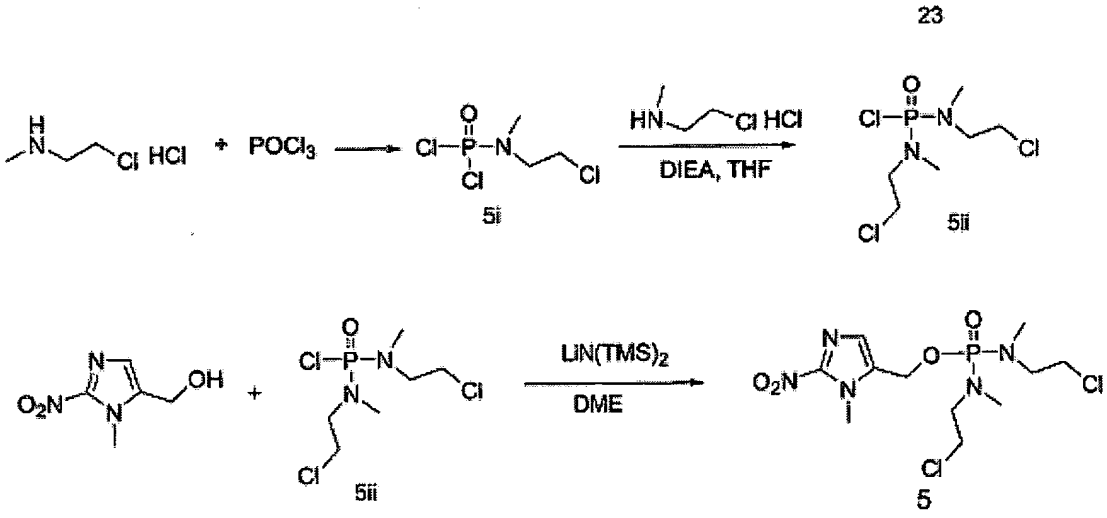
Síntese de Composto 23



A uma solução de álcool de 5-nitrofurfurila (200 mg, 1,4 mmol) em THF (10 ml) a –78°C $POCl_3$ adicionou-se de uma só vez seguido de uma adição por gotejamento de trietilamina (TEA, 0,22 ml, 1,54 mmol). A temperatura foi incrementada a -30°C em uma hora e, depois, adicionou-se cloridrato de 2-cloroetilamina, seguido de TEA (1 ml, 7 mmol). Após a temperatura elevar-se à temperatura ambiente (ta), a reação foi prosseguida durante mais uma hora, a mistura de reação foi extinta com água e a camada orgânica foi separada. A camada aquosa foi extraída com DCM e a solução orgânica combinada foi secada e concentrada. O Composto 23 foi separado por meio de cromatografia de coluna de vaporização instantânea e analisado por meio de espectroscopia de RMN e LC/MS até apresentar-se puro.

Exemplo 2

Síntese de Composto 5



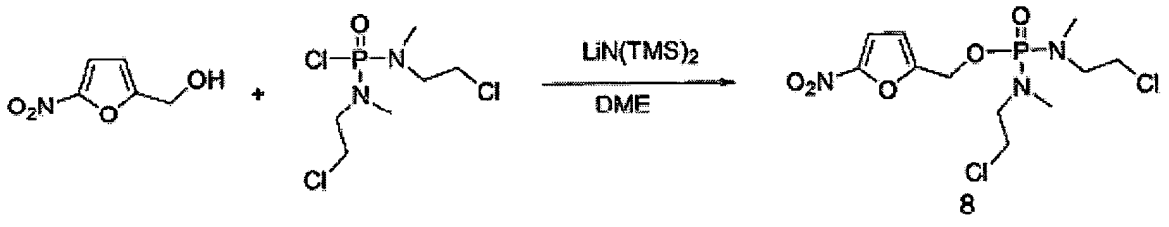
Uma suspensão de N-Metil-2-cloroetilcloreto de amônio (10 g) em $POCl_3$ (40 ml) foi refluxada (135°C) de um dia para o outro. Após se

remover o excesso de $POCl_3$ sob vácuo o produto 5i fiu destilado sob vácuo como óleo amarelo claro e analisado por meio de espectroscopia de RMN ^1H e ^{31}P até apresentar-se puro.

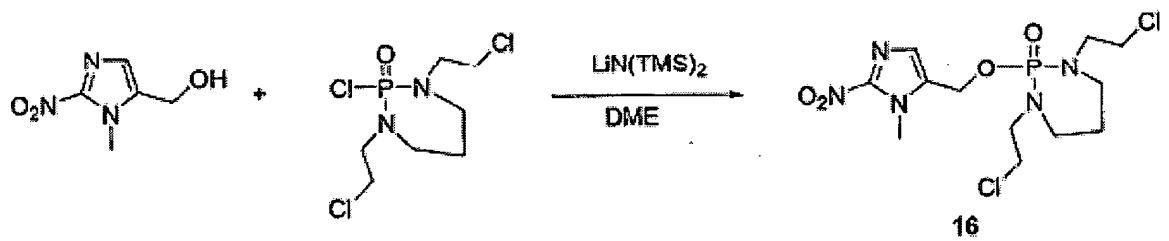
A uma solução de 5i (1 g, 4,75 mmol) e N-Metil-2-cloroetilcloreto de amônio (0,62 g, 4,75 mmol) em THF a –78°C adicionou-se lentamente diisopropiletilamina (DIEA, 1,65 ml, 9,5 mMol) e a mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente. Após agitação à temperatura ambiente durante uma hora, a mistura de reação foi diluída com acetato de etila e lavada com salmoura. A camada orgânica foi secada sobre $MgSO_4$ e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea dando composto 5ii como óleo.

A uma solução de N-metil 2-nitroimidazol-5-metanol (0,5 g, 3,2 mmol) em dimetoxietano (DME) adicionou-se bis(trimetilsilil)amida de lítio (3,2 mmol, 3,2 ml, 1 M em THF) a –78°C. Após 5 min, adicionou-se 5ii (2,9 mmol, 770 mg) e a mistura de reação foi aquecida até –20°C, diluída com acetato de etila e lavada com salmoura. A camada orgânica foi secada sobre $MgSO_4$ e concentrada. Purificação por meio de cromatografia por vaporização instantânea com de 6 a 12% de metanol em DCM deu 5.

Compostos de 8 e 16 foram sintetizados empregando-se o procedimento usado para a preparação de composto 5.



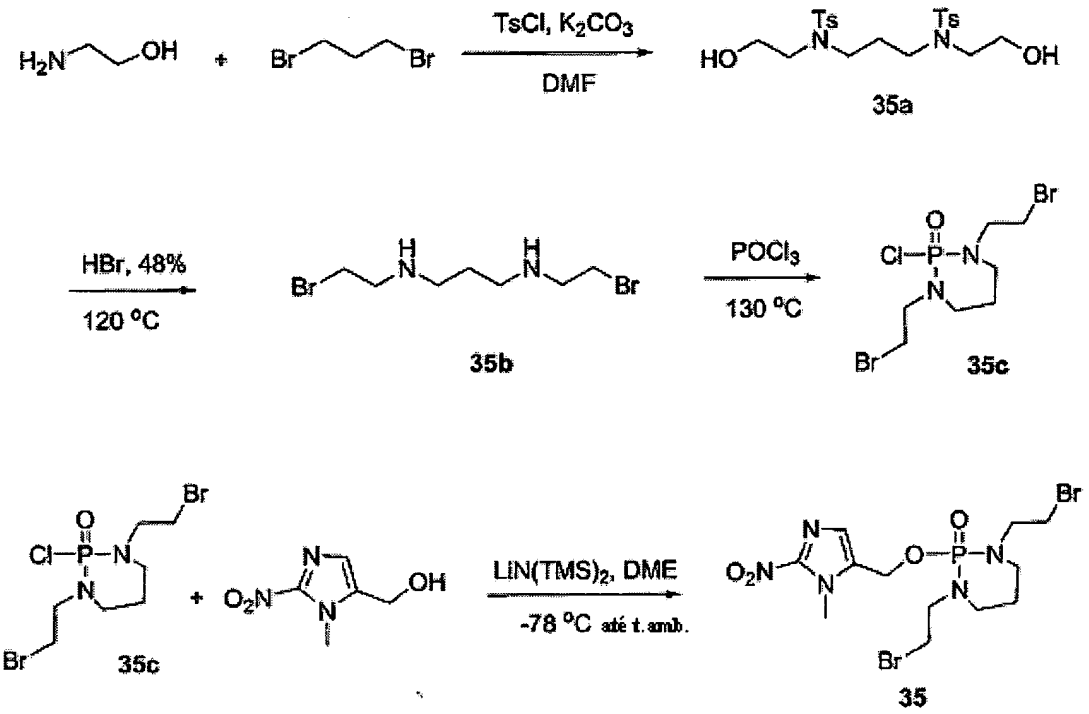
8



16

Exemplo 3

Síntese de Composto 35



A uma solução de etanolamina (6,03 ml, 100 mmol) e K_2CO_3 (13,8 g, 100 mmol) em DMF (38 ml) adicionou-se por gotejamento uma solução de cloreto de p-toluenossulfonila (19 g, 100 mmol) à temperatura ambiente e a mistura de reação foi aquecida até 120°C (temperatura do banho). Adicionou-se K_2CO_3 (27,6 g, 200 mmol) à mistura de reação, seguido da adição por gotejamento de 1,3- dibromopropano (10 g, 50 mmol). Após aquecimento durante mais duas horas, a reação foi resfriada à temperatura ambiente, despejada em água (250 ml), e extraída com acetato de etila. A camada orgânica foi secada com Na_2SO_4 e concentrada dando composto 35a como óleo amarelo que foi usado na reação seguinte.

Uma solução de composto 35a (5 g) em HBr aquoso (48%, 50 ml) foi destilada para remover a porção aquosa (cerca de 20 ml), e a mistura de reação foi refluxada durante 40 h. Porção aquosa adicional (5 ml) foi removida por meio de destilação e a mistura de reação foi refluxada (4 h). A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com água (20 ml), e filtrada através de um tablete de celite. O filtrado foi concentrado à

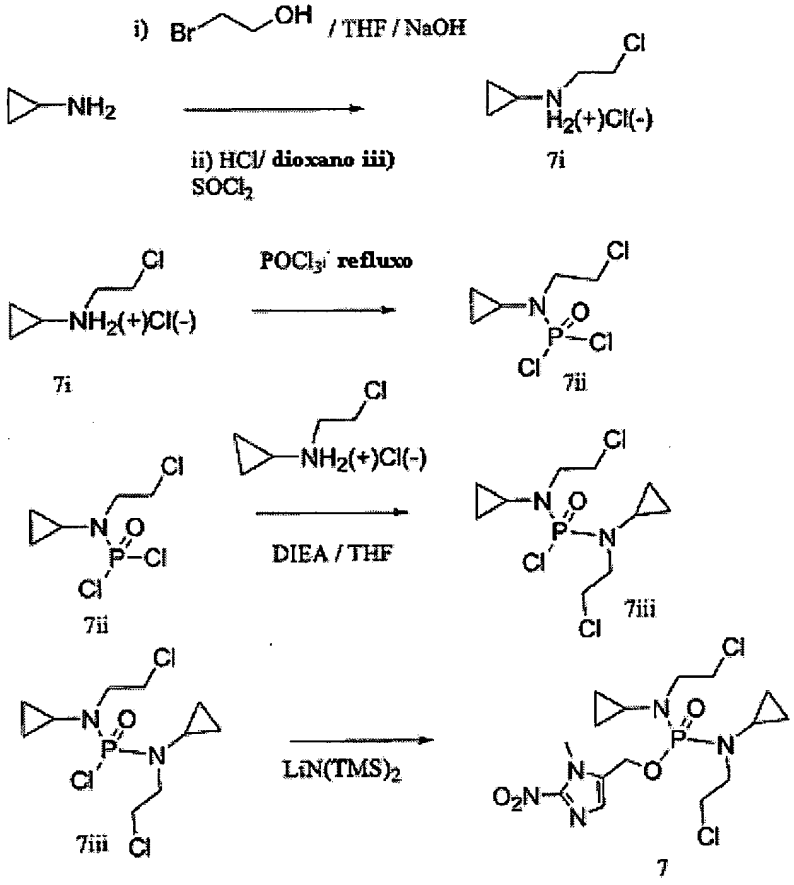
secura dando um resíduo que foi co-evaporado com etanol três vezes, e, após a adição de um grande volume de acetona, um produto sólido branco 35b foi filtrado e lavado com acetona duas vezes e empregado na fosforilação proporcionada abaixo.

Uma suspensão de composto 35b (1 g) em $POCl_3$ (14 ml) foi aquecida a 130°C durante cerca de 14 h e o excesso de $POCl_3$ foi removido sob vácuo a 130°C (temperatura do banho). O resíduo foi purificado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se de 10 a 80% de ETOAc/hexano dando produto 35c que foi convertido a composto 35 da presente invenção empregando-se o mesmo procedimento proporcionado no Exemplo 2 empregando-se, para separação em coluna cromatográfica, sílica-gel e 10-80% de acetona/tolueno como o eluente.

Exemplo 4

Síntese de Composto 7

Composto 7 foi preparado empregando-se N-ciclopropil-2-cloroetilcloreto de amônio como proporcionado abaixo



A uma solução de ciclopropilamina (25g) em THF seco (30 ml) adicionou-se por gotejamento uma solução de 2-bromoetanol (17,6g, 0,141 mol) em 30 ml de THF ao longo de 35 minutos. A mistura de reação foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente, e aquecida a 50°C durante 75 minutos. Após resfriamento, a mistura de reação foi concentrada dando um óleo laranja a que se adicionou uma solução de hidróxido de sódio (7 g) em água (50 ml). A mistura de reação foi agitada durante 10 minutos, e extraída 4 vezes com acetato de etila (75 ml). A camada orgânica combinada foi secada ($MgSO_4$) e evaporada dando um resíduo oleoso laranja. O resíduo foi destilado em vácuo a de 53 a 56°C (1 mm de Hg) dando um álcool intermediário (5,94 g, 42% de rendimento) como um líquido transparente incolor que foi analisado por meio de LC/MS e RMN ^1H até tornar-se puro.

A uma solução do álcool intermediário (3,7 g, 36,6 mmol) em THF seco (30 ml) adicionou-se uma solução de HCl em dioxano (4,0M, 18,3 ml, 73,2 mmol). A mistura de reação foi resfriada a 0°C e adicionou-se $SOCl_2$

(6,50 g, 54,9 mmol) por meio de seringa. A mistura de reação foi refluxada (6 h), resfriada, e concentrada dando um resíduo. O resíduo foi triturado com éter seco (100 ml), filtrado, e voláteis residuais removidos em vácuo dando 7i (5,42 g, 95% de rendimento) que foi analisado por meio de RMN ^1H até estar puro.

7i (3,00 g, 19,2 mmol) foi adicionado a $POCl_3$ (15 ml) e refluxado sob nitrogênio durante 7,5 horas. A mistura de reação foi concentrada e o óleo resultante destilado em vácuo através de um dispositivo de destilação de circuito curto dando 7ii como um óleo amarelo claro transparente (3,6 g, 79% de rendimento) que foi analisado por meio de RMN ^1H até estar puro.

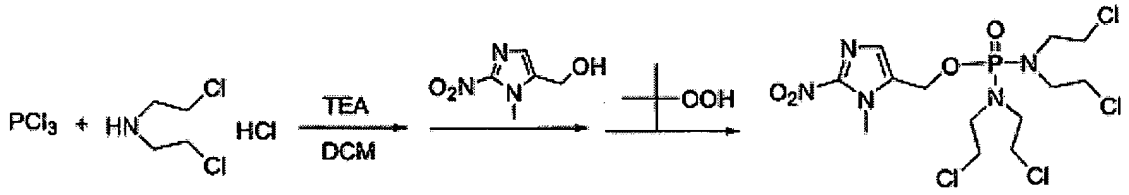
7ii (0.50 g, 2,11 mmol) e cloridrato de N-ciclopropil-2-cloroetilamina (0,33 g, 2,11 mmol) foram combinados em THF seco sob argônio. A mistura de reação foi resfriada a - 78°C e adicionou-se lentamente DIEA (0,545 g, 4,22 mmol) por meio de seringa, aquecida lentamente à temperatura ambiente, agitada durante 1,5 hora e concentrada dando um resíduo oleoso laranja. O resíduo foi separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea sobre sílica usando-se de 0 a 50% de hexano em acetato de etila dando 315 mg (47% da teoria) de óleo amarelo claro que foi analisado como sendo 7iii por meio de MS.

N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (76,8 mg, 0,489 mmol) foi parcialmente dissolvido em THF seco (2 ml) sob argônio. A mistura de reação foi resfriada a -78°C e adicionou-se uma solução de bis(trimetilsilil)amida de lítio em THF (1,6 M, 0,306 ml, 0,489 mmol). Após 15 minutos, adicionou-se uma solução de 7iii (172 mg, 0,538 mmol) em 2 ml de THF. Após 15 minutos a mistura de reação foi aquecida lentamente à temperatura ambiente, agitada durante 2 horas, despejada em 25 ml de água e extraída 3 vezes com acetato de etila (30 ml). As camadas orgânicas combinadas foram secadas sobre $MgSO_4$ e concentradas dando um resíduo oleoso amarelo. O resíduo foi

separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea em de 0 a 10% de metanol em DCM dando composto 7 (110 mg, 51% de rendimento) como um óleo amarelo que foi analisado por meio de LC-MS e RMN ^{1}H até estar puro.

Exemplo 5

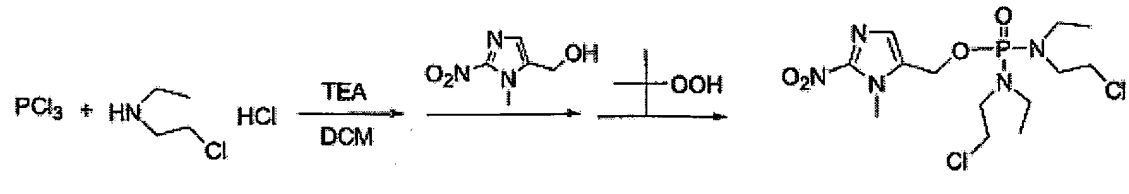
Síntese de compostos 6 e 15



6

A uma suspensão de cloreto de bis(2-cloroetil) de amônio (1,43 g, 8,01 mmol) em diclorometano (DCM) adicionou-se tricloreto de fósforo (0,32 ml, 3,64 mmol) à temperatura ambiente seguido de adição de TEA (3,05 ml, 21,84 mmol). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, depois, adicionou-se N-metil 2-nitroimidazolil metanol (0,474 g, 3,31 mmol) em DME. Após agitação durante 0,5 hora, a mistura de reação foi resfriada a –20°C e adicionou-se hidroperóxido de t-butila (0,7 ml, 3,82 mmol, 5,5 M em Decano). A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente ao longo de um período de uma hora, e despejada em HCl aquoso a 10%. A camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi extraída com DCM. A solução orgânica combinada foi secada com $MgSO_4$ e concentrada dando um resíduo que foi purificado por meio de cromatografia por vaporização instantânea com de 6 a 12% de metanol em DCM dando 6.

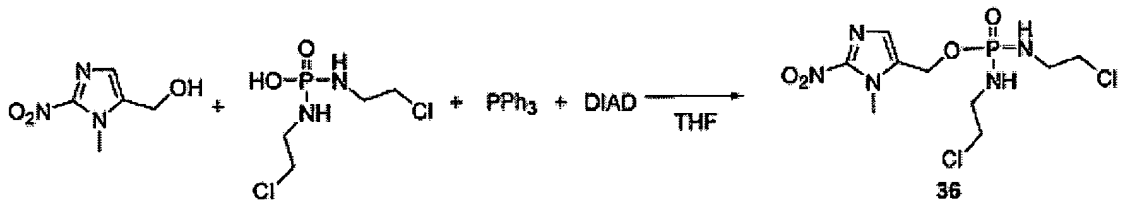
Composto 15 foi sintetizado usando-se o método descrito para a síntese de Composto 6 acima.



15

Exemplo 6

Síntese de compostos 23, 26 e 36

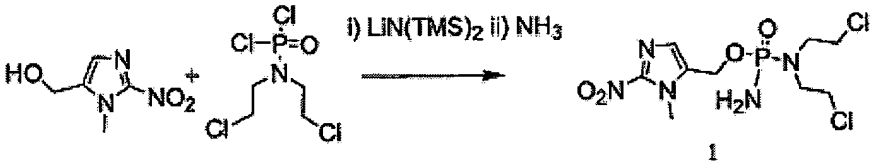


A uma solução de N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (180 mg, 1,14 mmol), trifenilfosfina (300 mg, 1,14 mmol), e mostarda isofosforamida (1c, 127 mg, 0,57 mmol) em THF (10 ml) adicionou-se por gotejamento azodicarboxilato de diisopropila (DIAD, 0,22ml, 1,14 mmol) à temperatura ambiente. Após duas horas a mistura de reação foi concentrada e o resíduo separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea com de 30 a 100% de acetona em tolueno dando composto 36.

Compostos 23 e 26 foram sintetizados empregando-se o procedimento do Exemplo 6.

Exemplo 7

Síntese de Composto 1



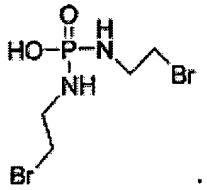
N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (50 mg, 0,318 mmol) foi dissolvido em THF seco (2 ml) sob nitrogênio. A solução foi resfriada a -78°C e adicionou-se com uma seringa uma solução de bis(trimetilsilil) amida de lítio (1M em tolueno, 0,35 ml, 0,35 mmol). Após 5 minutos adicionou-se uma solução de dicloreto de bis(cloroetil) fosforamídico (91 mg, 0,35 mmol) em THF (2 ml). Após agitação a 78°C durante 30 minutos, a temperatura foi reduzida a - 20°C empregando-se um banho de gelo/NaCl e borbulhou-se amônia anidra através da mistura de reação durante 5 minutos. A mistura de reação foi purgada com nitrogênio, aquecida à temperatura ambiente, despejada em 25 ml de água e extraída com acetato de etila (4 x 25 ml). As

camadas orgânicas combinadas foram secadas ($MgSO_4$) e concentradas dando um óleo amarelo claro que foi separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea sobre sílica-gel usando-se de 0 a 10% de metanol em diclorometano dando composto 1 (32 mg, 28% de rendimento) de um óleo que solidificou ao descansar e foi analisado por meio de LC/MS e RMN ^1H até estar puro.

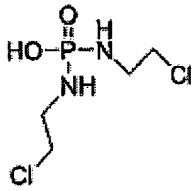
Exemplo 8

Síntese de compostos 25, 26

A uma solução de brometo de 2-bromoetilamônio (19,4 g) em DCM (90 ml) a – 10°C adicionou-se uma solução de $POCl_3$ (2,3 ml) em DCM (4 ml) seguido de adição de uma solução de TEA (14,1 ml) em DCM (25 ml). A mistura de reação foi filtrada, o filtrado foi concentrado a ca. 30% do volume original e filtrado. O resíduo foi lavado com DCM (3x25 ml) e as porções de DCM combinadas concentradas dando um sólido a que se adicionou uma mistura de THF (6 ml) e água (8 ml). THF foi removido em um evaporador rotativo, a solução resultante foi resfriada de um dia para o outro em uma geladeira. O precipitado obtido foi filtrado, lavado com água (10 ml) e éter (30 ml), e secado em vácuo dando 2,1 g de:

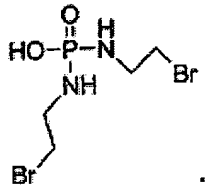


Mostarda isofosforamida



pode ser sintetizada empregando-se o método proporcionado no Exemplo 8, substituindo-se brometo de 2-bromoetilamônio com cloreto de 2-cloroetilamônio. Síntese de Mostarda isofosforamida foi descrita (ver por exemplo, Wiessler *et al.*, acima).

A toxina de alquilador de fosforoamidato:



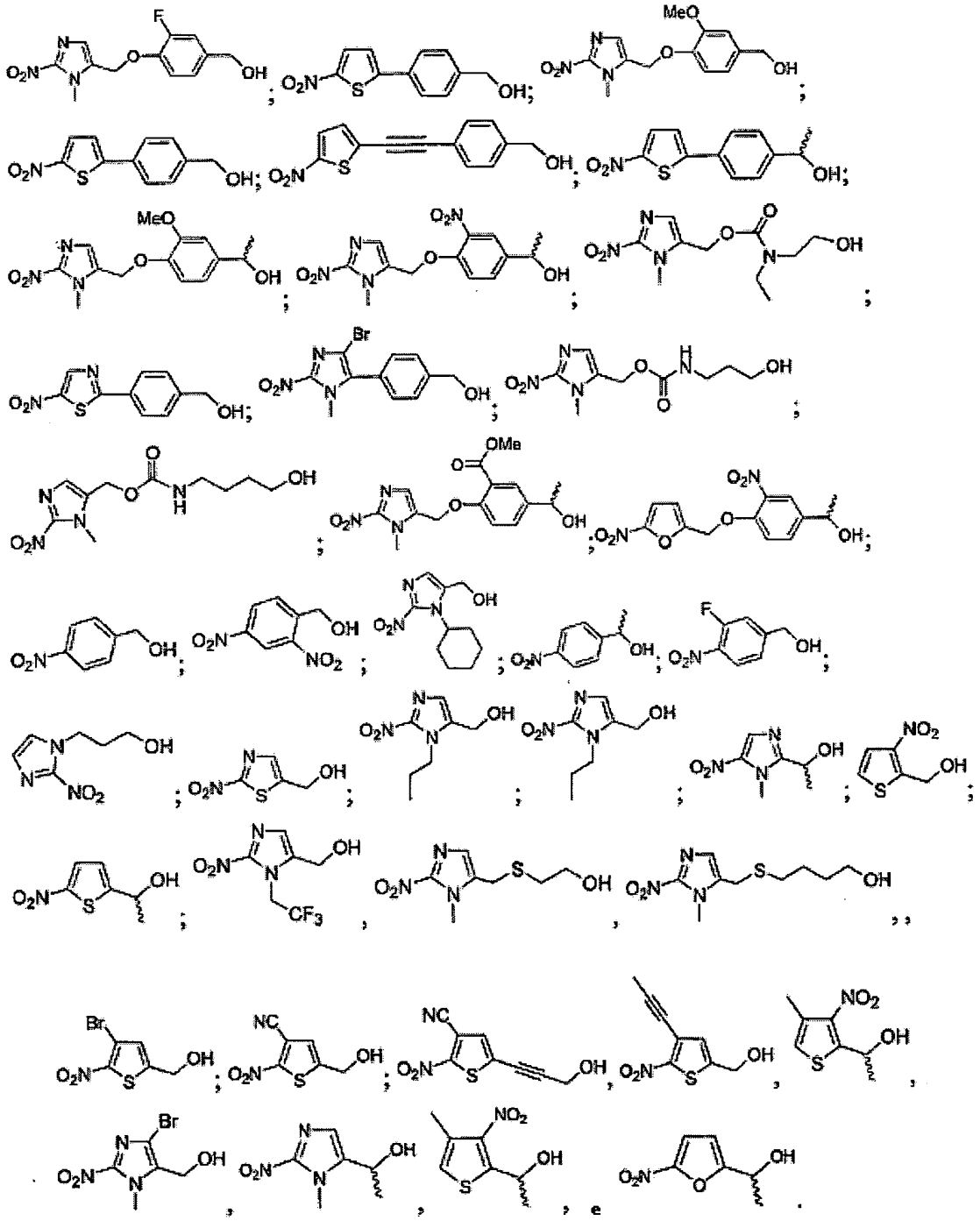
foi transformada em compostos 24 e 25, empregando-se o método proporcionado no Exemplo 6 e o disparador-OH apropriado.

Exemplo 9

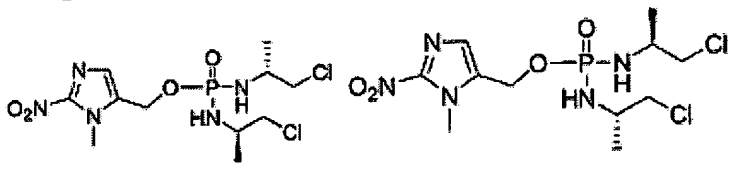
Síntese de compostos 37 – 105

Os compostos de 37 a 105 a seguir foram sintetizados empregando-se o acoplamento de tipo Mitsunobu descrito para a síntese de 25 ou 36 acima, e quando da substituição apropriada do disparador-OH e o análogo de mostarda de ifosfamida empregado. Por exemplo, para a síntese de compostos 40, 81, 83, 87, 89, 95, 96, 100, e 104, o análogo de mostarda de ifosfamida empregado foi $HOP(=O)(NHCH_2CH_2Cl)_2$; em compostos 50, 53, 55, 56, de 58 a 65, de 68 a 71, de 73 a 75, de 77 a 80, 82, de 84 a 86, 88, de 90 a 92, 94, de 97 a 99, de 101 a 103, e 105, o análogo de mostarda de ifosfamida empregada é $HOP(=O)(NHCH_2CH_2Br)_2$; nos compostos 37, 39, 52, 54, e 93, o análogo de mostarda de ifosfamida empregado é o enanciômero R de $HOP(=O)(NHCHMeCH_2Cl)_2$; nos compostos 38, 41, 51, e 57 o análogo de mostarda de ifosfamida empregado é o enanciômero S de $HOP(=O)(NHCHMeCH_2Cl)_2$; nos compostos 43 - 45 e 49 o análogo de mostarda de ifosfamida empregado foi o enanciômero R de $HOPC=O)(NHCH(CHMe_2)CH_2Cl)_2$; e nos compostos de 46 a 48, o análogo de mostarda de ifosfamida empregado foi o enanciômero S de $HOP(=O)(NHCH(CHMe_2)CH_2Cl)_2$.

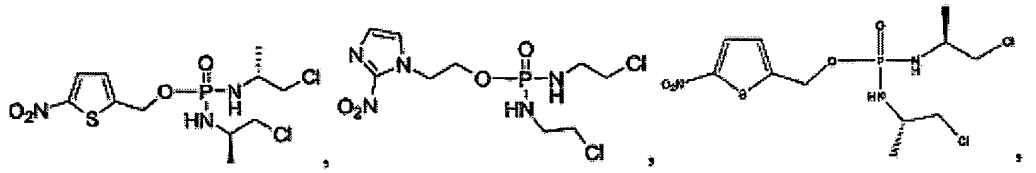
Os vários compostos de disparador-OH empregados na síntese de compostos de 37 a 105, incluíram os seguintes compostos disparador-OH: 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol, 1-N-metil-5-nitroimidazol-2-metanol, 5-nitrofuran-2-metanol, 5-nitrotiofeno-2-metanol;



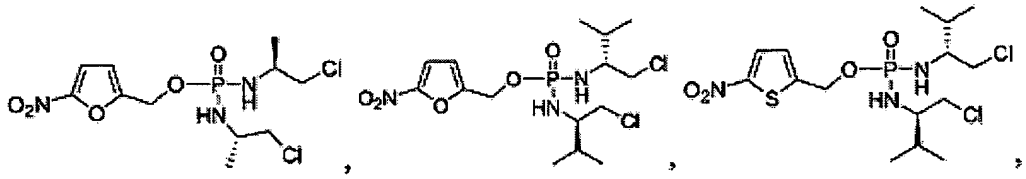
Os compostos a seguir foram de acordo com o método descrito no Exemplo 6.



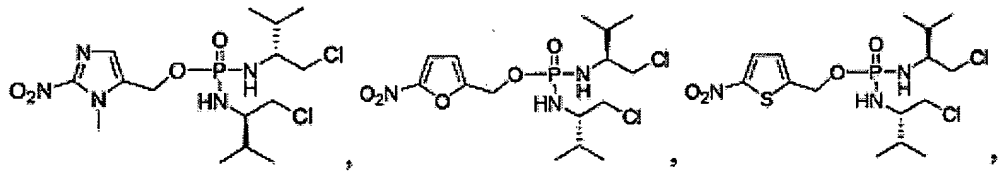
37 , 38



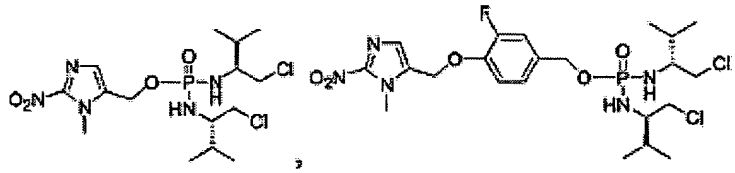
39 , 40 , 41 ,



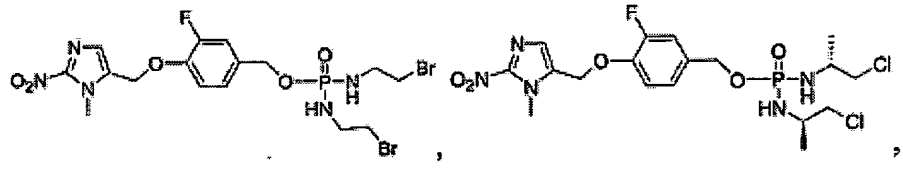
42 , 43 , 44 ,



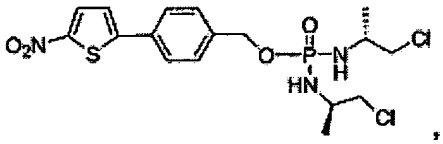
45 , 46 , 47 ,



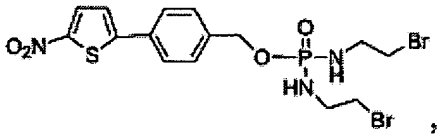
48 , 49



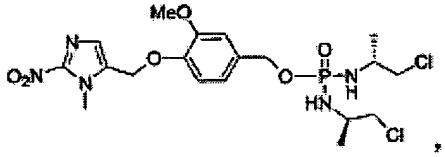
50 , 51 ,



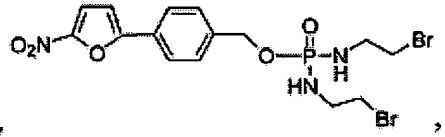
52



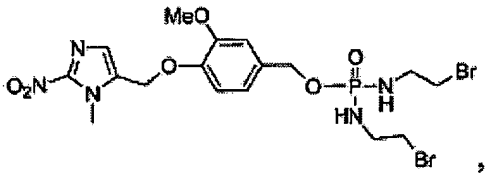
53



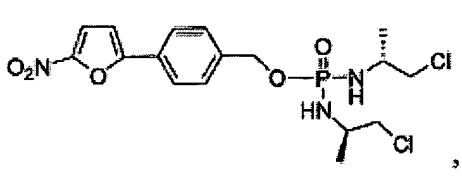
54



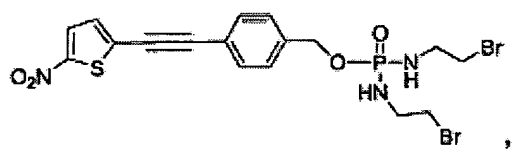
55



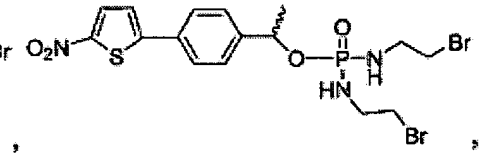
56



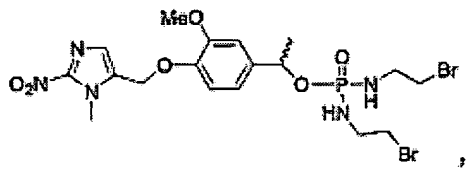
57



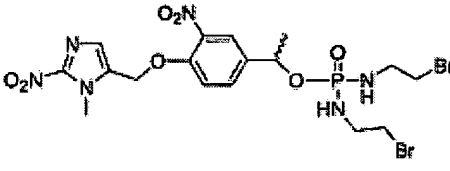
58



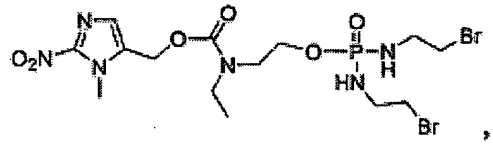
59



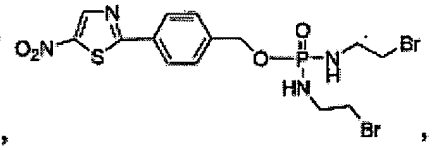
60



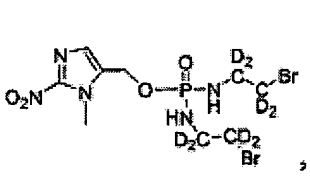
61



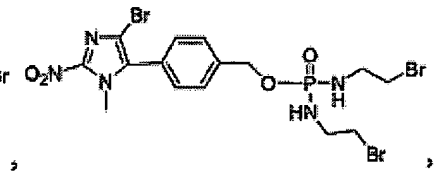
62



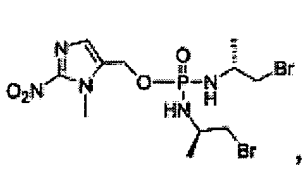
63



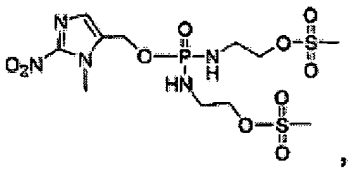
64

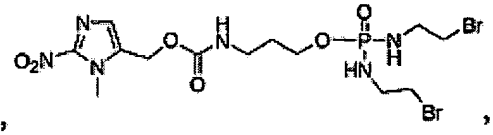


65

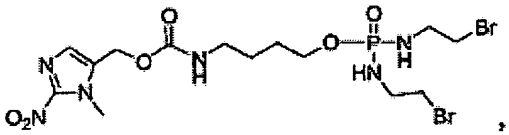


66

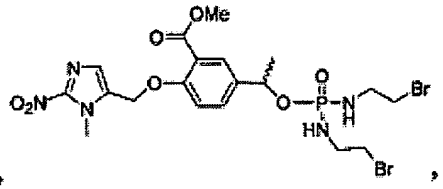




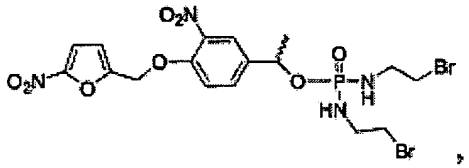
67



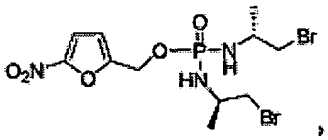
68



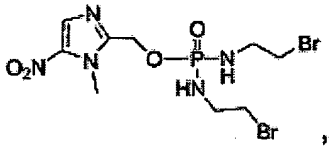
69



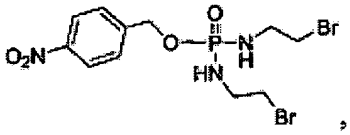
70

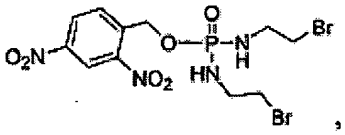


71

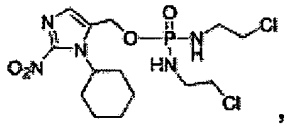


72

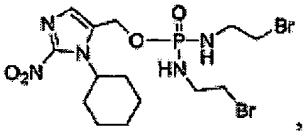




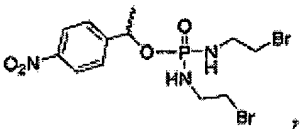
73



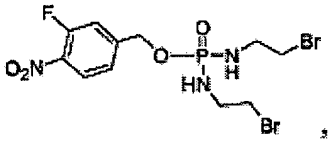
74



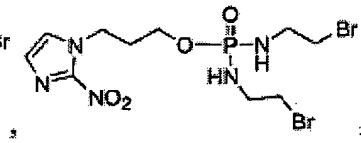
75



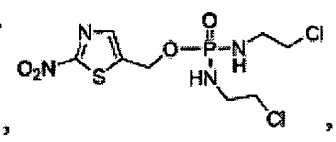
76



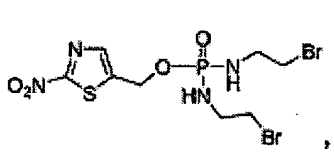
77



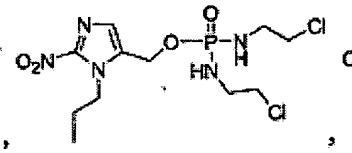
78



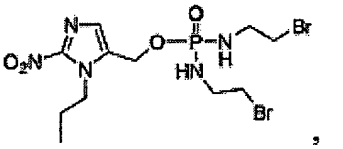
79



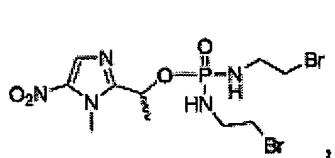
80



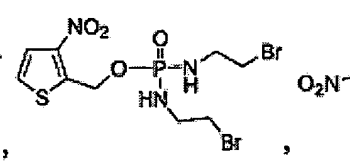
81



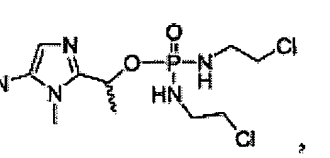
82



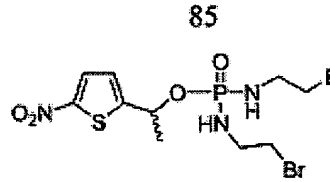
83



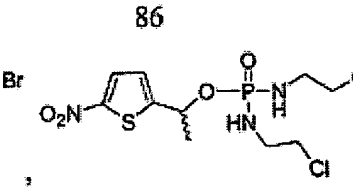
84



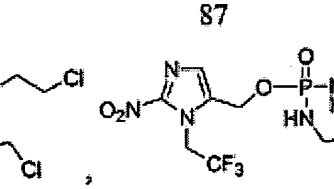
85



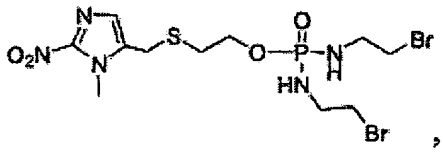
86



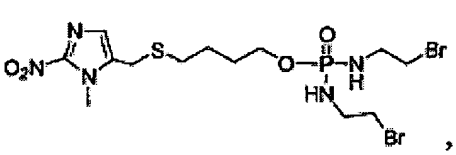
87



88

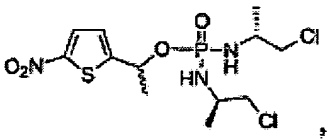


89

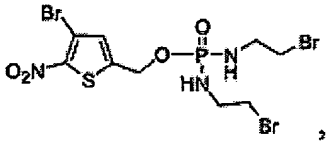


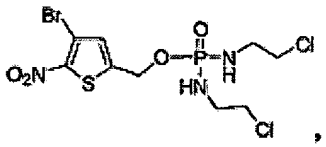
90

91

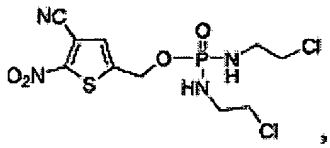


92

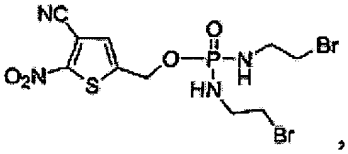




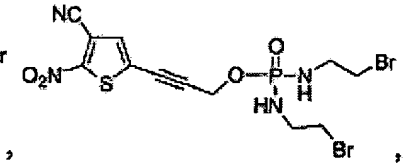
93



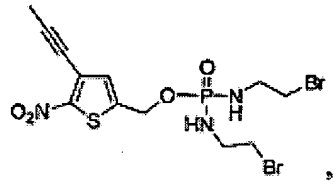
94



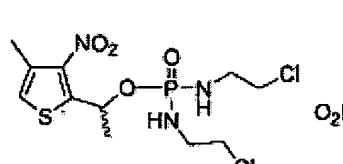
95



96



97

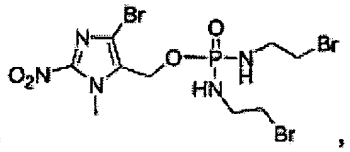


98

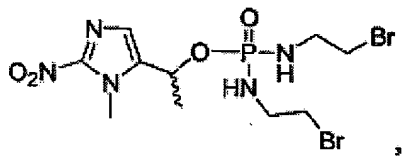
99

100

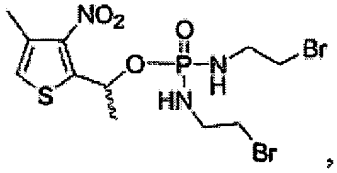
101



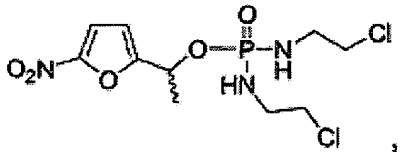
102



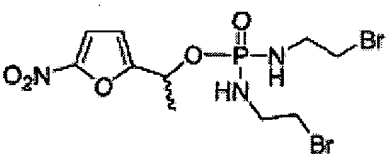
103



104



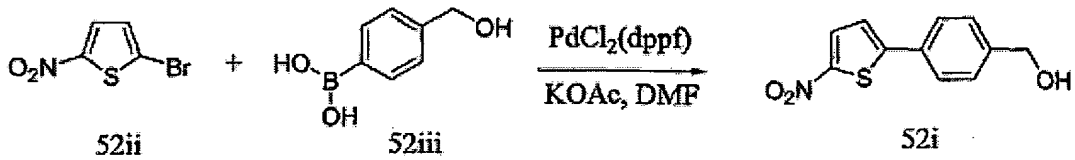
105



Exemplos de 10 a 26 descrevem a síntese de vários compostos de disparador-OH empregados na síntese de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção.

Exemplo 10

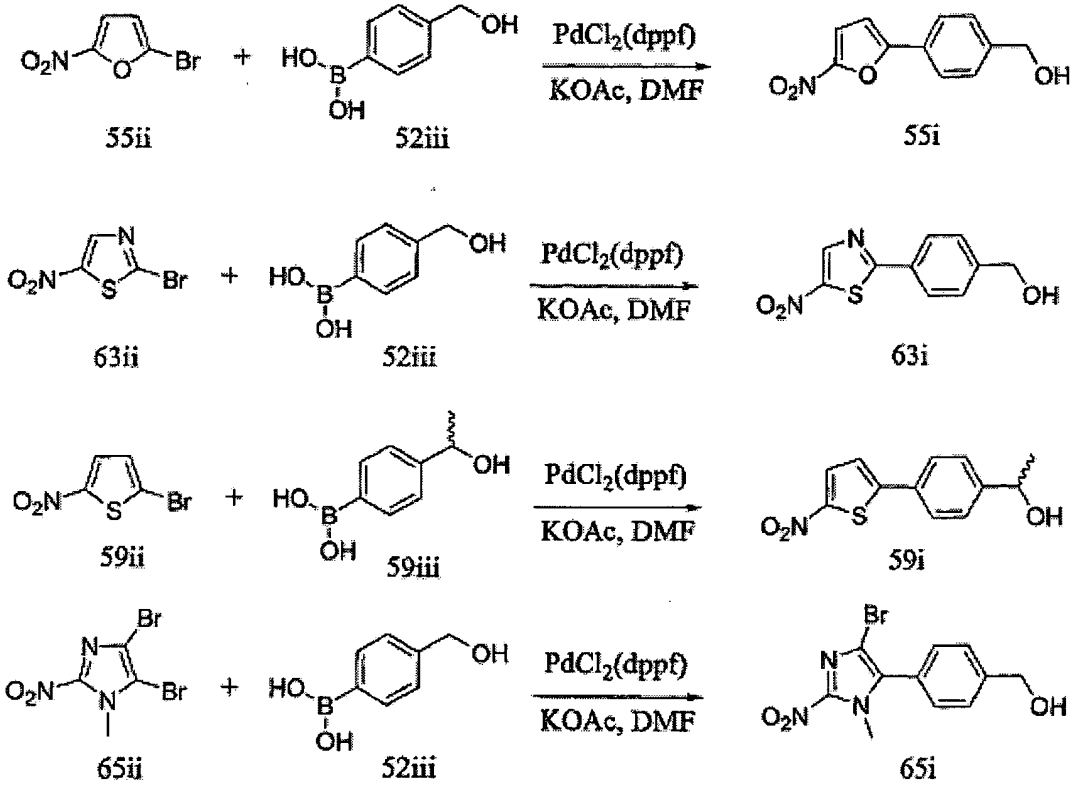
Síntese de Composto 52i



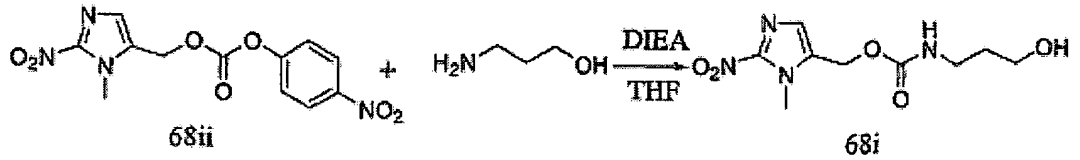
52ii 52iii 52i

Uma solução de composto 52ii (100 mg, 0,48 mmol), 52iii (73 mg, 0,48 mmol), e KOAc (190 mg, 1,92 mmol) em DMF (5 ml) foi desgaseificada três vezes e adicionou-se $PdCl_2$(dppf) (36 mg, 0,048 mmol) a isto à temperatura ambiente sob uma atmosfera de argônio. A mistura de reação foi aquecida a 60^0C durante duas horas, diluída com acetato de etila (EA) e lavada com salmoura. A camada orgânica foi secada, concentrada, e o resíduo separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hex (0 - 80%) dando 52i.

Compostos 55i, 63i, 59i, 65i, e 68i foram preparados de uma maneira similar como descrito esquematicamente abaixo:

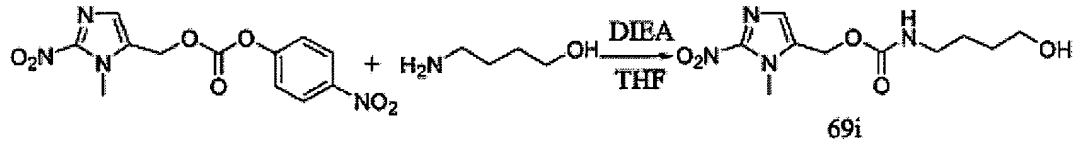


Exemplo 11



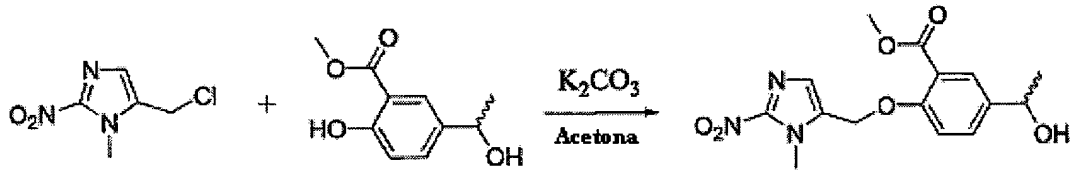
A uma solução de composto 68ii (100 mg, 0,31 mmol) e 3-amino-1-propanol (0,047 ml, 0,62 mmol) em THF (2,5 ml), adicionou-se DIEA (0,162 ml, 0,93 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada de um dia para o outro e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hex (0-80%) dando composto 68i.

Composto 69i foi preparado de forma similar como ilustrado no esquema abaixo.



69i

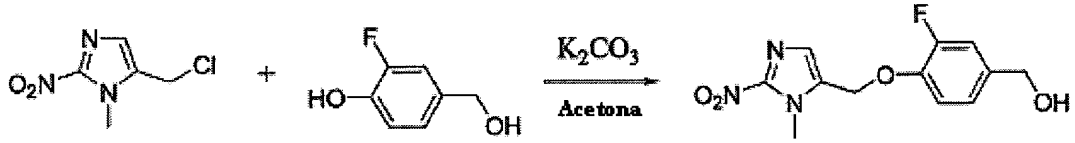
Exemplo 12



70ii 70iii 70i

A uma solução de composto 70ii (100 mg, 0,87 mmol) e composto 70iii (112 mg, 0,87 mmol) em acetona (8 ml), adicionou-se K_2CO_3 (78,6 mg, 0,87 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi aquecida a 60°C com agitação durante 1 h, filtrada, e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se (EA\Hex) de 0 a 60% de rendimento de composto 70i.

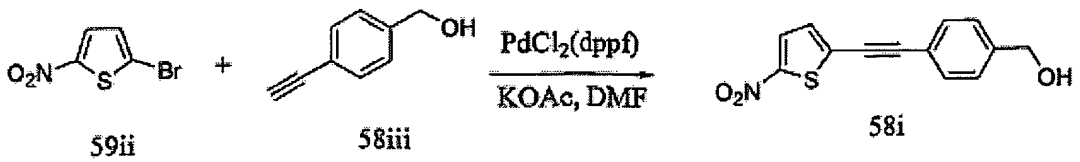
Composto 51i foi preparado de forma similar como ilustrado no esquema abaixo.



70ii 51iii 51i

Exemplo 13

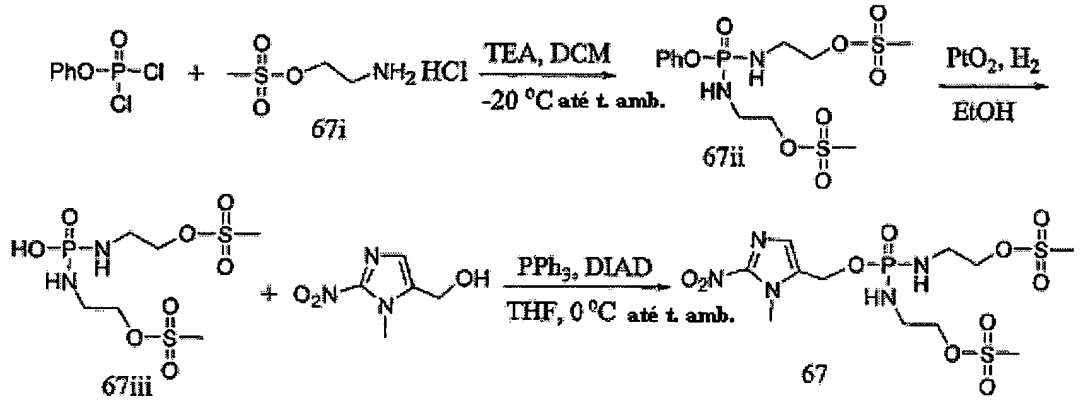
(HAP dispara - verificação #s)



59ii 58iii 58i

Uma solução de composto 59ii (200 mg, 0,96 mmol) e 59iii (127 mg, 0,96 mmol) em DMF (3 ml) foi desgaseificada três vezes e adicionou-se a isto $PdCl_2$(dppf) (50 mg, 0,07 mmol), seguido de CuI (8,5 mg, 0,043 mmol) e TEA (0,27 ml, 1,92 mmol), à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio e a mistura de reação foi aquecida a 60 °C durante duas horas. A mistura de reação foi diluída com EA, lavada com salmoura, a camada orgânica separada, secada, e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA\Hex (0-70%) dando composto 58i.

Exemplo 14



67i 67ii 67iii 67

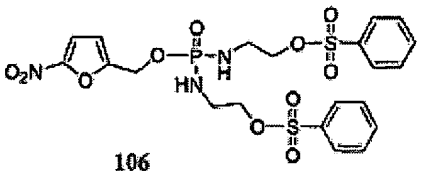
A uma suspensão de 67i (472 mg, 2,69 mmol) em DCM (20 ml) adicionou-se fenildiclorofosfato (0,2 ml, 1,34 mmol) a –20°C, seguido de adição por gotejamento de TEA (0,75 ml, 5,38 mmol) e agitação. A mistura de reação foi aquecida até à temperatura ambiente, agitada à temperatura ambiente durante 1 h, despejada em salmoura, a camada orgânica foi separada, e a camada aquosa foi extraída com DCM. As camadas orgânicas combinadas foram secadas com $MgSO_4$ e concentradas. O resíduo foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se eluente EA/hexano (de 10 a 100%) dando composto 67ii. A uma solução de composto 67ii (42 mg) em EtOH (5 ml) adicionou-se óxido de platina(IV) (20

mg), a mistura de reação foi desgaseificada, e agitada vigorosamente sob hidrogênio durante 0,5 h. A mistura de reação foi diluída com MeOH, filtrada através de um filtro de seringa, o filtrado foi concentrado sob vácuo e coevaporado com tolueno dando composto 67iii. Composto 67iii foi reagido com 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol empregando-se uma reação de tipo Mitsunobu como descrito para a síntese de Composto 36.

Exemplo 15

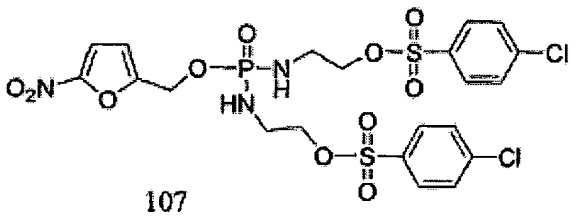
Síntese de compostos 106 e 107





106

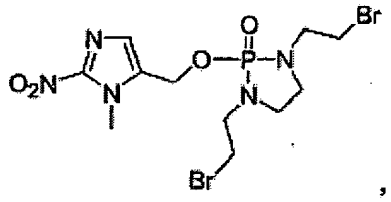
A uma solução de álcool de 5-nitrofurfurila (200 mg, 1,4 mmol) em THF (10 ml) adicionou-se $POCl_3$ (0,13 ml, 1,4 mmol) a –78°C, seguido de adição por gotejamento de TEA (0,216 ml, 1,54 mmol). A temperatura de reação foi elevada até –10°C em 1 h, adicionando-se a isto cloridrato de 2- (fenilsulfonil)etilamina (832 mg, 3,5 mMol), seguido de adição de TEA (1 ml, 7 mmol). A reação foi aquecida à temperatura ambiente, agitada durante 1 h, extinta com água e a camada orgânica separada. A camada aquosa foi extraída com DCM duas vezes, as camadas orgânicas combinadas foram secadas, concentradas dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente acetona\tolueno (de 30 a 100%) dando produto 106, Composto 107:



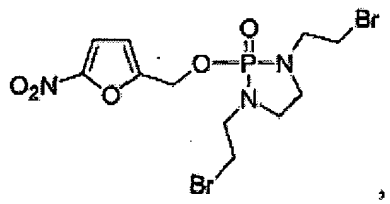
107

foi sintetizado usando-se um método similar.

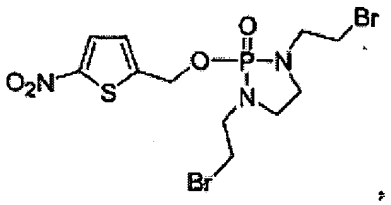
Compostos de 108 a 112, mostrado abaixo:



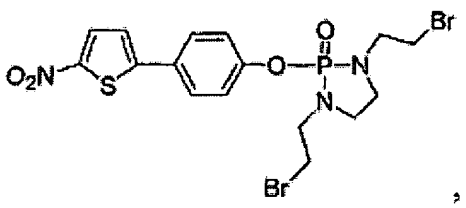
108



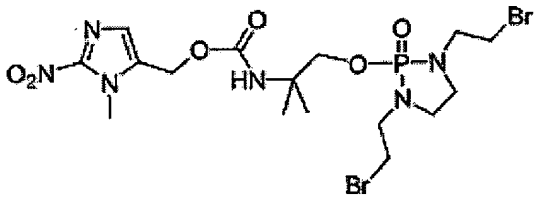
109



110



111



112

foram sintetizados empregando-se o procedimento descrita para a síntese de composto 35 no Exemplo 3 e substituindo

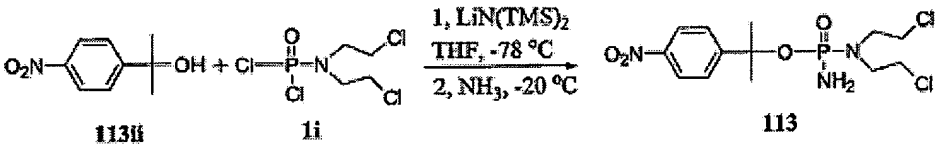


com



Exemplo 16

Síntese de compostos de 113 a 117

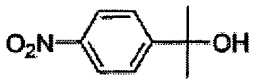


113ii 1i 113

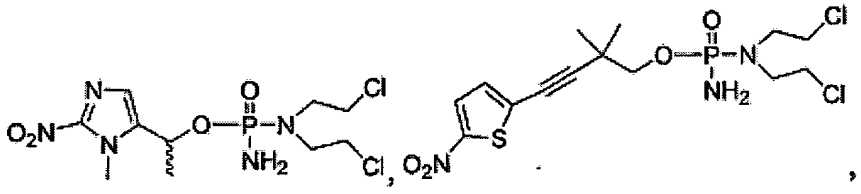
Composto 113 foi sintetizado seguindo-se um procedimento descrito no Exemplo 7 como descrito aqui. A uma solução de 113ii (181 mg, 1,16 mmol) em THF (8 ml) adicionou-se por gotejamento $LiN(TMS)_2$ (1,2 ml, solução 1 M de THF, 1,2 mmol) a -78 °C, seguido de adição de 1i. A

mistura de reação foi aquecida até –20°C e borbulhou-se NH_3 através da mistura de reação durante 5 minutos. Adicionou-se água (20 ml) à mistura de reação e a mistura de reação extraída três vezes com EA (30ml). As camadas orgânicas combinadas foram secadas e concentradas dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se acetona\tolueno (30-100%) dando composto 113.

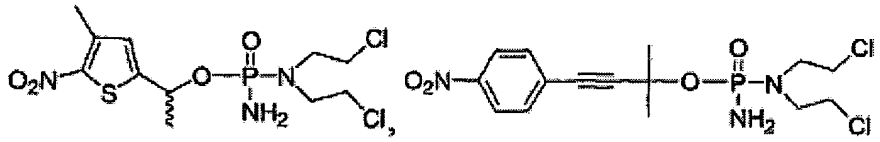
Compostos de 114 a 117 foram sintetizados de acordo com o método descrito para Composto 13 e substituindo-se



pelo disparador-OH apropriado como material de partida.



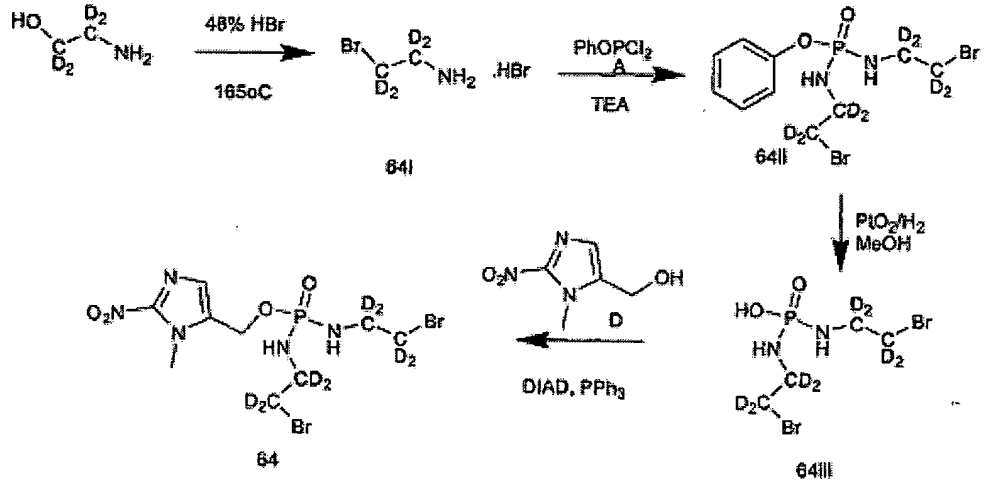
114 115



116 117

Exemplo 17

Síntese de ifosfamida octadeuterada e Composto 64 (Composto 25 octadeuterado)



Adicionou-se por gotejamento 48% de HBr (60 ml) a d_4-

etanolamina a 0°C. A mistura de reação foi agitada durante 1 h à temperatura ambiente e, depois, cuidadosamente refluxada e lentamente destilada, em que se coletou 16 ml de líquido em 2 h até 155°C (banho de óleo). Isto foi substituído duas vezes com 60 ml de HBr a 48% e a destilação continuou durante mais 5 h. Coletou-se 90 ml de líquido. A solução resultante foi aquecida a 165°C durante 2 h e evaporada sob vácuo. O resíduo foi recristalizado de um etol absoluto (10 ml)-acetato de etila (30 ml) a 11,3 g de bromidrato de d_4-2-bromoetamina (composto 64i). Composto 64i (19,5 mMol, 1,0 eq.) foi adicionado por gotejamento a uma suspensão de bromidrato de d_4-2-bromoetamina (40,0 mmol, 2,05 eq.) em DCM seco (100 ml) sob argônio a –20°C, seguido de adição por gotejamento de TEA (81,9 mmol, 4,2 eq.) a –20°C. A mistura de reação foi agitada a –20°C durante 0,5 h, e à temperatura ambiente durante 2 h, despejada em água, e extraída duas vezes com DCM (30 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre Na_2SO_4, e concentradas sob pressão reduzida dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente Hexano/EA (100:70(vol/vol)) dando 7,0 g de composto 64ii. PtO_2 (0,7 g) foi adicionado a uma solução de composto 64ii (7,0 g) em MeOH (160 ml), a mistura de reação foi desgaseificada e trocada por H_2 três vezes, agitada sob H_2 durante 3 h à temperatura ambiente, e diluída com MeOH até que o sólido branco na mistura de reação se dissolvesse. A mistura de reação diluída foi filtrada, o filtrado concentrado sob pressão reduzida dando um resíduo que foi lavado com éter anidro duas vezes dando 2,9 g de composto 64iii.A uma suspensão de compostos 64iii (1,92 g 1,0 eq.), 1-N-metil-2-nitroimidazolemetanol (1,01 g, 1,1 eq.), e PPh_3 (2,39 g, 1,5 eq.) em THF (20 ml) adicionou-se DIAD (1,76 ml, 1,5 eq.), sob argônio, a 0°C. A mistura de reação foi agitada durante 2 horas enquanto era aquecida de 0°C à temperatura ambiente, após o que os voláteis foram removidos sob vácuo dando um resíduo. O resíduo foi

separado por meio de cromatografia por vaporização instantânea em sílica-gel empregando-se como eluente Acetona/Tolueno (100:70 (vol/vol)) dando 1,35 g de composto 64.

Exemplo 18

Síntese de Composto 2i

2ii 2iii 2i

O derivado de vinila, 2iii, foi sintetizado de acordo com a referência Cavalleri *et al.*, *J. Het. Chem.*, 1972, 9: 979, e oximercurados como a seguir. $Hg(OAc)_2$ (208 mg, 0,653 mmol) foi dissolvido em água (0,7 ml) e THF (0,7 ml), seguido de adição de composto 2iii (100 mg, 0,653 mmol). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 1,5 h, adicionou-se $NaBH_4$ (25 mg) em porções, e, após agitação durante 15 min, a reação foi despejada em água, extraída com EA, a camada de EA foi secada e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hexano (de 0 a 100%) dando composto 2i (16 mg).

Exemplo 19

Síntese de Composto 94i

94iii 94ii 94i

Uma solução de 94iii (7,1 g) em Ac_2O (9,7 ml) foi adicionada por gotejamento em uma solução de ácido nítrico fumegante (1,5 ml) foi adicionada em AcOH (12 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente, agitada durante 1 h, adicionou-se ácido nítrico fumegante (1 ml) por gotejamento em agitou-se durante 1,5 h. A mistura de reação foi despejada em água, extraída com EA, a camada de EA foi secada e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hexano (de 0 a 100%) dando composto 94ii. Composto 94ii (600 mg, 1,77 mmol) foi suspenso em metanol (10 ml) a 0°C seguido de adição de $NaBH_4$ (141 mg) em porções em

uma mistura de reação ao longo de 5 min. Adicionou-se $NaBH_4$ (100 mg) uma vez a cada hora por três vezes, a mistura de reação foi agitada durante 3,5 h, despejada em água, extraída com EA, a camada de EA foi secada e concentrada dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hexano (de 0 a 100%) dando composto 94i (289 mg) como um sólido amarelo.

Exemplo 20

Síntese de Composto 96i

96ii 96iii 96i

Uma mistura de A (1,4 g), CuCN (0,56g) e DMF (25 ml) foi agitada a 140°C durante 35 min e em 300 ml de gelo quebrado e agitada durante 10 min. A mistura de reação foi então filtrada e o resíduo foi separado por meio de cromatografia de coluna empregando-se como eluente Hexano:EA (de 1:0 a 2:3) dando composto 96iii como óleo amarelo (617 mg). Composto 96iii foi convertido a álcool 96i e separado por meio de cromatografia de coluna, seguindo-se um método similar conforme empregado para o composto 94iii em e usando-se THF em lugar de MeOH como solvente na reação.

Exemplo 21

Síntese de Composto 99i

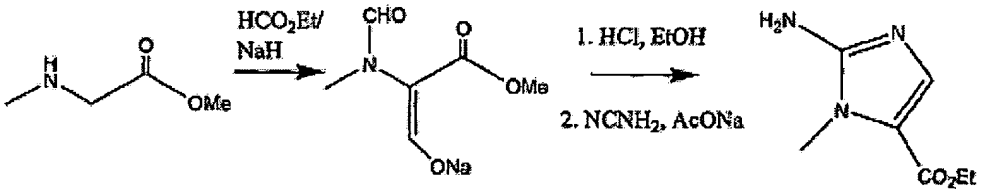
99ii 99iii 99i

Uma mistura de 99ii (500 mg), $PdCl_2(PPh_3)_2$ (208 mg), e CuI (56,4 mg) foi suspensa em TEA (15 ml), a mistura de reação foi desgaseificada e enxaguada com Ar 6 vezes cada um. Borbulhou-se propino através da mistura de reação durante 15 min, e a reação foi continuada sob uma atmosfera de propino a uma temperatura do banho de 50°C durante 2 h. A mistura de reação foi despejada em EA, filtrada, o filtrado concentrado dando um resíduo que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/Hexano (de 0 a 100%) dando

composto 99i (286 mg).

Exemplo 22

Síntese de 1 um etil éster do ácido N-metil-2-amino imidazol-5-carboxílico

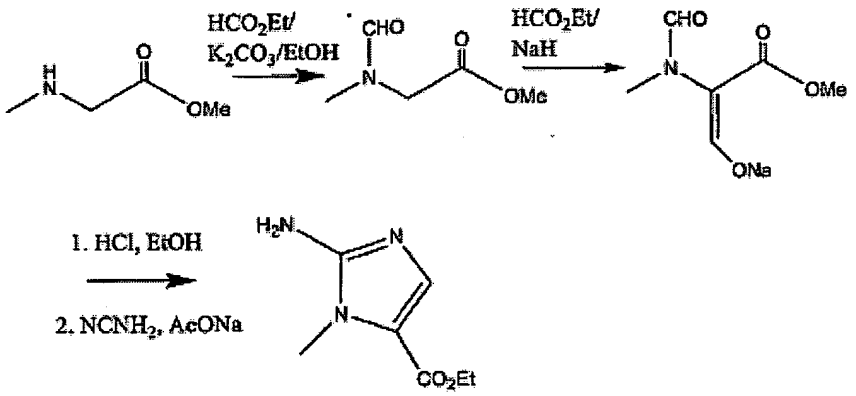


Adicionou-se formiato de etila (500 ml) a cloridrato de metil éster de sarcosina (82 g, 585,7 mmol, moído a pó antes da reação) contido em um frasco de fundo redondo com volume de 1 litro. A mistura de reação foi resfriada em um banho de gelo e água, agitada, uma saída de gás foi conectada ao frasco, adicionando-se NaH (suspensão de óleo a 60%, 54 g, 1,35 mol) durante um período de 2 h, e isto foi agitado à temperatura ambiente durante cerca de 14 h. Voláteis foram removidos usando-se um evaporador rotativo dando um resíduo que foi triturado duas vezes com hexano (500 ml) dando uma pasta marrom clara pegajosa que foi dissolvida em etanol (400 ml) e HCl conc. (50 ml) e isto foi agitado a 110°C durante 1,5 h. Após a mistura de reação resfriar, o precipitado branco foi removido por filtração e o resíduo foi lavado com 2 x 25 ml de etanol. O filtrado foi evaporada dando um óleo castanho espesso a que se adicionou HOAc aquoso a 10%, H2NCN (45 g, 1,07 mol), e acetato de sódio (88 g, 1,07 mol). A mistura de reação foi agitada a uma temperatura de 90 a 100°C durante 1,5 h dando uma solução transparente que foi resfriada, seu pH ajustado em 1 usando-se HCl concentrado, e a solução resultante foi concentrada a 1/5 de seu volume original usando-se um evaporador rotativo a uma temperatura não acima de 45°C. A mistura de reação concentrada foi neutralizada cuidadosamente por meio de adição de K_2CO_3 a um pH de 8 a 9 e extraída com EA (5 x 200 ml seguido de 3 x 50 ml). As camadas de acetato de etila combinadas foram secadas sobre $MgSO_4$, filtradas, e os voláteis foram removidos dando 48 g de etil éster do ácido 1-N-metil-2-amino imidazol-5-

carboxílico.

Exemplo 23

Síntese de etil éster do ácido 1-N-metil-2-amino imidazol-5-carboxílico



Adicionou-se formiato de etila (850 ml) a sal de HCl de metil éster de sarcosina (205 g, 1,46 mol, moído a pó antes do uso), carbonato de potássio (205 g, 1,48 mol), e EtOH (800 ml,), em que isto foi agitado de um dia para o outro à temperatura ambiente, e filtrado. O filtrado foi concentrado em um evaporador rotativo durante o qual o resíduo foi separado em duas camadas. A camada superior foi separada e a camada inferior foi extraída com EA. Camadas de EA combinadas e a camada superior foi secada sobre $MgSO_4$, filtrada, e concentrada dando 185 g (81%) de metil éster de N-formil sarcosina que foi usado para a reação a seguir. NaH (suspensão de óleo a 60%, 16,0 g, 0,4 mol) foi adicionado cuidadosamente em várias porções, em 1 h, a uma mistura de metil éster de N-formil sarcosina (50 g, 0,34 mol) e formiato de etila (160 ml) resfriado em um banho de gelo-água. A mistura de reação foi agitada, a temperatura foi elevada à temperatura ambiente, e a agitação continuou de um dia para o outro. A mistura de reação foi triturada duas vezes com hexano (100 ml a cada vez), o resíduo foi dissolvido em EtOH (100 ml) e HCl concentrado (60 ml), e a mistura de reação foi agitada a 110°C. Após 1 h, a mistura de reação foi resfriada, filtrada, o resíduo foi lavado com EtOH e o filtrado concentrado dando um óleo castanho espesso. O óleo foi adicionado a 10% de HOAc em água (200 ml), NH_2CN (35 g) e acetato de sódio (90 g), agitado a 95°C. Após 1 h a mistura de reação foi

concentrada ao 1/3 de seu tamanho original em um evaporador rotativo e seu pH foi ajustado em cerca de 9 por meio de adição de carbonato de sódio. A mistura de reação foi então extraída com EA (8 x 100 ml), as camadas de EA combinadas foram secadas, filtradas, e concentradas dando um resíduo que foi purificado por meio de recristalização dando etil éster do ácido 1-N-metil-2-amino imidazol-5-carboxílico ("aminoéster").

Exemplo 24

Síntese de etil éster do ácido 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-carboxílico



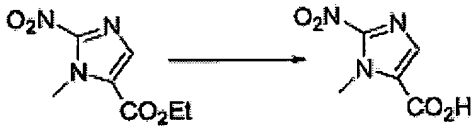
Uma solução do aminoéster (36,94 g, 0,218 mol) em 200 ml de ácido acético foi adicionada por gotejamento a uma solução de nitrito de sódio (100 g, 1,449 mol) e água (300 ml) resfriada em um banho de gelo-água, e isto foi agitado. A temperatura da mistura de reação, que foi medida como estando em torno de -5 a 10°C, foi elevada à temperatura ambiente e que a mistura de reação foi agitada de um dia para o outro. A mistura de reação foi extraída com DCM (3 x 150 ml). As camadas de DCM combinadas foram secadas e evaporadas dando um resíduo avermelhado que foi separado por meio de cromatografia de coluna em sílica-gel empregando-se como eluente EA/hexano (30%) dando etil éster do ácido 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-carboxílico ("nitro éster") como um sólido castanho claro (27 g, rendimento de 62%).

Este método descrito no Exemplo 24 e empregando ácido acético aquoso é um aperfeiçoamento do método usando-se cerca de 7% de ácido sulfúrico (vol/vol) para a formação do íon diazônio a partir do aminoéster. Usando-se ácido sulfúrico aquoso, um volume de reação torna-se grande causando dificuldade de agitação da mistura de reação de maneira eficaz. Por exemplo, uma reação envolvendo 150 g do aminoéster exigiu um

volume da mistura de reação de cerca de 12 l. O nitro éster pegajoso formou-se como produto em ácido sulfúrico aquoso e interrompeu a agitação da mistura de reação.

Exemplo 25

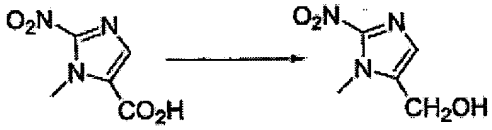
Síntese de ácido 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-carboxílico



Uma suspensão do nitro éster nitro éster (39,2 g, 196,9 mmol) em NaOH 1N (600 ml) e água (200 ml) foi agitada à temperatura ambiente durante cerca de 20 h dando uma solução castanha clara transparente. O pH da mistura de reação foi ajustado em cerca de 1 por meio de adição de HCl conc. e a mistura de reação foi extraída com EA (5 x 150 ml). As camadas de acetato de etila combinadas foram secadas sobre $MgSO_4$ e concentradas dando ácido 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-carboxílico ("nitro ácido") como um sólido castanho claro (32,2 g, 95%).

Exemplo 26

Síntese de ácido 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-carboxílico



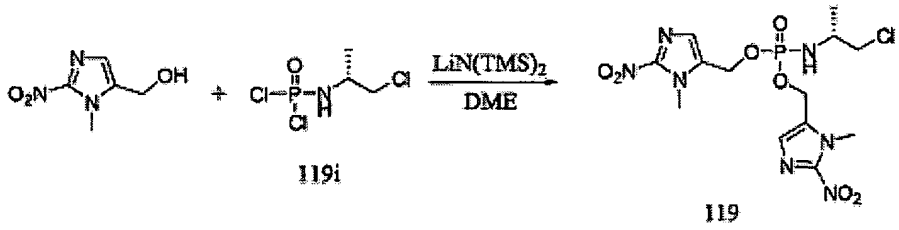
Uma mistura do nitro ácido (30,82 g, 180,23 mmol) e trietilamina (140 ml, 285 mmol) em THF anidro (360 ml) foi agitada enquanto que a mistura de reação foi resfriada em um banho de acetonitrila-gelo seco (temperatura < -20 °C). Adicionou-se por gotejamento cloroformiato de isobutila (37,8 ml, 288 mmol) a esta mistura de reação resfriada durante um período de 10 min e agitada durante 1 h seguido de adição de boroidreto de sódio (36 g, 947 mmol) e adição por gotejamento de água durante um período de 1 h enquanto se mantinha uma temperatura em torno de ou inferior a 0°C. A mistura de reação foi aquecida até 0°C. O sólido foi removido por filtração e lavado com THF. As porções de THF

combinadas foram evaporadas dando 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol como um sólido laranja (25 g) que foi recristalizado de acetato de etila.

Exemplo 27

Síntese de Composto 119

A uma suspensão de 1-N-metil-2-nitroimidazol-5-metanol (50 mg, 0,32 mmol) em DME, adicionou-se $LiN(TMS)_2$ a –78°C, com agitação vigorosa. Após 10 min, adicionou-se o composto 119i (67 mg, 0,32 mmol) e a mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente. Após 1 h, a mistura de reação foi concentrada e o resíduo foi separado por meio de cromatografia em sílica-gel (de 0 a 100% de acetona/tolueno) dando Composto 119.



119i

119

Exemplos de 28A a 28V

Compostos de 134 a 155 foram sintetizados empregando-se o fosforoamidato substituído correspondente e disparador (disparador-OH) substituído por hidróxi, de acordo com os procedimentos descritos nos Exemplos de 1 a 27 acima.

Exemplo 29A

A solubilidade dos compostos a seguir são listados abaixo:

Composto	Solubilidade (em solução salina à temperatura ambiente)
10	10 mg/ml
25	15 mg/ml
73	10 mg/ml
155	<1 mg/ml

Exemplo 29B

Ensaio de anti-proliferação

Para determinar o efeito de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato sobre a proliferação de células, testou-se a atividade antiproliferativa destes compostos em um ensaio à base de azul Alamar em

múltiplos poços. O crescimento celular na presença e ausência do composto de teste foi comparado, conforme medido por meio de uma leitora de placas com fluorescência a excitação de 550nm e emissão de 590 nm (ver Biosource International Inc., Tech Application Notes, *Use of Alamar Blue in the measurement of Cell viability and Toxicity*, Determining IC_{50}). A linhas de células a seguir foram testadas com 20.000 células/poço/500 µl de meio: células NCI-H460 (ATCC HTB-177, meio RPMI (Gibco Products, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)), células HT29 (ATCC HTB- 38, meio RPMI (Gibco)), células MES-SA (ATCC CRL- 1976, meio de McCoy 5a (ATCC)), células MES-SA/Dx5 ((ATCC CRL-1977), meio de McCoy 5a (ATCC)), células ACHN (ATCC CRL-1611, Meio mínimo essencial, Eagle (ATCC)), células PC3 (ATCC CRL-1435, meio F12K de Ham (ATCC)).

As células foram semeadas em insertos de vidro em cada poço de uma placa de 24 poços na densidade e meio, como especificado acima, um dia antes do teste do composto. Após 24 horas, estas placas foram divididas em dois grupos - grupo de anoxia e grupo de ar. Adicionou-se um composto de teste em cada poço (volume de 200 µl) nos grupos de tratamento a concentrações variando de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, a 0,01 µM. Todos os compostos de teste foram diluídos serialmente em meio completo com concentrações de DMSO finais inferiores ou iguais a 1% em cada poço. As células no grupo de tratamento de anoxia foram incubadas durante 2 horas em uma câmara anaeróbica Bactron II. As células no grupo de tratamento com ar foram incubadas durante 2 horas em incubadores de cultura de tecidos convencionais. Após o tratamento de 2 horas com um composto de teste, o composto de teste foi removido de cada poço, células foram lavadas com 500 µl de meio, e incubadas durante 3 dias em 500 µl de meio fresco. Após 3 dias, células foram manchadas com 10% de azul Alamar durante 2 horas após o que mediu-se a capacidade de células em proliferar (como mencionado acima), e calculou-se a concentração inibidora de 50% do crescimento (GI_{50}

(também referida aqui como IC_{50})) de compostos de teste, que se encontra tabulado na Tabela X abaixo.

Tabela X: valores IC50 (μM)

	H460 Anoxia/ Ar	HT29 Anoxia/ Ar	MES-SA Anoxia/ Ar	MES-SA/Dx5 Anoxia/Ar	ACHN Anoxia/ Ar	PC3 Anoxia/Ar
P2	44 / >100					
1	0.4 / 72	50 / >100		1 / >100		
23	0.04 / 5	7.5 / -				
23	0.1 / 14					
154	0.9 / 2					
139	16 / 100					
140	5 / 65					
2	8 / >100					
5	0.05 / 6	10 / >100				
22	0.7 / 16					
3	>20 / >100					
142	>40 / >100					
4	40 / >100					
143	4.5 / 3.5					
6	0.7 / >100	22 / >100		5 / >100		
144	7 / >100					
145	>100 / >100					
147	>100 / >100					
7	0.14 / 25	7 / >100		0.59 / 83		
11	5.2 / >100					
12	1.7 / >100					
9	>10 / >100					
8	0.013 / 0.6					
36	0.88 / >100	55 / >100	5 / >100	7.5 / >100		
149	50 / >100					
15	0.08 / 1					
16	1.6 / >100					

17	1 / 9					
18	3.4 / 9					
14	8.5 / >100					
150	- / 21					
25	0.15 / 86	16 / >100	0.9 / >100	0.3 / >100	0.2 / 62	0.6 / >100
26	0.1 / 35					
10	100 / >100					
31	83 / >100					
24	0.01 / 4		0.1 / 2	0.1 / 0.8		
27	25 / 100					
28	0.15 / 20					
32	50 / 100					
33	8 / 46					
34	0.01 / 1.8	0.8 / 57	0.13 / 10			
35	0.075 / 50					
35	0.05 / 55	1.8 / >100	1 / 100			
74	>100 / >100					
75	9 / 26					
76	9 / >100					
77	1.6 / 5.5					
78	>100 / >100					
79	3.5 / 3.5					
118	>100 / >100					
80	>100 / >100					
81	0.05 / 0.3					
82	0.03 / 0.02					
83	0.3 / >100					
84	0.003 / 40					
85	0.7 / 100					
86	1.4 / 3					
119	0.3 / >100					
37	0.36 / >100					
87	22 / >100					
88	0.03 / 0.53					
89	0.33 / 3.7					
90	0.01 / 3.4					
38	0.33 / >100					
106	0.09 / 3.5					
107	0.06 / 2.8					
108	1.1/>100					
109	0.3 / 13					
110	0.3 / 21					

39	0.2 / 5					
91	- / >100					
92	>100 / >100					
41	- / 7					
42	0.5 / 9					
93	0.1 / 3.8					
94	0.3 / 2					
95	- / 2.7					
96	0.1 / 0.1					
120	0.3 / 50					
121	0.04 / 1					
122	0.04 / 1.3					
43	2 / 60					
44	3 / 100					
45	6 / >100					
46	5 / >100					
47	4 / >100					
48	- / >100					
97	0.01 / 0.1					
49	- / >100					
50	0.1 / 3					
98	0.1 / 2					
51	3 / 7					
52	15 / 20					
53	3 / 10					
99	0.1 / 1					
100	0.5 / 35					
54	1 / 60					
55	5 / 12					
56	0.5 / 10					
123	100 / >100					
57	14 / 100					
124	- / 0					
125	- / 100					
126	- / 0					
111	50 / 100					
58	5 / 10					
59	2 / 6					
60	15 / 15					
61	0.3 / 4					
62	2 / 45					
63	1 / 8					
127	0.02 / 5					
128	0.02 / 10					
112	70 / >100					
103	0.02 / 2					
113	1 / 100					

65	25 / 75					
114	1 / 80					
129	1 / 100					
115	0.5 / 5					
116	0.5 / 15					
130	0.7 / 20					
66	0.3 / 100					
67	48 / >100					
68	100 / >100					
69	71 / >100					
70	2 / 65					
117	8 / 70					
71	0.1 / 0.1					
72	0.5 / 12					
131	>100 / >100					
132	3 / 3					
133	22 / >100					
104	0.4 / 12					
105	<0.1 / 1					

Exemplo 30

Ensaio antiproliferação - Dependência de oxigênio

Para determinar a dependência do oxigênio de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato, a atividade antiproliferativa destes compostos foi testada em um ensaio de múltiplos poços à base de azul Alamar como descrito previamente (ver Exemplo 29). Células NCI-H460 (ATCC HTB-177, meio RPMI (Gibco)) ou HT29 (ATCC HTB-38, meio RPMI (Gibco)) foram semeadas a 20.000 células/poço/500 µl de meio em insertos de vidro em placas de 24 poços um dia antes do teste. As células foram incubadas durante 2 horas em uma câmara anaeróbica Bactron II enxaguada com gases com as concentrações desejadas de oxigênio variando de anoxia, 0,1%, 0,3%, 0,6%, 1%, 10% de oxigênio, e ar. Os valores calculados IC50 (µM) são tabulados na Tabela IIa (células H460) ou Tabela Y2 (células HT29) abaixo.

Tabela Y1: Valores IC50 (µM) em células H460

Composto	N_2	0.1% O_2	0.3% O_2	0.6% O_2	1% O_2	10% O_2	Ar
1	0.3		10	7	50		100
23	0.05	5		6	5		5

5	0.03	1		1	10	5	40
36	1	30		60	60	>100	>100
16	0.3	10		10		100	>100
25	0.1	1	3	5	10	25	55
26	0.3	3		6	5	10	40
10	>100	>100		>100	>100		>100
24	0.007			0.85			>1
34	0.01		1				5
35	0.05		6	5	40		50
84	0			3			40
119	0.3			>100			>100
37	0.5			25			>100
88	0.03		0.5	0.2			0.5
38	0.4			45	>100		
106	0.1			0.7			4
108	1			>100			>100
109	0.3			10			15
110	0.3			3			25
44				45			>100
46				50			100
47				60			100
97	0.006			0.01			0.02
49				100			100
50				3			3
98				0.5			2
51				7			7
52				10			20
53				5			10
99				0.5			1
100	0.5			10			35
54	1			30			60

55	5			8			12
56	0.5			8			10
123	>100			>100			>100
61	0.3			4			4
62	2			30			45
63	1			15			8
127	0.02			1			5
128	0.02			1			10
113	1			>100			>100
114	1			5			80
66	0.3			20			100
70	2			30			65

Tabela Y2: Valores IC50 (μM) em células HT29

Composto	N_2	0.1% O_2	0.3% O_2	0.6% O_2	1% O_2	10% O_2	Ar
25	2			25			>100

Exemplo 31

Ensaio clonogênico - Dependência de oxigênio

Para determinar a dependência do oxigênio de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato, realizou-se um ensaio de sobrevida clonogênico. Células foram plaqueadas em placas de vidro de 60 mm ($5x10^5$ células por placa em 5 ml de meio) 2 dias antes do teste do composto. Testou-se as linhas de células a seguir: células NCI-H460 (ATCC HTB- 177, meio RPMI (Gibco)), células HT29 (ATCC HTB-38, meio RPMI (Gibco)), células PC3 (ATCC CRL-1435, meio F12K de Ham (ATCC)). Preparou-se uma solução do composto de teste em meio completo imediatamente antes do teste e isto foi adicionado diretamente nas células (volume de 2 ml). Anoxia ou hipoxia (menos de 200 ppm de O_2) foi obtida expondo-se as placas de vidro em um câmara anaeróbica Bactron II ou em dispositivos de alumínio (ver Exemplo 33) durante 2 horas. Para a câmara anaeróbica, níveis desejados de oxigenação entre 200 ppm e ar foram obtidos enxaguando-se a câmara

anaeróbica com gases pré-calibrados antes da experimentação. Para os vasos de alumínio, obteve-se anoxia ou hipoxia por meio de exposição das placas de vidro em dispositivos de alumínio estanques pré-aquecidos a uma série de cinco evacuações rápidas e enxágües com 95% de nitrogênio mais 5% de dióxido de carbono em um banho de água a 37°C numa plataforma agitada (controles também são enxaguados). Após a quinta evacuação e enxágüe, a plataforma (com banho de água e dispositivos) foi agitada durante 5 minutos, após o que se realizou mais uma evacuação e enxágüe, e os dispositivos foram transferidos para um agitador em uma incubadora a 37 graus C durante o restante da exposição à droga durante de 1 a 2 horas. Níveis de oxigenação entre 200 ppm e ar foram obtidos variando-se o grau e o número de evacuações. As concentrações de oxigênio no meio e fases gasosas foram verificadas usando-se um eletrodo de oxigênio (Anima, Phoenixville, PA) em um dispositivo de alumínio modificado que permitiu monitorar as fases gás e líquido. Após a exposição à droga, as placas de vidro foram removidas da câmara ou dispositivos de alumínio, e a droga foi lavada das células por meio de enxágüe com meio. As células foram então tripsinizadas e plaqueadas para sobrevida clonogênica em placas de Petri de plástico. De dez a 14 dias mais tarde, as placas foram manchadas com violeta cristal (a 0,25% em 95% de etanol), e contou-se colônias contendo mais de 50 células (ver Exemplo 33). A concentração inibidora de crescimento a 90% (IC_{90}, 90% de eliminação, 10% de sobrevida) dos compostos de teste foi calculada e tabulada na Tabela Y3 abaixo.

Tabela Y3: Valores de IC_{90} (μM)

Composto (Linhagem de células)	N2	0.1% O2	0.6% O2	Air
23 (H460)	0.3		0.6	5
25 (H460)	0.1	0.4	5	30
25 (HT29)	0.2		3	40
25 (PC3)	0.3			50
24 (H460)	0.07		0.25	14
35 (H460)	0.5		3	30
37 (H460)	0.2		5	90
70 (H460)	2		8	20

Exemplo 32

Eletroquímica

Para determinar propriedades eletroquímicas e os potenciais de redução de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato, gerou-se voltamogramas cíclicos destes compostos pela Bioanalytical Systems, Inc. Realizou-se experimentos de AU com eletrodos de trabalho em carbono vítreo (3,0 mm de diâmetro), eletrodos de referência Ag/AgCl, e eletrodos auxiliares de fio de platina. Compostos foram dissolvidos em 1ml de metanol para se chegar a concentrações finais entre 0,5 e 1,5 mM após a adição de 9 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS). A solução foi adicionada em um frasco de célula eletroquímica e aspergida com argônio durante 5 minutos para remover a maior parte do oxigênio. Realizou-se voltametria cíclica a taxas de varredura de 100 mV/s e 10.000 mV/s em um eletrodo de trabalho em carbono vítreo. Realizou-se uma operação de teste em um eletrodo de mercúrio CGME (CGME em modo SMDE, capilar com diâmetro interno de 150 μm, gota de tamanho 8), porém observou-se pouca diferença entre voltamogramas de mercúrio e carbono vítreo, de modo que o eletrodo de mercúrio não foi mais usado. Os potenciais de redução de elétrons simples ou elétrons múltiplos dos compostos foram gerados em cada taxa de varredura e encontram-se tabulados na tabela abaixo.

Tabela: Potenciais de Redução (mV)

Composto	100 mV/s	10,000 mV/s
1	-596	-638
5	-606	-634
36	-609	-634
25	-594	-626
24	-568	-636
34	-584	-663
78	-704	-746
82	-428, -610	-414, -769
88	-559	-629
108	-614	-593
103	-638, -769 , -875	-756
2-NO_2-Imidazol	-634	-693
5-NO_2-Furano	-487	-638
4-NO_2-Benzeno	-712, -1106	-735, -1268

Exemplo 33

Ensaio de sobrevida clonogênico

As pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da invenção foram testadas no ensaio como a seguir. Células H460 humanas (obtidas do ATCC) de crescimento exponencial são semeadas em discos de vidro ranhurados de 60 mm a uma densidade entre 2,5 e 5 x10^5 células por placa e desenvolvidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal durante 2 dias antes de se iniciar o tratamento com droga. No dia do teste, preparou-se estoques de drogas com concentrações conhecidas em meio completo, e 2 ml do estoque desejado foram adicionados em cada placa. Para se obter equilíbrio completo entre a fase gás circundante e a fase líquida removeu-se a tampa da placa de vidro e a placa foi agitada durante 5 minutos em um agitador orbital. As placas foram recobertas e armazenadas no interior de uma caixa de luvas. A caixa de luvas foi evacuada e gaseifiada com uma mistura de gás anóxica certificada (95% de nitrogênio e 5% de dióxido de

carbono) ou com uma mistura de gás aeróbica (normóxica) (95% de ar e 5% de dióxido de carbono). Células foram então incubadas com a droga durante 2 horas a 37°C.

Ao término do tratamento com pró-droga, placas foram removidas de cada vaso, e a pró-droga foi facilmente removida das células. Placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e uma solução de tripsina-EDTA e então tripsinizadas durante 5 minutos a 37°C. Células destacadas foram neutralizadas com meio acrescido de soro e coletadas por meio de centrifugação durante 5 min a 100 x g. Células foram ressuspensas a aproximadamente $1x10^6$ células/ml e diluídas 10 vezes para ser obter concentrações de estoque para plaqueamento. A concentração de cada estoque foi determinada contando-se com um contador de partículas Coulter Z2. Números conhecidos de células foram plaqueados, e as placas foram colocadas em uma incubadora durante entre 7 e 10 dias. Colônias foram fixadas e manchadas com uma solução de 95% etanol e 0,25% de violeta cristal. Colônias acima de 50 células foram contadas, e determinou-se a fração sobrevivente.

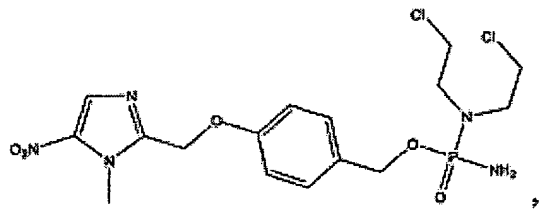
Realizou-se ensaios clonogênicos baseados em HT 29 e células da mesma maneira como descrito acima e no Exemplo 31.

Determinou-se a citotoxicidade de compostos (Tabelas IA e IB) em hipoxia e em normoxia por meio de ensaio clonogênico empregando-se linhas de células H460 e HT29 como proporcionado nos Exemplos 31 e 33 e expressou-se a IC_{90} em μM, e realizou-se ensaio de anti-proliferação modificando-se um ensaio de poços múltiplos descrito por Hay *et al*, *J. Med. Chem.*, 2003, 46:169-82 empregando-se linhas de células H460, HT29, HCTl 16, e DX-5 e expressou-se a IC_{50} em μM (ver Exemplo 29). A relação de IC_{50} ou IC_{90} determinada em normoxia e hipoxia é denominada relação de citotoxicidade hipoxia (HCR) e pode ser uma medida da citotoxicidades seletiva para hipoxia das pró-drogas da presente invenção.

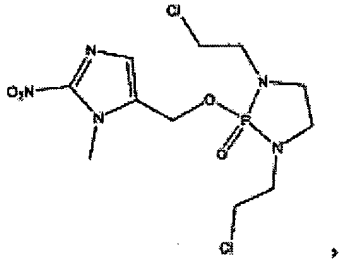
Tabela 1A

Composto #	logP	Hipoxia		Normoxia		HCR	
		P	C	P	C	P	C
P3			0.25	10			40
P2		44.0		>100.0		> 5	
S1		>40		>100		>3	
S2		7		>100		>14	
1		0.4	0.35	72.0	75.0	180	200
2		8		>100		>12	
3		>20		>100		>5	
4		40		>100		>2	
5	1	4.5		3.5		1	
6	0.9	0.7		>100		>140	
P22		4.5		3.5		ca. 1	
7	1.4	0.14		25		180	
8		0.01		0.6		60	
9		>10		>100		>10	
10		100		>100		>1	
11		5.2		>100		>20	
12		1.7		>100		>50	
14		8.5		>100		>12	
15		0.08		1		12	
16	0.5	1.6	0.2	100	35	60	175
17		1		9		9	
18		3.4		9		3	
20		1		8.5		8	
21		0.25		7.8		26	
22		0.7		16		23	

23		0.04	0.2	5	10	125	50
24		0.01		4		400	
25		0.05		50		1000	
26		0.1		35		350	
27		2.5		100		40	
31		83		>100		>1	
32		50		100		2	
34		<0.01		1.8		>180	
35		0.075		50		625	
36	-0.1	0.88	0.2	>100	>100	>110	>500



S1



S2

Tabela 1B

Comp No.	HT29						DX-5			HCT116		
	P		C		HCR		P		HCR	P		HCR
	H	N	H	N	P	C	H	N		H	N	
1	50	100	0.4	100	>2	>100	1	>100	>100			
23	7.5		2									
5	10	>100			>10							
6	55	>100			>2		5	>100	>20			
7	7(100)	>100			>5(1)		0.6	83	140			
36	55(35)	>100	3		>2		7.5	>100	>13	5	>100	>20
25	16	>100			>6		1	>100	>100	0.9	>100	>100
34	0.8	57			70					0.13	10	77

P = Proliferação; C = Clonogênica; H = Hipoxia; N = Normóxica

Exemplo 34

Efeito do Composto 25 sobre a distribuição de ciclos de células

Células (H60, PC3 e HT29) foram semeadas a uma densidade de 1,0 x 10^6 células/3ml de meio por placa de 60 mm. Após 24 h de ligação, células foram expostas a Composto 25 nas concentrações indicadas durante 2 h sob normoxia (ar) ou anoxia (nitrogênio). Células foram lavadas duas vezes, e incubadas durante mais 22 h em meio fresco. Células foram tripsinizadas,

centrifugadas, e fixadas em 75% de etanol durante pelo menos 24 h a –20°C. Determinou-se a distribuição de ciclos de células usando-se reagente Guava Cell Cycle (Guava, Hayward, CA) por meio de citometria de fluxo (Guava, Hayward, CA). Os dados demonstram que Composto 25 induz interrupção do ciclo celular de maneira dependente do oxigênio da concentração em múltiplas linhas de células de câncer humano.

Células H460

μM		G_0/G_1	S	G_2/M
0	ar	56	12	30
	nitrogênio	59	11	26
0,005	ar	38	18	42
	nitrogênio	50	12	38
0,05	ar	58	11	28
	nitrogênio	30	7	59
0,5	ar	58	11	28
	nitrogênio	23	31	40
5	ar	42	6	59
	nitrogênio	47	15	17
50	ar	14	19	65
	nitrogênio	33	14	11

Células PC3

μM		G_0/G_1	S	G_2/M
0	ar	54	13	33
	nitrogênio	60	12	28
0,0005	ar	55	12	32
	nitrogênio	59	10	31
0,005	ar	52	13	34
	nitrogênio	56	11	32
0,05	ar	55	12	33
	nitrogênio	43	12	44
0,5	ar	55	13	32
	nitrogênio	21	33	46
5	ar	55	12	32
	nitrogênio	35	38	26

Células HT29

µM		G_0/G_1	S	G_2/M
0	ar	50	14	36
	nitrogênio	47	13	39
0,005	ar	52	12	35
	nitrogênio	46	14	40
0,05	ar	50	15	35
	nitrogênio	37	11	52
0,5	ar	48	14	37
	nitrogênio	8	8	84
5	ar	47	13	39
	nitrogênio	14	50	36
5	ar			
	nitrogênio			

Exemplo 35

Modelo esferóide

Usou-se duas linhas de células de câncer humanas nestes estudos esferóides para se determinar a eficácia das pró-drogas de alquilador de fosforoamidato ativadas hipoxicamente. Células de adenocarcinoma colorretal HT29 (carcinoma do colo) foram semeadas diretamente em um frasco de centrifugação de 125 ml a 10.000 células/ml e desenvolvidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e antibióticos. À medida que estas células se dividiram, elas aderiram umas às outras e formaram esferóides. Células de carcinoma do pulmão H460 foram semeadas em um frasco revestido com uma superfície não-aderente para formar pequenas bolas de células que podem ser semeadas em um frasco de centrifugação. Para iniciar as semeaduras com células H460, frascos de cultura de tecidos de 150 cm^2 foram revestidos com 1% de agarose e, depois, adicionou-se 10.000 células por frasco e estas foram deixadas desenvolver em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e antibióticos de 3 a 5 dias antes da semeadura em culturas de centrifugação. No caso de ambas as linhas de células, meio de crescimento foi trocado diariamente após os esferóides se tornarem visíveis a olho nu.

Para determinar a morfologia e a localização de regiões hipóxicas em um esferóide intacto, preparou-se esferóides inteiros para

histologia. No caso de seções congeladas, esferóides intactos foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e embutidos em OCT e rapidamente congelados em solução de gelo seco/2-metilbutano antes de serem armazenadas a –80°C. No caso de seções embutidas em parafina, esferóides intactos foram fixados em uma solução recentemente preparada de 4% de paraformaldeído em PBS e subseqüentemente embutidas e seccionadas.

Para avaliar a capacidade de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato em penetrar as células de câncer hipóxicas interiores, se tornarem ativadas, liberar o alquilador de fosforoamidato, e matar aquelas células de câncer interiores, mediu-se a sobrevida clonogênica de esferóides expostos à droga durante 2 h.

Esferóides foram colocados em um novo meio de crescimento e incubados durante pelo menos 1 h antes de se iniciar experimentos. Esferóides entre 500 e 600 μm foram isolados por meio de filtração da cultura de esferóides através de uma série de filtros de tela estéreis de tamanho definido. Entre 10 e 20 esferóides foram colocados em uma placa Pirex de 60 mm ranhurada e siliconizada em 3 ml de meio com a concentração desejada do composto de teste. Os discos foram colocados em vasos de alumínio fechados hermeticamente e expostos a uma série de evacuações e gaseificações com gases certificados contendo 5% de CO_2 e uma quantidade definida de O_2 (0% de O_2, 3% de O_2, 10% de O_2 ou ar). Esferóides foram incubados em um banho de água agitado para assegurar tanto o equilíbrio do O_2 dissolvido na solução, como a integridade dos esferóides em solução durante 2 h. O compostos de teste foi removido e os esferóides foram lavados antes de serem completamente digeridos com tripsina. Como o núcleo necrótico contém fragmentos celulares, foi necessário um tratamento com DNase I dando uma suspensão de células simples uniforme. Células foram ressuspensas a 10^6 /ml e plaqueadas para sobrevida clonogênica.

Realizou-se experimentos de resposta de dose inicial em células de monocamada sob nitrogênio, 0,6% de O_2, ou ar para estabelecer a faixa de dose apropriada e a dependência da liberação de aliviador de oxigênio de fosforoamidato de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato. A sobrevida clonogênica foi o ponto terminal e os dados encontram-se resumidos pelos valores de IC_{90} ou C_{90} (a concentração inibitória requerida para matar 90% das células e proporcionar 10% de sobrevida). Empregou-se daunorrubicina e cisplatina, em que cada um destes penetra em esferóides em graus diferentes, para matar as células de câncer aeróbicas do esferóide. Usou-se daunorrubicina para penetrar nas camadas externas de um esferóide multicelular devido a sua afinidade pelas células e usou-se cisplatina em doses apropriadas para matar apenas as células de câncer aeróbicas exteriores. Como um controle para uma droga biorredutora que matou células sob hipoxia em culturas de monocamada, mas não em cultura de células multicelulares devido a sua elevada reatividade e baixa concentração, usou-se Tirapazamina tanto para experimentos baseados em monocamada como em esferóides conforme tabulado abaixo para células H460 expostas durante 2 h.

Valores de IC_{90} para células H460 expostas como monocamadas ou esferóides

Droga	**monocamada**			**esferóide**
	N2	**0,6% de O_2**	**Ar**	**10% de CO_2**
Cisplatina	4,2 μM	7,7 μM	7,3 μM	8,0 μM
Daunorrubicina	0,16 μM			19 μM
Tirapazamina	14 μM	27 μM	>100 μM	>200 μM

Testou-se uma série de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato em esferóides para determinar sua capacidade de penetrar nas células de câncer hipóxicas do revestimento interior, se tornarem ativadas, e matar as células hipóxicas. Os resultados são tabulados abaixo.

IC_{90} para células H460 expostas como monocamadas ou esferóides a pró-drogas de fosforoamidato durante 2 h.

Composto	Monocamada			Esferóide
	N_2	0.6% O_2	Ar	10% O_2
25	0.1 µM	0.6 µM	20 µM	15 µM
24	0.07 µM	0.25 µM	4 µM	3 µM
97				13 µM
70	1.25µM			25.5 µM
1	0.35 µM		75 µM	>>100 µM
36	1 µM		100 µM	>>100 µM
35				22 µM

Resultados similares quanto à eficácia do Composto 25 foram demonstrados nos esferóides de HT29 conforme tabulado abaixo:

Composto	Monocamada			Esferóide
	N2	*0.6% O2*	*Air*	*10% O2*
25	0.2µM	3µM	40µM	29µM

A pró-droga de alquilador de fosforoamidato foi combinada simultaneamente com cisplatina ou daunorrubicina e os esferóides foram expostos durante 2 h à combinação, seguido de medição da sobrevida oncogênica. Os resultados encontram-se tabulados abaixo:

Composto	IC_{50} (µM)
Daunorrubicina	17
Composto 25	9
Daunorrubicina + Composto 25	2,3

Composto	IC_{50} (µM)	IC99 (µM)
Cisplatina	14	
Composto 25	12	
Cisplatina + Composto 25	2,3	5,4

Pró-drogas de alquilador de fosforoamidato demonstram a capacidade de penetrar nas células que se encontram no interior do esferóide, e de matar células de câncer hipóxicas sozinhas e em combinação com outro agente que objetiva células de câncer aeróbicas.

Exemplo 36

Ensaio de anti-proliferação - Células de reparo de DNA mutante

Células de ovário de hâmster chinês mutantes com relação a vias de reparo de DNA específicas foram obtidas da ATCC. As linhas de células a seguir foram testadas com 2.500 ou 3.000 células/poço/500 µl de Meio Eagle Modificado da Dulbecco (Gibco) suplementado com 10% de soro

bovino fetal e antibióticos: células AA8 (ATCC CRL-1859), células EM9 (ATCC CRL-1861), células UV41 (ATCC CRL-1860), células UV135 (ATCC CRL-1867), células IRSlSF. Linhas de células AU foram selecionadas inicialmente com um ensaio anti-proliferação e aquelas demonstrando sensibilidade foram retestadas com o ensaio clonogênico (como descrito previamente) para confirmar os resultados de proliferação. Células foram expostas a doses selecionadas de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato da presente invenção durante 2 h em condições hipóxicas ou aeróbicas, o composto de teste foi removido, e as células ensaiadas. A tabela a seguir lista as linhas de células, a via mutada, e o defeito do gene específico:

Lnhas de células	Via mutante	Defeito do gene
AA8	nenhuma (tipo selvagem)	(nenhum)
EM9	reparo de excisão de base	XRCC1
UV135	reparo de excisão de nucleotídeo	`CPG
UV41	reparo de excisão de nucleotídeo e recombinação homóloga	XPF
Irs1SF	recombinação homóloga	XRCC3

A tabela a seguir lista o efeito da exposição de várias linhas de células a Compostos 25 e 36 em condições anóxicas ou aeróbicas e ensaiadas por meio de proliferação conforme medido por IC_{50}

Composto	AA8 (Anoxia / Ar)	EM9 (Anoxia / Ar)	UV41 (Anoxia / Ar)	UV135 (Anoxia / Ar)	IRS1SF (Anoxia / Ar)
36	2 / >100	4 / >100	0.03 / 20	2 / >100	0.3 / 59
25	8 / >100	7 / >100	0.2 / 95	6 / >100	2 / >100

A tabela a seguir lista os valores de IC_{90} com relação à sobrevida clonogênica para células selecionadas expostas a Composto 25 em condições anóxicas ou aeróbicas.

Linhagem de células	IC_{90} (μM)	
	N_2	Air
AA8	0.85	>300
UV41	0.02	17
Irs1SF	0.02	20

Apenas linhas de células defectivas com relação à recombinação homóloga foram sensíveis ao Composto 25 sob hipoxia. Como

UV41 participa tanto da via de reparo de excisão de nucleotídeo como também da via de reparo de recombinação homóloga, Composto 25 possivelmente também produziu uma quantidade significativa de mono-produtos de adição química. No entanto, UV135 que também está envolvido no reparo de excisão de nucleotídeo não foi sensível ao Composto 25. As lesões predominantes produzidas pelo Composto 25 foram reticulações inter-filamentos de DNA. Estes resultados foram confirmados em células UV41 e irslSF com o ensaio clonogênico. A exposição em condições aeróbicas produziu o mesmo espectro de sensibilidades como observado sob hipóxia, indicando que a toxicidade aeróbica produziu o mesmo espectro de sensibilidades como observado sob hipoxia, indicando que a toxicidade aeróbica também foi causada por formação de reticulação inter-filamentos de DNA. Composto 36 apresentou um padrão similar de sensibilidade nas linhas de células mutantes, indicando que o Composto 36 também produziu reticulações inter-filamentos de DNA.

Exemplo 37

Ensaio de cultura de células em multi-camadas

Este exemplo demonstra o efeito do Composto 25 sobre a penetração no tecido usando-se cultura de células em multi-camadas (MCC) e para avaliar qualquer efeito acessório. MCCs foram incubadas com meio oxigenado (20% de O_2 & 5% de O_2) ou meio hipóxico (aproximadamente 0% de O_2) e o composto de teste foi exposto de um lado (superfície exposta, lado normóxico) enquanto que o outro lado foi temporariamente fechado (lado distal, lado hipóxico). Quando as MCCs são incubadas em meio a 20% de O_2 ou 5% de O_2 desenvolve-se um gradiente de oxigênio a partir da superfície exposta ao meio no sentido da superfície distal da cultura. Os 50 μm mais distais do tecido tornam-se depletados de oxigênio. A extensão da depleção de O_2 é maior no meio gaseificado com 5% do que com 20% de O_2; incubação com 5% de O_2 reflete mais estreitamente a situação *in vivo*. Incubando-se

MCCs com meio a 0% O_2 modela hipoxia limitada por perfusão, em que vasos sanguíneos do tumor tornam-se completamente depletados de oxigênio, e o composto de teste precisa penetrar distâncias excessivas para atingir todas as células. Assim, esta situação impõe uma barreira maior à penetração da droga, se a ligação da droga ativada atuar limitando sua penetração.

Experimentos baseados em MCC foram realizados com meio gaseificado com 0, 5 ou 20% de O_2 durante 45 minutos antes e durante a incubação com o composto de teste. Células HCTl 16 foram desenvolvidas até uma espessura de 150 μm em um suporte sólido, e uma lado de cada cultura foi grampeado para desenvolver hipoxia por limitação de difusão. Culturas foram expostas a composto de teste durante 1 h sob 0% de O_2, 5% de O_2 ou 20% de O_2 e avaliou-se a eficácia medindo-se a inibição da incorporação de BrdU. As culturas foram incubadas durante uma segunda hora em meio fresco a 20% de O_2 e foram removidas do aparelho e devolvidas a uma câmara de crescimento normal, em que o meio flui sobre ambos os lados da MCC. Culturas foram incubadas durante 24 horas antes da marcação de BrdUrd e subseqüente crio-seccionamento. A marcação de BrdUrd nos lados exposto e distal da MCC foi analisada usando-se manchamento imuno-histoquímico, diagnóstico por imagem com microscópio, e análise de imagem por computador para avaliar o efeito do Composto 25 sobre a proliferação celular.

Quando culturas foram expostas a doses escalonadas de Composto 25 sob 20% de O_2, foi necessário 5 vezes menos composto no lado distal (hipóxico) em comparação com o lado exposto (normóxico) para produzir resultados comparáveis, demonstrando a penetração e ativação hipóxica do Composto 25. Quando MCCs foram expostas a composto de teste sob uma condição fisiologicamente relevante de 5% de O_2., Composto 25 foi 10 vezes mais efetivo para inibir a incorporação de BrdU no lado hipóxico, em comparação com o lado normóxico. Lados normóxicos de culturas a 5%

& 20% de O_2 foram afetados igualmente por exposição ao Composto 25.

Composto 25 é mais efetivo no lado hipóxico de culturas sob 5% de O_2 do que com 0% de O_2. Comparação de lados normóxicos versus hipóxicos de culturas sob 5% de O_2 demonstraram que o Composto 25 penetra eficazmente através de tecido relativamente bem oxigenado. Composto 25 é capaz de matar células hipóxicas localizadas a cerca de 150 μm dos vasos sanguíneos funcionais. Observou-se uma redução de aproximadamente 3 vezes na exposição ao Composto 25 no lado hipóxido sob 0% de O_2 relativamente à exposição em condições de 5% de O_2. Observou-se efeito Acessório apenas na concentração mais elevada.

A tabela a seguir lista o efeito de e exposto a doses escalonadas de Composto 25 conforme medido com IC_{50} (concentração para inibir a incorporação de BrdU em 50%).

Lado	**0% de O_2 (μM)**	**5% de O_2 (μM)**	**20% de O_2 (μM)**
hipóxico	~ 1,1	0,7	2,6
normóxico	~ 1,7	8,0	>10

Exemplo 38

Metabolismo do Composto 25 com proteína microssômica humana e de camundongo

Realizou-se uma avaliação *in vitro* da estabilidade metabólica de uma pró-droga de alquilador de fosforoamidato (Composto 25) usando-se proteínas microsômicas de fígado humanas (HLM), de rato (RLM) e camundongo (MLM) contendo enzimas de citocromo P450. Preparou-se uma solução de Composto 25 (500 μl, 5 μM) diluindo uma solução de consumo de DMSO 100 vezes em uma solução de ponte metanol:água, adicionando-se proteína microssômica (1 mg/ml) em PBS/$MgCl_2$, e reações enzimáticas iniciadas por meio de adição de uma solução de NADPH. 50 μl da mistura de reação foram retirados a 0, 10, 20, e 30 minutos após a adição da solução de NADPH, as proteínas foram precipitadas com acetonitrila e o sobrenadante transparente foi analisado quanto à quantidade de Composto 25 por meio de

LC-MS/MS fase invertida. Usou-se nifedipina e testosterona como controles positivos. O primeiro estudo comparou RLM com MLM (Tabela 1) e o segundo estudo comparou HLM com RLM (Tabelas 2A e 2B)

Tabela 1

Composto	Estabilidade metabólica (% após 30 min)	
	RLM	MLM
25	84%	89%
Nifedipina	6%	4%
Testosterona	0%	6%

Tabela 2A

Composto	Estabilidade metabólica (% após 30 min)	
	HLM	RLM
25	127%	137%
Nifedipina	22%	2%
Testosterona	65%	33%

Tabela 2B

Comp. No.	Estab. metab. (MLM) (% em 30 min)	Estab. no plasma (% 30 min)	MTD (mg/ml)	Administração intravenosa em camundongos					Administr. intraperitoneal em camundongos		
				t 1/2 (hr)	Cmax (µg/ml)	AUC (µg/ml x hr)	Vss (l/kg)	CL (ml/min /kg)	t 1/2 (hr)	Cmax (µg/ml)	AUC (µg/ml x hr)
1	90	100		0.26	35	12.5	1.48	4.0	0.25	29.9	
5	5 (20)	100 (85)		0.08	16.9	4.5	1.25	185		3	1.0
6	0	60	250								
7	0	85	250								
16	40										
23	71	84		0.15	7.8	2.3	3.3	368	0.16	8.5	3.5
25	92	102 (at 20 min)		0.11 (6.7 min)	27.5				0.18 (11 min)	22.9	
26	56	85									
34	28	85 (at 20									

Exemplo 39

Farmacocinética *in vivo* de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato

Vários parâmetros farmacocinéticos plasmáticos de pró-drogas de alquilador de fosforoamidato foram determinados em camundongos CD-1,

exceto onde indicado, conforme listado abaixo na Tabela 3.

Tabela 3

Droga (mg/kg)	Dose (mg/kg)	Via	Formulação	T_{max} (min)	C_{max} (µg/mL)	AUC (µg-h/mL)	Meia-vida (min)
23	50	i.p.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	8.50	210	9.60
23	50	i.v.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	7.80	136	8.87
36	50	i.p.	25%PEG/75% de sol. salina	15.0	44.0	1439	11.0
36	50	i.v.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	27.7	646	14.1
1[a]	50	i.p.	25%PEG/75% de sol. salina	15.0	29.9	-	-
1[a]	50	i.v.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	35.0	12.5	15.3
5	50	i.p.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	3.00	57.4	2.56
5	50	i.v.	25%PEG/75% de sol. salina	5.00	16.9	270	4.67
37	20	i.p.	Cremóforo:Etanol:Sol. salina (1:2:7)	2.00	12.6	196	23.2
37	20	i.v.	Cremóforo:Etanol:Sol. salina (1:2:7)	2.00	15.0	172	9.00
85	25	i.p.	10% PEG	5.00	3.93	89.1	10.0
128	25	i.p.	10% PEG	5.00	3.85	102	8.31
24	50	i.p.	Solução salina	5.00	7.60	64.0	4.10

[a] camundongos Balb/c

Exemplo 40

Farmacocinética *in vivo* do Composto 25

Vários parâmetros farmacocinéticos do plasma ou tumor apresentados pelo Composto 25 foram determinados em camundongos CD-1 exceto onde indicado como listado abaixo na Tabela 4.

Tabela 4

Dose (mg/kg)	Via	Formulação	T_{max} (min)	C_{max} (µg/mL)	AUC (µg-h/mL)	Meia-vida (min)	C [c] (%)
150[a]	i.p.	Solução salina	5.00	90.1	1239	58.7	-
150[a,b]	i.p.	Solução salina	15.0	3.38	307	ND	-
100	p.o.	Solução salina	15.0	15.8	784	95.2	-
50	i.p.	30% PEG/70% de sol. salina	5.00	22.9	438	11.0	-
50	i.v.	30% PEG/70%	2.0	27.5	325	6.7	-

[a] Camundongos nus com tumor de H460
[b] Tumor PK
[c] Biodisponibilidade

Exemplo 41

Inibição de citocromo P450 do metabolismo do [] Composto 25

Preparou-se oito poços de reação com 100 µl de uma solução contendo 50 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 2,6 mM de NADP+, 6,6 mM

de glicose-6-fosfato, 0,8 U/ml de desidrogenase de glicose-6-fosfato, e diluições seriais a 1:3 do composto de teste (como Composto 25), juntamente com oito poços de diluições seriais a 1:3 de um inibidor de controle positivo apropriado (como furafilina para CYPl A2, sulfafenazol para CYP2C9, N-benzilnirvanol para CYPC219, quinidina para CYP2D6 e cetoconazol para CYP3A4). As concentrações de composto de teste compreendem de 0,0229 μM a 200 μM. As reações foram iniciadas adicionando-se 100 μl de uma solução de substrato/enzima pré-aquecida. Preparou-se uma reação de controle de momento zero adicionando-se 50 ml de ácido fórmico a 10% (400 ml de acetonitrila durante 2C19) em água a 100 ml de solução de cofator para inativar as enzimas, depois, adicionando-se 100 ml de solução de enzima/substrato. Preparou-se também uma reação de controle sem inibidor. Após uma incubação adequada a 37 °C, as reações foram terminadas por meio da adição de 50 ml de 10% de ácido fórmico em água (400 ml de acetonitrila para 2C19). As reações foram preparadas e analisadas quanto às formas de metabólito do substrato de sonda (fenacetina para CYP1A2, diclofenaco para CYP2C9, (S)-mefenitoína para CYPC219, dextrometorfano para CYP2D6 e midazolama, testosterona e nifedipina para CYP3A4) usando-se HPLC/MS/MS. Cada ensaio foi realizado em duplicata. Um sumário dos valores IC50 encontram-se listados abaixo.

Tabela 5

	IC50 (mM)	
Isoforma	**Controle**	**Composto 25**
1A2	8.6	NI
2C9	0.20	~10
2C19	6.0	NI
2D6	0.21	>50
3A4 **Midazolam**	0.049	>50
3A4 **Nifedipina**	0.03	NI
3A4 **Testosterona**	0.10	>50

NI = nenhuma inibição significativa detectada

Exemplo 42

Determinação dos metabólitos potenciais de Composto 25 formado em hepatócitos de camundongo, rato, cão e humano

Composto 25 é incubado com hepatócitos crio-conservados de camundongo, rato, cão, macaco e humano a uma concentração de 10 μM. As reações são interrompidas após 0 minuto (pré-incubação), 30, 60 e 120 minutos por meio de extinção com acetonitrila antes de centrifugação e análise por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em conjunto com espectrometria de massa em tandem (LC/MS/MS). Metabólitos potenciais são identificados realizando-se varreduras plenas de 100 a 520 amu. Os espectros de íon produzidos pelos metabólitos potenciais são coletados subseqüentemente e comparados com o espectro do íon produzido pelo composto parental para determinar se cada metabólito potencial está relacionado com o Composto 25. O desaparecimento do composto parental (Composto 25) e o aparecimento de metabólitos potenciais ao longo do tempo são monitorados comparando-se as alturas dos picos em cada momento adquirido.

Exemplo 43

Determinação da farmacocinética *in vivo* do Composto 25 e seu(s) metabólito(s) em rato, cão e macaco

Parâmetros farmacocinéticos do Composto 25 e seu(s) metabólito(s) em ratos Sprague Dawley são determinados após administração intravenosa simples de 5, 20, 50 e 100 mg/kg de Composto 25. A farmacocinética do Composto 25 e seu(s) metabólito(s) também será determinada em cães Beagle e macacos *cynomologus* após administração intravenosa simples de 20 mg/kg de Composto 25. Concentrações de Composto 25 e seu(s) metabólito(s) no plasma são determinadas por meio de um método de LC/MS/MS, e parâmetros farmacocinéticos médios são computados.

Exemplo 44

Estudo de balanço de massa em ratos

Ratos Sprague-Dawley normais e bile-canulados recebem administração de ^{14}C-Composto 25 como uma dose intravenosa simples. Coleta-se plasma sanguíneo, urina, fezes em momentos especificados e determina-se as concentrações de radioatividade total por meio de contagem de cintilação líquida (LSC).

Exemplo 45

Auto-radiografia quantitativa de corpo inteiro

Ratos Sprague-Dawley recebem administração de uma dose intravenosa simples de 14C-Composto 25. Em momentos especificados, eutaniza-se um rato a cada momento determinado. Centrifuga-se o sangue para obter plasma, e o sangue e plasma são analisados quanto à concentração de radioatividade. Carcaças de rato congeladas são embutidas em 2% de CMC, congeladas em um bloco e seccionadas a 40 μm em um criomicrotomo Leica CM 3600. Seções coletadas são secadas com congelamento, montadas e expostas em placas de formação de imagem com fósforo juntamente com padrões auto-radiográficos de ^{14}C para calibração subseqüente do programa de análise de imagem. Seleções expostas são submetidas a varredura usando um Molecular Dynamics Storm 820 ou 860. A concentração de radioatividade em tecidos selecionados incluindo adiposo (marrom e branco), glândula adrenal, sangue, cérebro (cerebrum, cerebellum, medula), osso, medula óssea, ceco e seu conteúdo, epidídimo, esôfago, globo ocular (trato uveal, humor aquoso, lente), glândula Harderiana, coração, rim (cortex, medula, papila e seção inteira), intestino grosso e seu conteúdo, fígado, pulmão, nódulos linfáticos submaxilares), pâncreas, glândula pituitária, glândula da próstata, glândula salivar, vesículas seminais, músculo esquelético, pele, estômago (e seu conteúdo), intestino delgado (e seu conteúdo), baço, medula espinhal, traquéia, tireóide, bexiga urinária (e seu conteúdo) são medidos por meio de

análise de imagem. Produz-se para cada animal auto-radioluminografias e imagens digitais.

Exemplo 46

Proteína plasmática que se liga ao Composto 25

A proteína de ligação em plasma de camundongo, rato, cão, macaco e humano do Composto 25 é determinada com o uso de ultrafiltração. A ultrafiltração é realizada repartindo-se plasma aspergido com três concentrações com Composto 25 em um dispositivo Centrifree® em triplicata. Amostras de plasma AU são então equilibradas a 37°C. O aparelho Centrifree® é centrifugado a 37°C durante 30 minutos a 2500 x g. Uma fração de 75 µl do ultrafiltrado é aspergida com o LS. (Composto 25 deuterado) e analisada usando-se LC/MS/MS. Os ultrafiltrados são analisados e quantificados usando-se padrões de ultrafiltrado huano para a curva de calibração.

Exemplo 47

Exemplo 47 demonstra a utilidade de um composto desta invenção para tratar câncer empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma do colo humano HT-29 em camundongo.

Camundongos CB 17/SCID fêmeas (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de idade, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de colo humano HT-29 foi obtida da *American Type Culture Collection.* As linhas de células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. Células foram mantidas em uma incubadora a 37°C com 5% de CO_2. As células HT-29 foram colhidas da cultura e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3 (dia 8), cada grupo de 10 camundongos recebeu a administração, durante três semanas, de veículo apenas (solução salina e PEG

(10 ml/kg cada), Grupo 1), Composto 36 apenas (dissolvido em 30% de ciclodextrina em PBS) a uma dose diária de 20, 60, ou 200 mg/kg (Grupos 2, 3 e 4, respectivamente), e Composto 36 a uma dose diária de 20, 60, e 200 mg/kg administrados de 2 a 3 horas após uma dose de 10 mg/kg de 5FU (em solução salina) (Grupos 5, 6 e 7, respectivamente) e comparados com um grupo que recebeu apenas 5FU a 10 mg/kg (Grupo 8) como tabulado abaixo.

O peso corporal de cada camundongo foi registrado duas vezes por semana. O crescimento de cada enxerto exógeno foi monitorado medindo-se externamente tumores em duas dimensões usando-se um paquímetro digital duas vezes por semana. Determinou-se o volume do tumor (V) com a equação a seguir: $V = (L \times W^2) /2$, em que L é o comprimento, e W é a largura de um enxerto exógeno. Volumes do tumor foram medidos duas vezes por semana.

A administração de Composto 36 a 20, 60, e 200 mg/kg/dia cada um, reduziu o crescimento do tumor em comparação com administração de veículo apenas. A administração de uma combinação de Composto 36 e 5FU resultou em maior inibição, e em inibição relacionada com a dose, do crescimento do tumor, em comparação com veículo. Adicionalmente, combinações de 60 e 200 mg/kg de Composto 36 reduziram o crescimento do tumor num grau maior do que 5FU apenas.

Grupo	**Tratamento (mg/kg)**	**% de inibição vs**	
		Grupo 1	**Grupo 8**
2	20	34,6	-
3	60	16,1	-
4	200	20,2	-
5	20+5FU	35,7	3,3
6	60+5FU	46,9	13,3
7	200+5FT	58,2	23
8	5FU	38,7	-

Em associação com estes efeitos anti-tumor, houve algum grau de perda de peso e mortalidade ocasional, particularmente no grupo tratado com a alta dose de Composto 36 mas também em outros grupos. De uma maneira global, o Composto 36 apresentou taxas variáveis de inibição de crescimento do tumor.

Exemplo 48

Exemplo 48 demonstra a utilidade de um composto desta invenção no tratamento de câncer empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma de colo humano em camundongo NCI H460.

Camundongos CB 17/SCID fêmeas (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de colo humano NCI H460 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e coletadas de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 47 e inoculadas a 1 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores se desenvolveram a um volume médio de 100 mm^3 (dia 8), cada grupo de camundongos recebeu a administração, durante três semanas, como tabulada na tabela abaixo: Composto 25 (2,5 mg/ml em 10% de PEG; via de administração– i.p.) e Taxol (1 mg/ml em 5% de EtOH, 5% de Cremóforo e 90% de solução salina; administração - i.v. 2 h após a administração do Composto 25). O peso corporal e volumes de tumor foram medidos como descrito no Exemplo 47 acima.

Protocolo de tratamento

Grupo (n = 10)	Tratamento	Dose (mg/kg)	Regime
1a*	não aplicável (NA)	NA	NA
1b*	solução salina	NA	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
2	veículo	NA	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
3	Composto 25	25	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
4	Composto 25	50	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
5	Composto 25	100	(q7d x 1)/semana x 2 semanas
6	Taxol	NA	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
7	Composto 25	25	(q1d x 5)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
8	Composto 25	50	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
9	Composto 25	100	(q7d x 1)/semana x 2 semanas
	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 2 semanas

Grupos 1a e 1b, n = 5;
q1d/qd = diariamente; q2d = a cada 2° dia; q7d = a cada 7° dia.

Resultados são apresentados na Tabela X2 com base na medição do volume do tumor no dia 29 quando camundongos tratados com

veículo atingiram um volume de 946 mm^3. Grupos de 5 camundongos que receberam saline ou nenhum tratamento foram adicionados para indicar quaisquer efeitos do veículo, mas não são usados para comparações nesta análise.

Grupo	% de inibição vs	
	Grupo 2	Grupo 6
3	50,1	-
4	52	-
5	46,7	-
7	65,9	38,8
8	63,1	31,7
9	52,6	12,5
6	46	-

Os resultados demonstram que todos os três regimes para dosagem do Composto 25 proporcionaram graus similares de inibição do crescimento do tumor, e que a terapia de combinação, particularmente com dosagem diária, proporcionou benefício adicional. Cada terapia de combinação foi associada com algum grau de perda de peso, mas não suficientemente grande para causar qualquer mortalidade. De uma maneira geral, resultados indicam que o Composto 25 é eficaz neste modelo de câncer do pulmão e que proporciona benefício adicional àquele proporci9onado pelo agente quimioterápico convencional, taxol.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado numa dose terapeuticamente eficaz de cerca de 2 a cerca de 8 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pulmonar, sozinho ou em combinação com Taxol™, em que a dose diária pode ser administrada com uma freqüência menor de dosagem para doses maiores em comparação com doses menores.

Exemplo 49

Exemplo 49 descreve a utilidade de um composto desta invenção no tratamento de câncer como demonstrada empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma de pulmão de células não-pequenas H460 em camundongo. Camundongos CB17/SCID fêmeas (adquiridos da

Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de pulmão de células não-pequenas humano NCI H460 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e colhidas como descrito no Exemplo 47 acima, e inoculadas a 3 x 10^6 células/ animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3 (dia 8), cada grupo de camundongos (dez por grupo) recebeu a administração, durante três semanas, como tabulado na tabela abaixo: Composto 25 (2,5mg/ml em 10% de PEG; via de administração – i.p.); Composto 24 (0,3, 0,1mg/ml em 10% de PEG, via de administração - i.p.) e Taxol (1 mg/ml em 5% de EtOH, 5% de Cremóforo e 90% de solução salina; administração - i.v. 2 h após administração do composto de teste).

Protocolo de tratamento

Grupo	nº de camundongos	Tratamento	Dose (mg/kg)	Regime
1	10	veículo*	NA	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
2	8	Taxol	10	(q2d x 3)/semana x 3 semanas
3	8	Composto 24	3	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas
4	9	Composto 24 Taxol	1 10	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas (q2d x 3)/semana x 2 semanas
5	8	Composto 24 Taxol	3 10	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas (q2d x 3)/semana x 2 semanas
6	8	Composto 25 Taxol	25 10	(q1d x 5d)/semana x 3 semanas (q2d x 3)/semana x 2 semanas

* - 50% PEG

O peso corporal e volume do tumor foram determinados como descrito no Exemplo 47 acima. Resultados para inibição de crescimento do tumor medida no dia 27 encontram-se tabulados abaixo. Comparações foram realizadas no dia 27 porque esse foi o último dia de medições para o grupo de veículo e aqueles animais foram sacrificados.

Grupo	% de inibição vs	
	Grupo 1	Grupo 2
3	39,9	-
4	16	-32,7
5	51,5	23,3
6	56,8	31,7
2	36,7	-

Estes resultados demonstram que doses diárias de 3 mg/kg de Composto 24 e 25 mg/kg de Composto 25 inibiram crescimento de tumor e que Composto 25 apresentou um benefício ligeiramente maior tanto como monoterapia e em combinação com taxol. Estes efeitos foram acompanhados por meio de redução branda de peso, particularmente no grupo de Composto 25 + taxol.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado numa dose terapeuticamente eficaz de 2 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pulmonar, sozinho ou em combinação com Taxol™, e Composto 24 pode ser administrado numa dose terapeuticamente eficaz de 0,25 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pulmonar, sozinho ou em combinação com Taxol™.

Exemplo 50

Exemplo 50 descreve a utilidade de um composto desta invenção no tratamento de câncer como demonstrada empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma de colo humano HT-29 em camundongo. Camundongos CB17/SCID fêmeas (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhas de células de carcinoma de colo humano HT29 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivada e colhidas como descrito no Exemplo 47 acima, e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3 (dia 8), cada grupo de camundongos (dez por grupo) recebeu administração durante três semanas, como tabulado na tabela abaixo: Composto 24 (em 10% de PEG), via de administração - i.p., administrada 2 h antes de 5-FU ou cisplatina (CDDP; em solução salina) nos dias em que a terapia de combinação fora programada; 5FU sozinho (em solução salina), ou CDDP apenas.

Protocolo de tratamento

Grupo	nº de camundongos	Artigo de teste	Dose (mg/kg)	Vias, Regimes
1*	8	solução salina	10 ml/kg	iv, q3d x 4
2*	8	5-FU	50	iv, q3d x 4
3*	4	sem tratamento	N/A	N/A
4**	9	veículo (solução salina)	10 ml/kg	ip, (q1d x 5)/semana x 3 semanas
5**	9	5-FU	50	iv, q3d x 4
6**	9	CDDP	5	iv, uma só vez
7**	9	Composto 24	3	ip, (q1d x 5)/semana x 3 semanas
8**	9	Composto 24	6	ip, (q1d x 5)/semana x 3 semanas
9**	9	Composto 24	6	ip, (q1d x 5)/semana x 2 semanas
		5-FU	50	iv, q3d x 4
10**	9	Composto 24	3	ip, (q1d x 5)/semana x 3 semanas
		CDDP	5	iv, apenas uma vez
11**	9	Composto 24	6	ip, (q1d x 5)/semana x 3 semanas
		CDDP	5	iv, apenas uma vez
12**	8	sem tratamento	N/A	N/A

* - flanco de localização do tumor; ** - peritôneo de localização do tumor;
Q3d = a cada 3° dia

Em grupos de controle, tumores foram implantados em dois sítios com parte de um estudo separado de efeito da localização sobre o crescimento do tumor no grupo de controle. Estes resultados não tiveram impacto sobre a interpenetração do estudo e todos os tratamentos foram comparados com o grupo de veículo, em que tumores no mesmo são do corpo. O peso corporal e o volume do tumor foram medidos como descrito no Exemplo 47. Inibição do crescimento do tumor medida no dia 25 quando tumores no veículo atingiram o tamanho máximo e animais naquele grupo foram sacrificados, encontra-se tabulada abaixo.

Grupo	% de inibição vs	
	Grupo 4	Grupo 6
7	44,1	-
8	42,1	-
9	71,1	28,9
10	53,2	24,8
11	50,7	20,9
5	59,3	-
6	37,4	-

Os resultados demonstram que Composto 24 como monoterapia resultou em inibição do crescimento do tumor ligeiramente acima de 40%, enquanto que combinando-se Composto 24 administrado em combinação com CDDP ou 5FU, obteve-se cerca de 50 a 70% de inibição do

tumor. De acordo com este Exemplo, a combinação terapeuticamente mais eficaz foi aquela do Composto 24 e 5FU. Os efeitos sobre o crescimento de tumor foram associados com diminuições menores dos pesos dos camundongos durante o tratamento; no entanto, os camundongos recuperaram a perda de peso após o término do tratamento.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, o Composto 24 pode ser administrado numa dose terapeuticamente eficaz de cerca de 0,25 a cerca de 0,50 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer do colo, sozinho ou em combinação com 5FU ou CDDP.

Exemplo 51

Exemplo 51 descreve a utilidade de um composto desta invenção no tratamento de câncer como demonstrado empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma de pulmão de células não-pequenas H460 em camundongo. Camundongos CB17/SCID fêmeas (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma do pulmão de células não-pequenas humano NCI H460 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e colhidas como descrito no Exemplo 47 acima, e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3, iniciou-se tratamento em que grupos de 10 camundongos receberam veículo (Grupo 1), CDDP a 3 ou 6 mg/kg (Grupos 2 e 3, respectivamente, IV uma vez), Composto 25 a 50 mg/kg em solução salina 5 vezes por semana durante duas semanas (Grupo 4), Composto 25 a 100 mg/kg a cada três dias durante 5 vezes (Grupo 5) ou a combinação de cada dose de Composto 25 com 3 ou 6 mg/kg de CDDP (Grupos 6 e 7, respectivamente). Resultados para grupos que recebem 50 mg/kg de Composto 25 são ilustrados

na Figura 1. A Figura 2 mostra resultados similares para 100 mg/kg de Composto 25.

Estes resultados realizados com uma versão formulada com solução salina de Composto 25 demonstram significativa diminuição do volume do tumor que é relacionada com a dose, e aumento do retardo do crescimento do tumor com uma dose diária de 50 mg/kg, e 100 mg/kg com dosagem menos freqüente em comparação com aquela empregada para a dose diária de 50 mg/kg. Estes dados também demonstram que ambos os regimes de dosagem adicionam aos efeitos de CDDP neste modelo.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado numa dose terapeuticamente eficaz de cerca de 4 a cerca de 8 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pulmonar, sozinho ou em combinação com 5FU ou CDDP, em que a dose diária pode ser administrada com uma freqüência decrescente de dosagem para doses maiores em comparação com doses menores.

Exemplo 52

Exemplo 52 descreve a utilidade de um composto desta invenção para tratar câncer como demonstrado empregando-se um Modelo de enxerto exógeno de carcinoma de colo humano HT-29 em camundongo. Camundongos CB17/SCID fêmeas (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de colo humano HT29 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e colhidas como descrito no Exemplo 47 e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm (dia 8), cada grupo de camundongos (dez por grupo) recebeu administração durante três semanas, como tabulado na tabela abaixo: Composto 25 em solução salina, via de administração - i.p., administrado 2 h

antes de CDDP nos dias em que a terapia de combinação é programada e CDDP (em solução salina, IV).

Protocolo de tratamento

Grupo (n = 9)	Artigo de teste	Dose (mg/kg)	Regimes de administração
1	saline	10 ml/kg	(qd x 5)/semana x 2 semanas
2	CDDP	5	uma vez
3	Composto 25	50	(qd x 5)/semana x 2 semanas
4	Composto 25	100	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
5	Composto 25	100	Q3d x 5
6	Composto 25	100	Q7d x 2
7	Composto 25	50	(qd x r)/semana x 2 semanas
	CDDP	5	uma vez
8	Composto 25	100	(q2d x 3)/semana x 2 semanas
	CDDP	5	uma vez
9	Composto 25	100	q3d x 5
	CDDP	5	uma vez
10	Composto 25	100	q7d x e
	CDDP	5	uma vez

O peso corporal e volume do tumor foi determinado como descrito no Exemplo 47. Dados baseiam-se em volumes de tumor no dia 25 quando tumores no grupo de veículo haviam atingido tamanho suficiente para tornar necessário sacrificar os camundongos. Os resultados da inibição de crescimento de tumor encontram-se tabulados abaixo.

Grupo	% de inibição vs	
	Grupo 1	Grupo 2
3	28,2	-
4	30,1	-
5	31,3	-
6	48,1	-
7	50,7	30,8
8	44,2	27,5
9	36,2	21,5
10	51,8	33,2
2	24,2	-

Os resultados demonstram que monoterapia administrando Composto 25, formulado em solução salina, a 50mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia com uma variedade de regimes de dosagem resulta em inibição de crescimento do tumor neste modelo de câncer do colo, e que tratamento de combinação do Composto 25 e CDDP incrementou a efetividade do Composto 25 para tratamento de câncer do colo neste modelo. Este efeitos

foram acompanhados pela perda modesta de peso corporal, tanto mais em grupos de combinação; os camundongos recuperaram os pesos corporais perdidos após o término do tratamento.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado a uma dose terapeuticamente eficaz de cerca de 4 a cerca de 8 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pulmonar de células não-pequenas, sozinho ou em combinação com CDDP, em que a dose diária pode ser administrada com uma freqüência decrescente de dosagem no caso de doses mais elevadas, em comparação com doses menores.

Exemplo 53

Exemplo 53 descreve a utilidade de um composto desta invenção para tratar câncer como demonstrado empregando-se um modelo de enxerto exógeno de carcinoma do pulmão de células não-pequenas H460 em camundongo. Camundongos CB17/SCID fêmeas (adquirido da Charles River, Cambridge, MA), com de 7 a 8 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de colo humano NCI H460 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e colhidas como descrito no Exemplo 47 e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3, iniciou-se o tratamento em que grupos de 10 camundongos receberam veículo (Grupo 1), CDDP a 6 mg/kg (IV uma vez, Grupo 2), Composto 25 a 150 mg/kg em solução salina, uma vez por semana durante duas semanas (i.p., Grupo 3), ou a combinação dos dois agentes (Grupo 4).

Os resultados mostrados na Figura 3 demonstram que 150 mg/kg por semana de Composto 25 proporcionaram maior redução do tamanho do tumor do que CDDP sozinho e que a combinação dos dois

agentes resultou em benefício adicional. Estes resultados também indicam que durante o período de duas semanas de dosagem o volume médio do tumor não se modificou, indicando a inibição completa do crescimento tumoral. Estes dados indicam que o Composto 25 administrado a 150 mg/kg/dia como monoterapia, uma vez por semana, é o regime de dosagem mais efetivo descrito nos exemplos precedentes (Exemplos de 47 a 52). Observou-se pouca alteração do peso corporal, sugerindo reduzida toxicidade com este regime de dosagem.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado a uma dose terapeuticamente eficaz de cerca de 12 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, opcionalmente administrado numa freqüência de uma vez por semana, particularmente câncer pulmonar de células não-pequenas, sozinho ou em combinação com CDDP.

Exemplo 54

Exemplo 54 descreve a eficácia do Composto 25 via uma injeção de bolo ip ou infusão ip apenas ou em combinação com Cisplatina no modelo de enxerto exógeno de H460 em camundongo. Camundongos nu/nu homozigóticos fêmeas Nu-Foxnl^{nu} (adquiridos da Charles River, Cambridge, MA), com 6 semanas de vida, foram deixados aclimatar durante pelo menos três dias, e manuseados em condições isentas de patógeno. A linhagem de células de carcinoma de colo humano HT29 foi obtida da *American Type Culture Collection*. As linhas de células foram cultivadas e colhidas como descrito no Exemplo 47 e inoculadas a 3 x 10^6 células/animal no espaço subcutâneo peritoneal. Quando os tumores cresceram a um volume médio de 100 mm^3 (dia 8), cada grupo de camundongos (dez por grupo) recebeu administração durante três semanas, como tabulado na tabela abaixo: Composto 25 (formulado como uma solução salina a 15 mg/ml, via de administração – i.p., administrado 2 h antes de CDDP nos dias em que a terapia de combinação é programada e CDDP em solução salina, IV.

Protocolo de tratamento

Grupo	Artigo de teste	Dose (mg/kg)	Regimes	Concentração da dose: Volume da dose
1	solução salina	10	Q7d x 2	0 mg/ml: 10 ml/kg
2	CDDP	6	Q7d x 2	0,6 mg/ml: 10 ml/kg
3	Composto 25	150	Q7d x 2	15 mg/ml: 10 ml/kg
4	Composto 25 DDP	150 6	q7d x 2 q7d x 2	15 mg/ml: 10 ml/kg 0,6 mg/ml: 10 ml/kg
5	Composto 25	150		1 mg/ml: 15 ml/kg
6	solução salina	0,2 ml	200 µl - 1 semana x 2*	0 mg/ml: 1 µl/h
7	Composto 25	15 mg/ml	200 µl - 1 semana x 2*	15 mg/ml: 1 µl/h

* - Bomba Alze, 200 µl durante 1 semana x 2 (re-implantar bomba nova ao fim de uma semana).

O peso corporal e volume do tumor foram determinados como descrito no Exemplo 47. Os resultados são indicados na Figura 4. Os dados indicam que, embora aplicação contínua do Composto 25 sozinho ou em combinação com CDDP seja eficaz, dosagem intermitente, como uma vez por semana, pode proporcionar maior benefício terapêutico no tratamento de determinados cânceres, como câncer pulmonar de células não-pequenas.

Exemplo 55

Terapia de combinação de Composto 25 e Gemcitabina

Uma combinação de Composto 25 e gemcitabina foi administrada a camundongos nus que apresentavam tumores derivados de células de câncer pancreático humano de tipo MiPaca2. Tumor MiaPaca-2 é um tumor altamente invasivo, de crescimento rápido, que resulta em morte dentro de 20 a 30 dias em animais não tratados. As células de tumor foram transfectadas com o gene para proteína fluorescente vermelha. Camundongos receberam administração de doses de controle de veículo, gemcitabina, Composto 25, Composto 24, ou combinações de gemcitabina/Composto 25 ou gemcitabina/Composto 24, por via intraperitoneal, como tabulado abaixo (8 camundongos/grupo). Compostos 24 e 25 foram formulados em solução salina e proporcionados pela Threshold Pharmaceuticals, Inc. como um pó seco. Gemcitabina foi obtida comercialmente e preparada recentemente de acordo com instruções do fabricante.

Protocolo de tratamento

Grupo	Composto	Dose (mg/kg)	Programa
1	veículo	10 ml/kg	(qd* x 5)/semana durante 2 semanas
2	Gemcitabina	200	qw* x 3 semanas
3	Composto 25	30	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
4	Composto 24	6	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
5	Gemcitabina	200	qw x 3 semanas
	Composto 25	30	(qd x 5)/semana durante 2 semanas
6	Gemcitabina	200	qw x 3 semanas
	Composto 24	6	(qd x 5)/semana durante 2 semanas

* qd = diariamente; qw = semanalmente

Tumores foram observados por meio de diagnóstico de imagem uma vez por semana até o término do estudo, em que neste momento se obteve imagens de corpo aberto para confirmar os efeitos. No Grupo 1, os tumores cresceram rapidamente (Figura 5) e resultaram em 100% de letalidade por volta do dia 30 (Figura 6).

Grupos 3 e 4 resultaram em efeitos menores sobre o volume do tumor e apresentaram pouco efeito sobre a sobrevida. Grupo 2 reduziu significamente o volume do tumor e prolongou a sobrevida. Grupo 6 proporcionou redução modesta no tamanho do tumor, mas sem efeitos adicionais sobre a sobrevida. Em contraste, Grupo 5 demonstrou crescimento de tumor significativamente reduzido e prolongou significativamente a sobrevida em comparação com o Grupo 2, cinco de 8 tumores no Grupo 5 regrediram rapidamente após tratamento e, dentro de um curto período, falharam em emitir fluorescência (Figura 7).

Quatro destes tumores permaneceram em fluorescência zero até o término do experimento e os tumores foram considerados curados. No Grupo 2 não se considerou tumores como curados. Estes resultados demonstram que tratamento de combinação com Composto 25 e gemcitabina apresenta maior benefício neste modelo de câncer em comparação com monoterapia com a gemcitabina convencional. Estes resultados demonstram que a redução de tumor em animais que receberam uma combinação de Composto 25 a 30 mg/mg/dia e gemcitabina é significativamente maior do que em animais tratados com gemcitabina como um agente único.

Usando-se a conversão de camundongo para HED, Composto 25 pode ser administrado a uma dose terapeuticamente eficaz de cerca de 2,5 mg/kg/dia, para o tratamento de câncer, particularmente câncer pancreático, em combinação com gemcitabina.

Exemplo 56

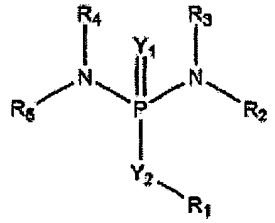
Reconhece-se que moléculas eficazes para tratamento de doenças humanas, incluindo câncer, podem ser tóxicas em doses próximas ou, por vezes até muito maiores, do que doses necessárias para se obter efeitos benéficos. Para determinar a dose apropriada e a via de administração de um composto do tipo referido, é necessário compreender sua toxicidade. Rotineiramente, abordagens inicias para determinar a dose tóxica envolvem o uso de roedores, como camundongos, para proporcionar dados preliminares que poderiam corroborar o projeto de estudos similares em animais maiores e em humanos. Compostos de teste (Compostos 24, 25 e 36) foram testados em camundongos como experimentos preliminares para determinar doses a serem usadas em animais maiores. Composto 25 foi testados em doses tão altas quanto de 300 mg/kg como uma dose única, e verificou-se que causam toxicidades renais, como necrose tubular e derramamento de proteína na urina. Reduções transientes em células sanguíneas brancas também foram observadas. No entanto, observou-se pouca toxicidade em doses mais baixas (100 e 200 mg/kg). Estas doses selecionadas representam uma aproximação das doses que poderiam ser usadas em animais maiores, como ratos e cães, com o fim de confirmar que referidas toxicidades existem, e para predizer se a função frenal deveria ser medida em humanos.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhe com referência a concretizações específicas, aqueles versados na técnica perceberão que modificações e melhoramentos encontram-se na abrangência do escopo e espírito da invenção, como apresentada nas reivindicações a seguir. Todas as publicações e documentos de patentes (patentes, pedidos de

patentes publicados, e pedidos de patentes não-publicados) aqui mencionados são incorporados aqui por referência como se cada publicação ou documento houvesse sido indicado especificamente e individualmente como incorporado aqui por referência. Citação de publicações e documentos de patentes não se destinam a representar uma admissão de que qualquer documento do tipo referido é pertinente ao estado da técnica, nem constitui qualquer admissão quanto ao teor ou dada dos mesmos. A invenção apresentada agora foi descrita com a descrição escrita e exemplos, em que aqueles versados na técnica perceberão que a invenção pode ser praticada numa variedade de concretizações e que a descrição precedente e os exemplos são para fins de ilustração e não de limitação das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (I):



(I)

em que

Y_1 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6

Y_2 é O, S, NR_6, $NCOR_6$, ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente (C_1-C_6) alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, ou heteroarila;

cada um de R_1-R_5 é independentemente hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla ou heteroaroíla; ou, em conjunto com quaisquer dois de R_1-R_5 formam um heterociclo de C_3-C_{10}; ou cada um de R_1-R_5 é independentemente um disparador T de fórmula L-Z_3;

L é selecionado do grupo que consiste de

$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}[C(=O)\text{-}O]_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]_g$; e

$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}(S(=O)_2)_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]_g$;

em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

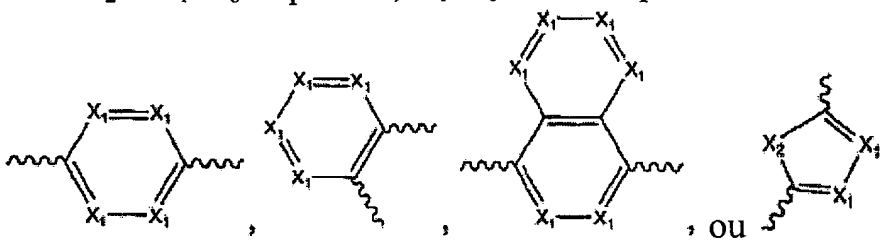
Y_3 é S, O, ou NR_7, em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

Y_4 é O, S, ou $-NR_7\text{-}C(=O)\text{-}O-$;

cada Z_1 e Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, heteroarila, C_3-C_8 cicloalquila,

heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

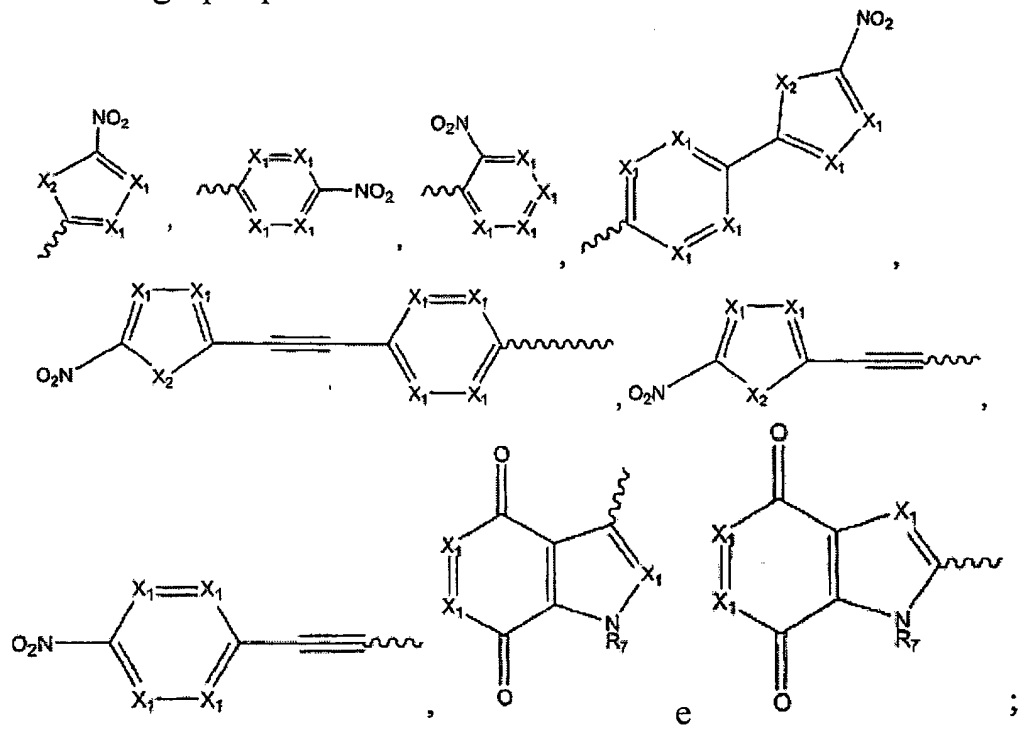
Z_2 é C_1-C_6 alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno,



em que cada X_1 é independentemente N ou CR_8 em que R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, nitro, ciano, CHF_2, CF_3, CO_2H, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, $CON(R_7)_2$, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla ou heteroaroíla;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

Z_3 é um grupo biorredutor apresentando uma fórmula selecionada do grupo que consiste de:



um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato farmaceuticamente aceitável, ou uma pró-droga do mesmos; com a condição de que na fórmula (I):

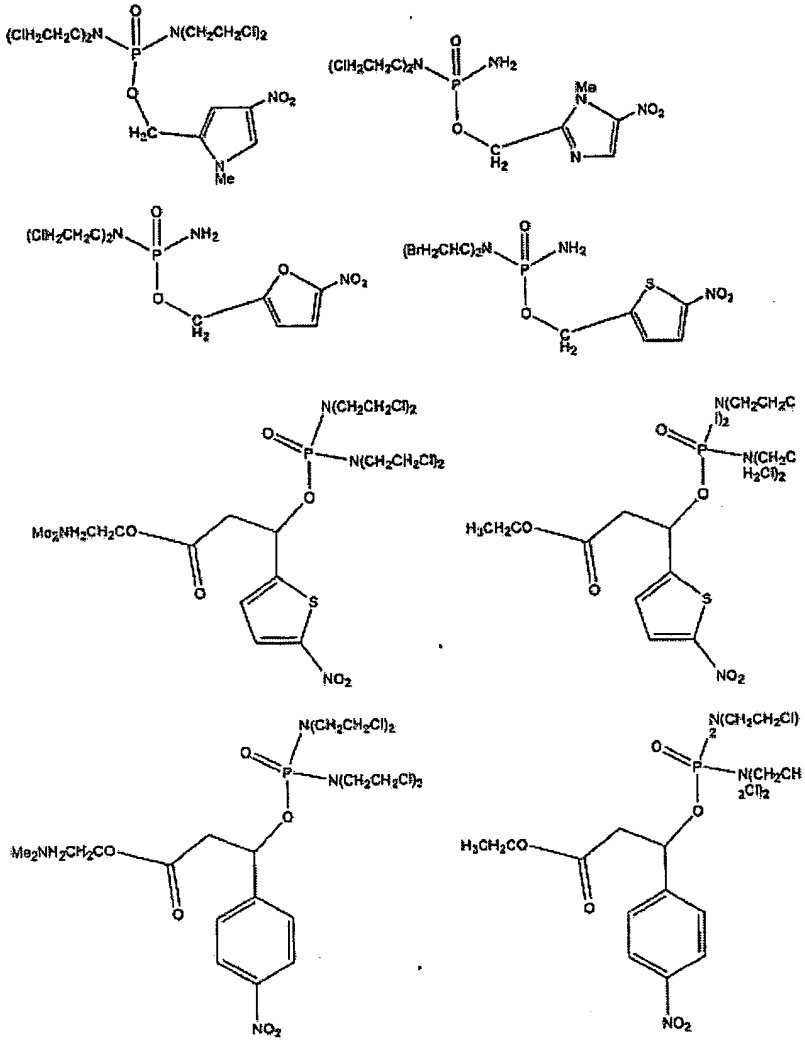
(ia) pelo menos dois de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

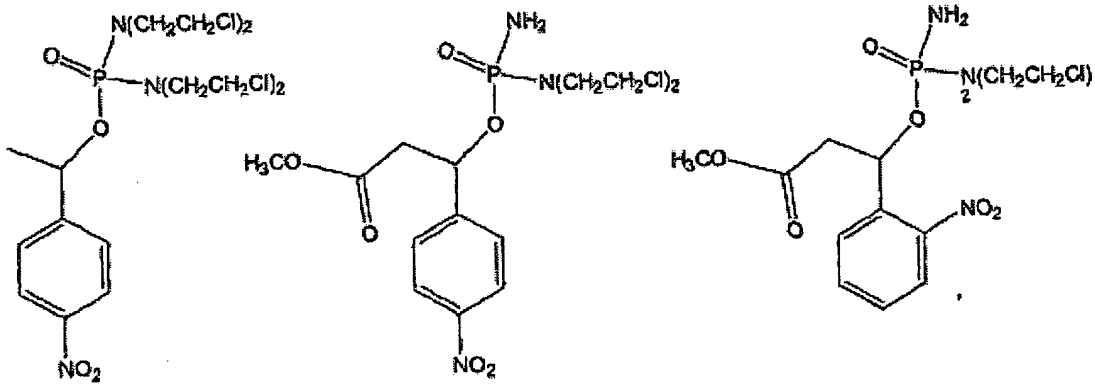
(ib) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 ou NR_4R_5 é , ou

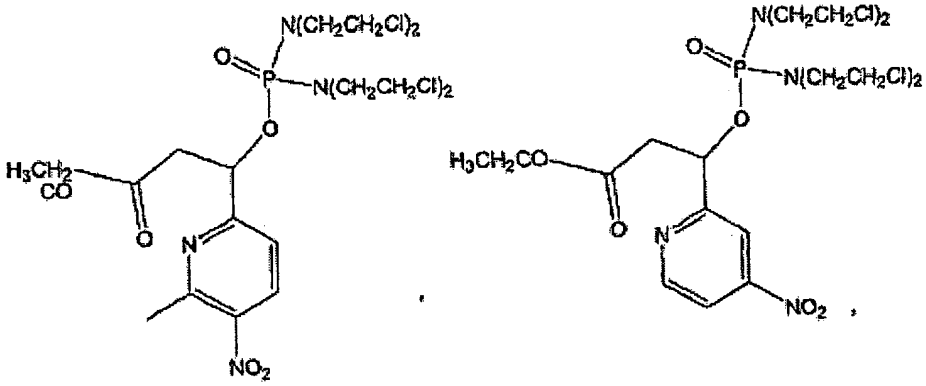
(ic) NR_2R_3 e NR_4R_5 são ; e

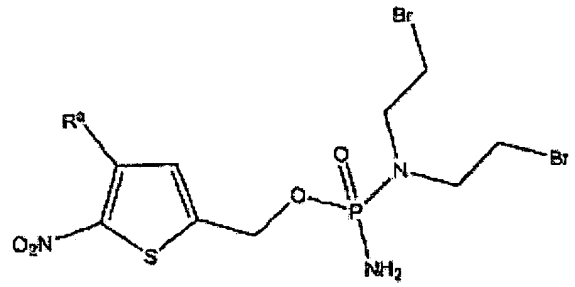
(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é o disparador T; e

(iii) exclui compostos apresentando a fórmula selecionada do grupo que consiste de:

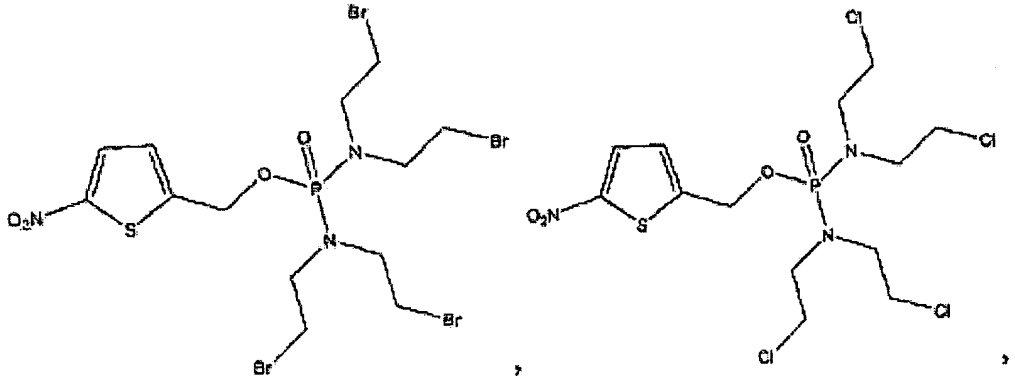


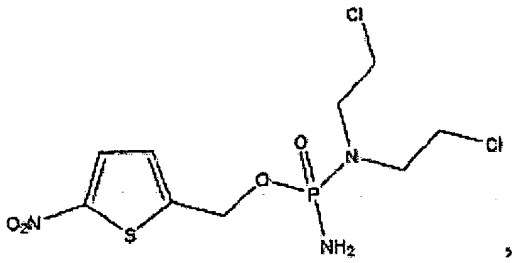


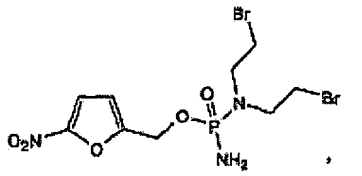
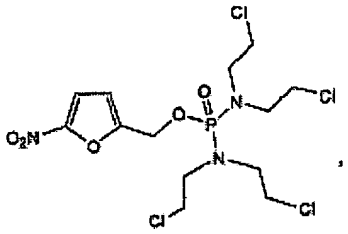
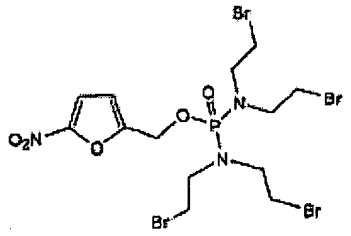
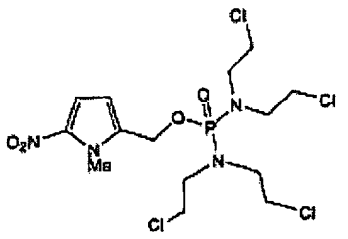
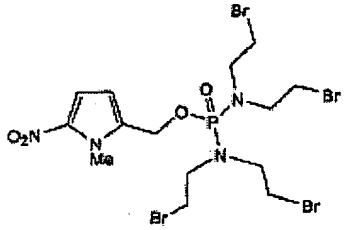
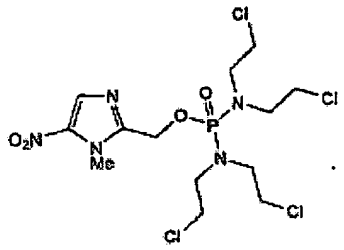
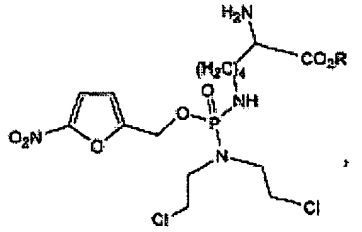
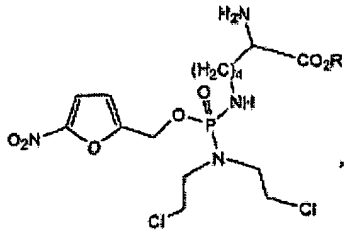




em que R^a é H, Br, NMe_2, CN, ou $CONH_2$,





em que R é H, Me ou alila;

bis[N-metil-N-(2-bromoetil)]fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)-metila,

N,N-bis(2-bromoetil)] fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

bis[N-metil-N-(2-bromoetil)]fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

N,N-bis(2-cloroetil) fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

N,N-bis(2-bromoetil)- fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

N,N-bis(2-bromoetil)- fosforodiamidato de 3-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

bis[N-metil-N-(2-bromoetil)]fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila,

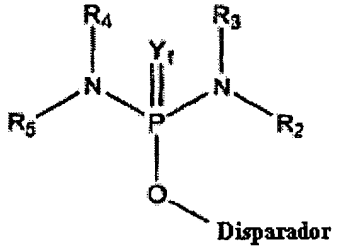
N,N-bis(2-cloroetil)-fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila, e

N,N-bis(2-bromoetil)- fosforodiamidato de 2-(5-metóxi-1-metil-4,7-indolquinonil)metila.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Y_1 e Y_2 é O.

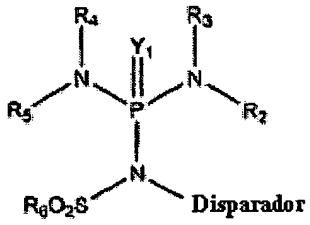
3. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R_1 é T.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (II) ou (III):



(II)

e



(III)

em que cada R_2-R_5 é independentemente hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla; ou, em conjunto com quaisquer dois de R_2-R_5, formam um heterociclo de C_3-C_{10}; em que cada Y_1 é independentemente S ou O;

com a condição de que nas fórmulas (II) ou (III):

(i) pelo menos dois de R_2-R_5 são selecionados dentre 2-haloalquila, 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2- heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_2-R_5 é selecionado dentre 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila,

2-arilsulfoniloxialquila, e

2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é  ou

(iii) NR_2R_3 e NR_4R_5 ambos, em conjunto, são  e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato farmaceuticamente aceitável, ou uma pró-droga dos mesmos.

5. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que L é selecionado do grupo que consiste de:

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}[C(Z_1)_2]_Z\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(ZO_2]_z\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]\text{-}(C(=O)\text{-}O)\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

$[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1=C(Z_1)]\text{-}$;

$-[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]\text{-}$;

e $-[C(Z_1)_2]_z\text{-}$.

6. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que L é $-[C(Z_1)_2]_z\text{-}$.

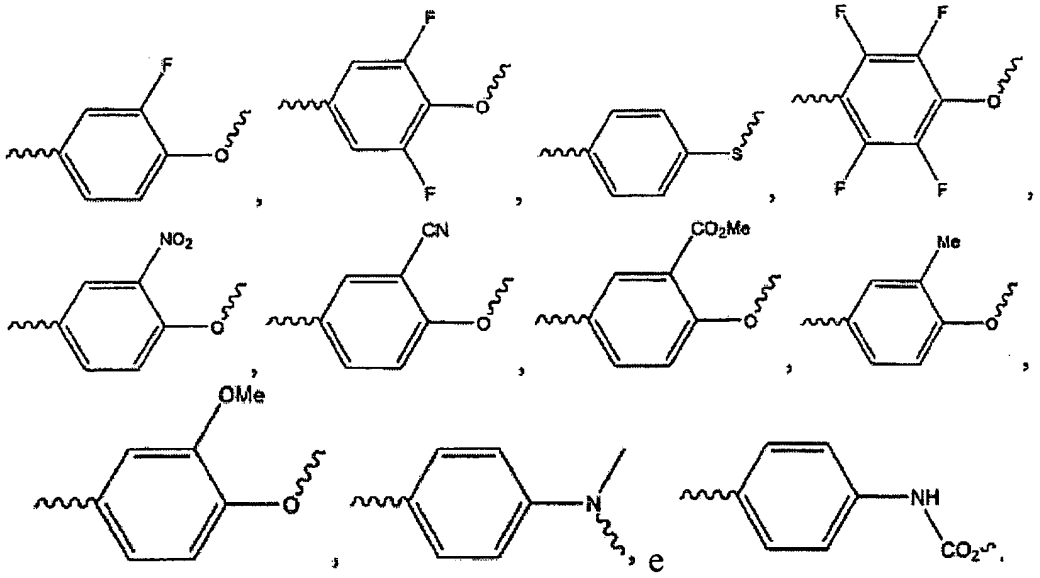
7. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que cada $-C(Z_1)_2\text{-}$ é independentemente:

$-CH_2\text{-}$, $-CHMe\text{-}$, $-CH(CN)\text{-}$, $-CH(CO_2H)\text{-}$, $-CH(CONH_2)\text{-}$, $-CH(CF_3)\text{-}$, $-CH(CHF_2)\text{-}$,$-C(Me)_2\text{-}$, $-C(Et)_2\text{-}$, $-CH(CH_2NMe_2)\text{-}$, $-CH(CH_2NMe_2)\text{-}$, $-C(CH_2NMe_2)_2\text{-}$, ou $-C(CH_2CO_2H)_2\text{-}$.

8. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que $-C(Z_1)_2\text{-}Y_3\text{-}$ é:

$-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NMe$, $-CH_2-NH-$, CH(Me)-O-, CH(Me)-S-; -CH(Me)-NMe-,-CH(Me)-NH-; $-CMe_2-NMe-$, $-CMe_2-NMe-$, ou $-CMe_2-NMe-$.

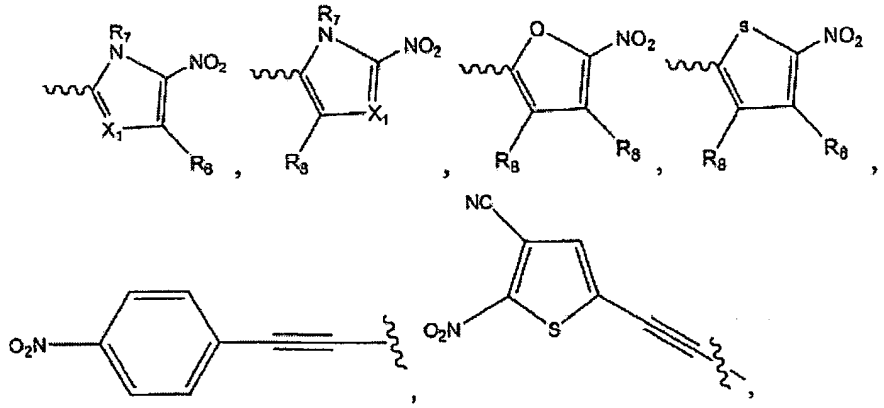
9. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que $-Z_2-Y_4-$ conjuntamente é selecionado do grupo que consiste de:

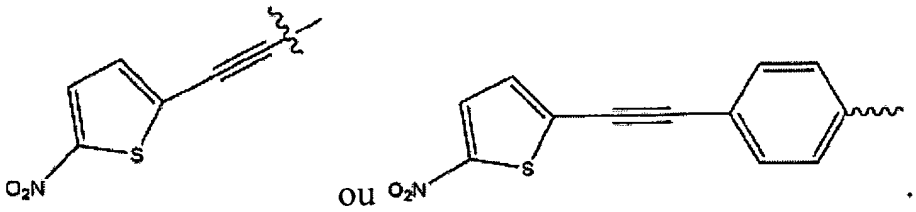


10. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que $-[C(Z_1)=C(Z_1)]-$ é:

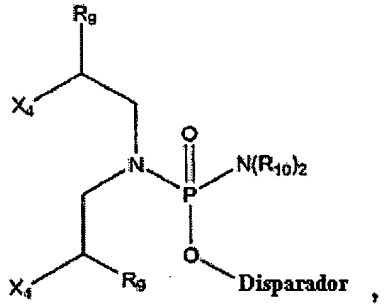
-CH=CH-, -C(CN)=CH-, -CH=C(CN)-, -C(Ar)=CH-, -CH=CAr-, $-C(COAr)=CH-$,$-CH=C(COAr)-$, $-C(COR_{12})=CH-$ ou $-CH=C(COR_{12})-$ em que Ar é arila e R_{12} é independentemente hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, ou heterociclila.

11. Composto de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o Z_3 é selecionado do grupo que consiste de:

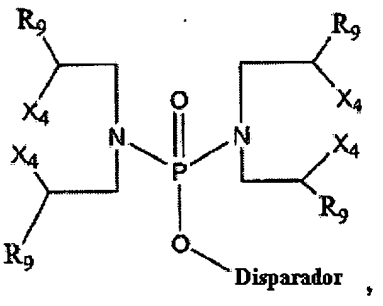




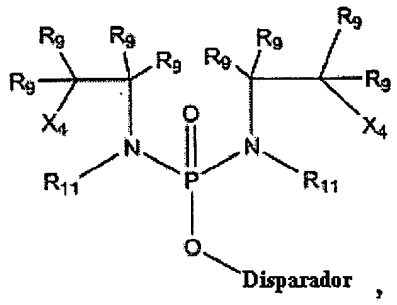
12. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (IV), (V), (VI) ou (VII):



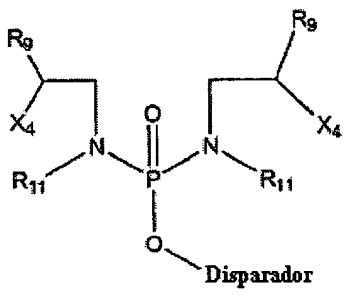
(IV)



(V)



(VI)



(VII)

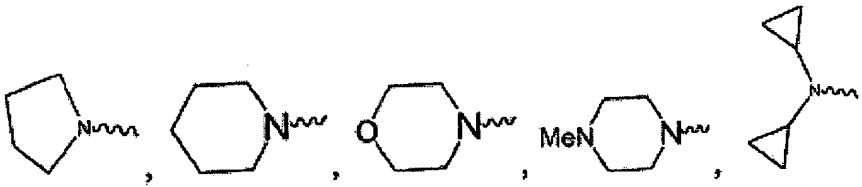
em que cada R_9 é independentemente hidrogênio, arila, heteroarila, C_1-C_4 alquila, C_1- C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla ou heteroaroíla, C_1-C_6 alcoxicarbonila, C_1-C_6 alquilaminocarbonila, di C_1-C_6 alquilaminocarbonila ou C_1-C_6 alcóxi;

cada R_{10} é hidrogênio, C_1-C_6 alquila ou heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, arila, heteroarila, ou, em conjunto, dois R_{10} formam um heterociclo; cada R_{11} é independentemente hidrogênio, arila, heteroarila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, ou C_1-C_6 alcóxi; ou, em conjunto, dois R_{11} formam um heterociclo; com a condição de que quando cada R_{11} é independentemente C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, então R_{11} exclui



X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroalquilsulfonilóxi.

13. Composto de acordo com a reivindicação 12 de fórmula (IV), caracterizado pelo fato de que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila; e $N(R_{10})_2$ é selecionado dentre NH_2, NHMe, NMe_2, NEt_2,



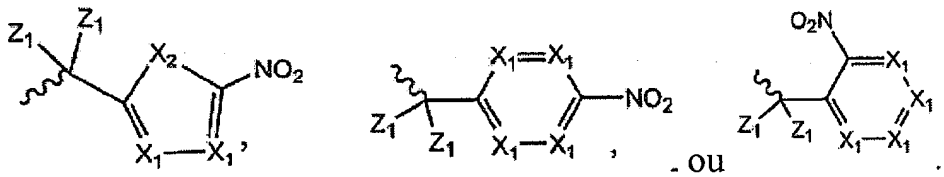
, NHOMe, e NHOH.

14. Composto de acordo com a reivindicação 12 de fórmula (V), caracterizado pelo fato de que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila.

15. Composto de acordo com a reivindicação 12 de fórmula (VI), caracterizado pelo fato de que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila e R_{11} hidrogênio ou metila.

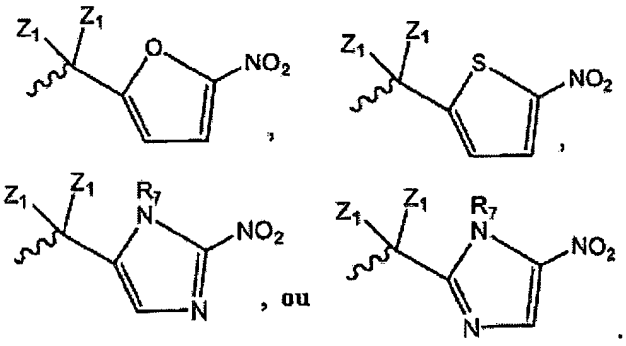
16. Composto de acordo com a reivindicação 12 de fórmula (VII) caracterizado pelo fato de que cada R_9 é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, ou ciclopropila; e cada R_{11} é independentemente hidrogênio, metila, etila, propila, isopropila, benzila, metila, ciclopropila, metóxi, e hidroxila substituída; ou, em conjunto, dois R_{11} formam um heterociclo.

17. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que T tem a fórmula:



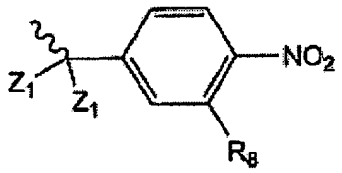
ou

18. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que T tem a fórmula:



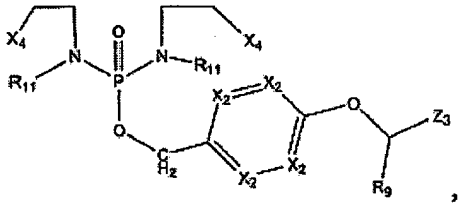
em que cada Z_1 é independentemente H ou C_1-C_6 alquila.

19. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que T tem a fórmula:

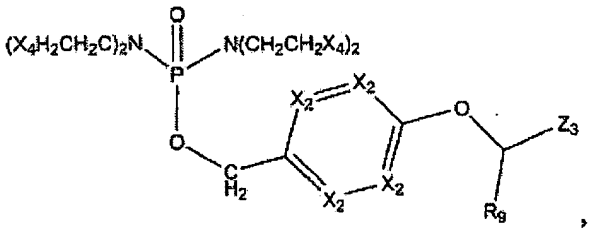


em que cada Z_1 é hidrogênio ou C_1-C_6 alquila e R_8 é H, OH, ou $-OP(=O)(OH)_2$

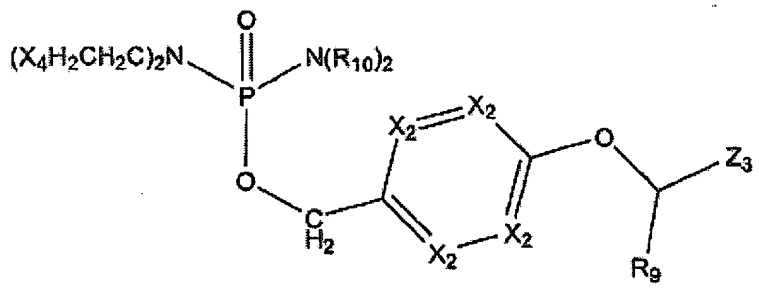
20. Composto de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (VIII), (IX), ou (X):



(VIII)

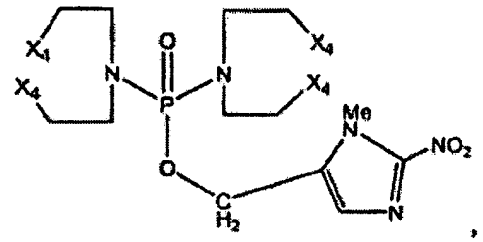


(IX) ou

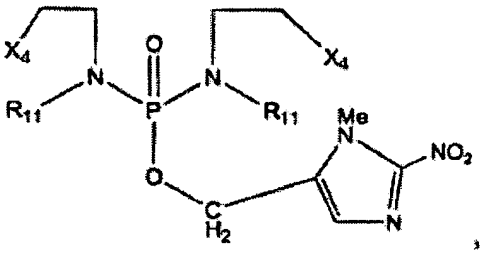


(X)

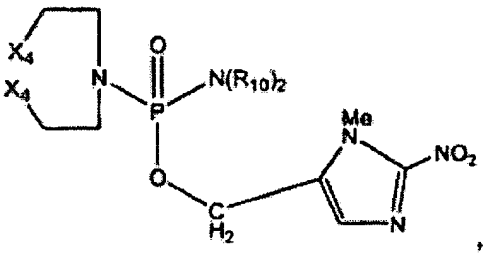
21. Composto de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XI), (XII), (XIII), (XIV), ou (XV):



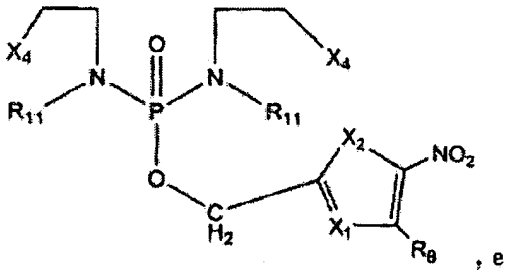
(XI)



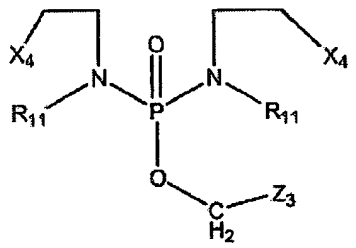
(XII)



(XIII)



(XIV)

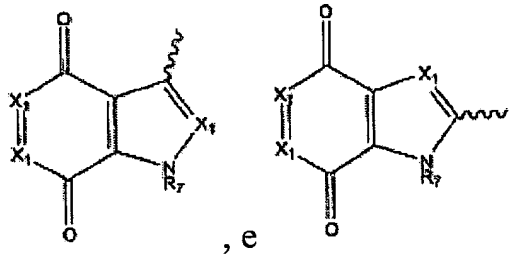


(XV)

em que cada R_{11} é independentemente hidrogênio, metila ou metila substituído, benzila, isopropila, ciclopropila, metóxi, e hidróxi; e X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, cicloalquilsulfonilóxi, heterocicloalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi; com a condição de que

(i) em (XII), (XIV), ou (XV) quando X_4 é Cl ou Br então R_{11} exclui isopropila e

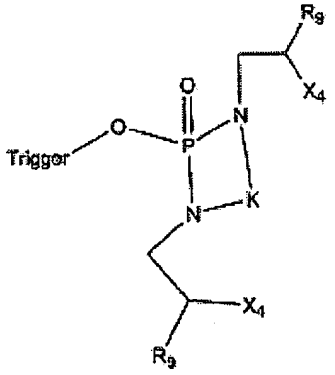
(ii) fórmula (XVIII) exclui um composto em que Z_3 é



, e

22. Composto de acordo com a reivindicação 15 e 21, caracterizado pelo fato de que é de fórmula XII, XIV, ou XV em que cada R_{11} é hidrogênio.

23. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XIX):

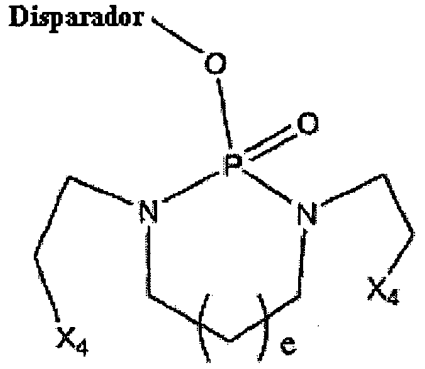


(XVI)

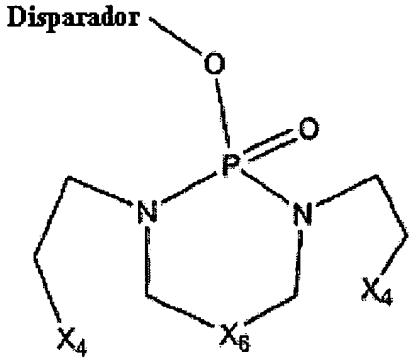
em que K é C_1-C_6 alquileno ou C_1-C_6 heteroalquileno.

24. Composto de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que K é $(C(R_{12})_2)_e$, $CH_2CH_2(-X_6-CH_2CH_2)_f$, ou $CH_2(-X_6-CH_2)_f$ em que e é de 1 a 10, f é de 0 a 3, X_6 é O, S, ou NR_{12} em que cada R_{12} é independentemente hidrogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, ou heterociclila.

25. Composto de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XVII) ou (XVIII):



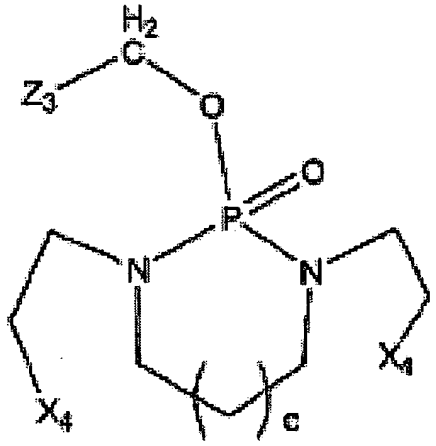
(XVII)



(XVIII)

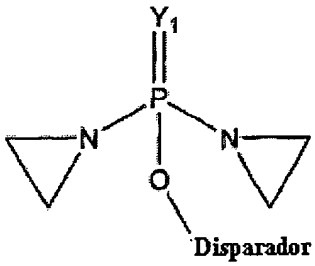
em que e é de 0 a 4, X_4 é Cl ou Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi.

26. Composto de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que é de fórmula:



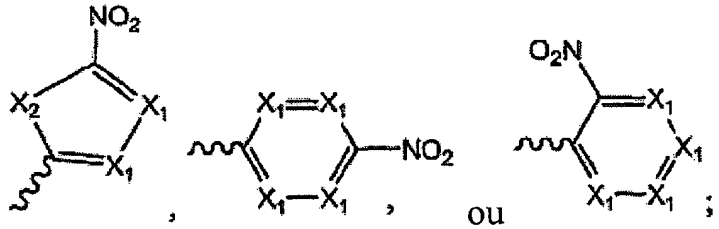
em que e é de 0 a 4, e X_4 é Cl, Br, alquilsulfonilóxi, heteroalquilsulfonilóxi, arilsulfonilóxi, ou heteroarilsulfonilóxi.

27. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XXII):



(XXII)

28. Composto de acordo com a reivindicação 4 de fórmula (II), caracterizado pelo fato de que disparador T é $-CH_2-Z_3$ ou $-CH(Z_1)-Z_3$ em que Z_1 é Q-alquila e Z_3 é:



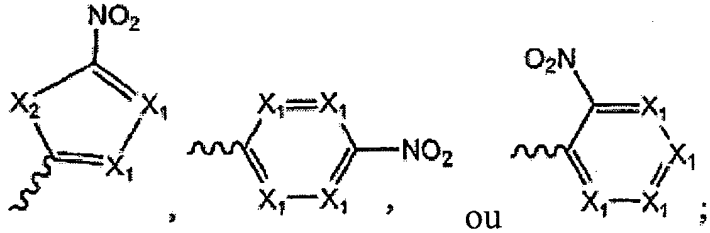
com a condição de que na fórmula (II):

(i) um de R_2 e R_3 é H e um de R_4 e R_5 é H;

(ii) um de R_2 e R_3 é C_1-alquila e um de R_4 e R_5 é C_1-alquila; ou

(iii) pelo menos um de R_2-R_5 seja hidroxila, amino, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, ou aroíla ou heteroaroíla.

29. Composto de acordo com a reivindicação 4 de fórmula (II), caracterizado pelo fato de que Z_3 é um grupo biorredutor selecionado dentre:



com a condição de que na fórmula (I):

(i) pelo menos um de R_1-R_5 são selecionados do grupo que consiste de 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2- heteroalquilsulfoniloxialquila e

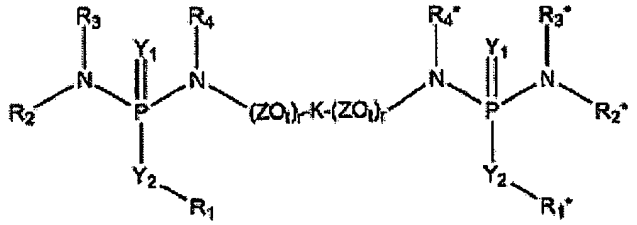
pelo menos um de R_1-R_5 são selecionados do grupo que

consiste de 2-haloalquila, 2- alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; ou

(ii) pelo menos um de R_1-R_5 é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_4R_5 é  ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_4R_5 ambos, em conjunto, são 

30. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula:



em que, Y_1 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6;

Y_2 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente (C_1-C_6) alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, ou heteroarila;

cada R_1-R_4 e R_1^*-R_4* é selecionado independentemente do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, amino, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla; ou, em conjunto com quaisquer dois de R_1-R_4 ou R_1^*-R_4* formam um heterociclo; ou cada R_1-R_4 e R_1-R_4* é independentemente um disparador T selecionado do grupo que consiste de

$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}[C(=O)\text{-}O]_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[\text{-}C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$ e

$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}(S(=O)_2)_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)\text{-}C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$

em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

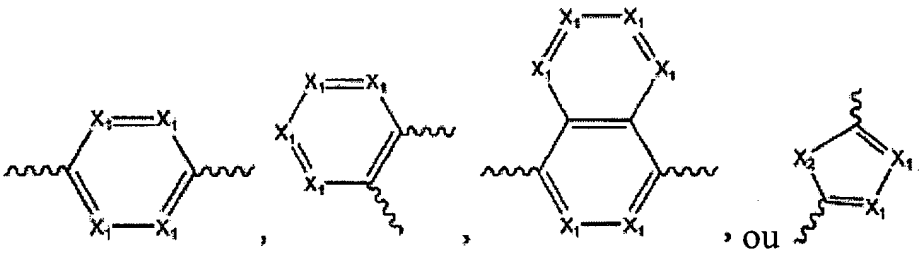
Y_3 é S, O, ou NR_7 em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, C_1- C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila,

heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila;

Y_4 é O, S, ou -NR_7-C(O)-O-;

cada Z_1 e Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, heteroarila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

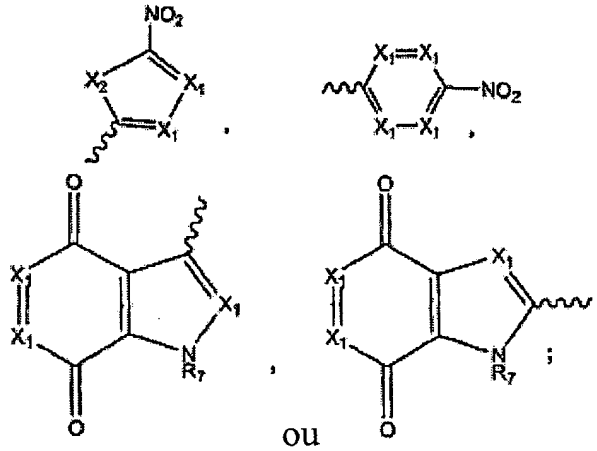
Z_2 é



em que cada X_1 é independentemente N ou CR_8 em que R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, nitro, ciano, CHF_2, CF_3, CO_2H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1- C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, e $CON(R_7)_2$;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

Z_3 é um grupo biorredutor apresentando a fórmula:



cada Z é independentemente C, S, ou P; cada t é independentemente 1 ou 2; cada r é independentemente 0 ou 1;

K é C_1-C_6 alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno, arileno, ou heteroarileno; com a condição de que na fórmula (XXI)

(i) pelo menos um de R_1-R_4 e um R_1^*-R_4^* seja selecionado do

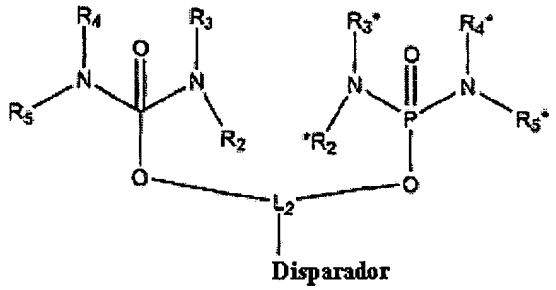
grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2- arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_1-R_4 e R_1*-R_4* seja selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2- arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e um de NR_2R_3 e NR_2*R_3* seja ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_2*R_3* em conjunto, sejam ambos ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato farmaceuticamente aceitável, ou uma pró-droga dos mesmos.

31. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XXI):



(XXI)

em que, Y_1 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6;

Y_2 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, ou heteroarila;

cada R_2-R_5 e R_2*-R_5* é selecionado independentemente do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila; ou, em conjunto com quaisquer dois de R_2*-R_5* formam um heterociclo; ou cada R_2*-R_5* é independentemente um disparador T selecionado do grupo que consiste de

$-[C(Z_1)_2-Y_3]_v-[C(=O)-O]_q-[C(Z_1)_2-Z_2-Y_4]_u-[C(Z_1)_2]_z-[-C(Z_1)=C(Z_1)]_g-Z_3$ e

-[C(Z1)2-Y3]v-(S(=O)2)q-[C(Z1)2-Z2-Y4]u-[C(Z1)2]z-

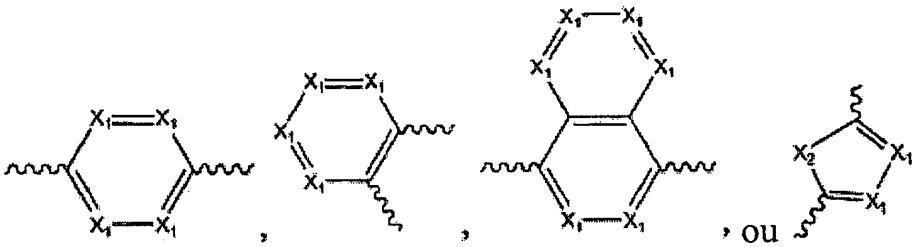
$[C(Z_1)=C(Z_1)]_g$-Z_3 em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

Y_3 é S, O, ou NR_7 em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, heteroarila;

Y_4 é O, S, ou -NR_7-C(=0)-O-;

cada Z_1 e Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, arila, heteroarila, C_3-C_8 cicloalquila, heterociclila, C_1-C_6 acila, C_1-C_6 heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

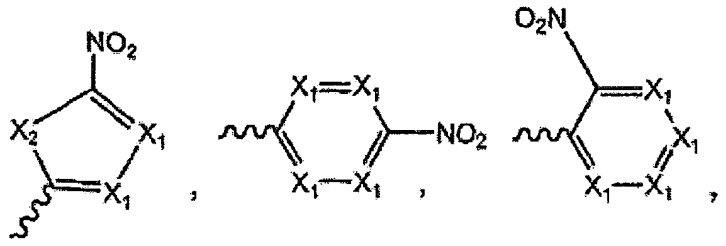
Z_2 é

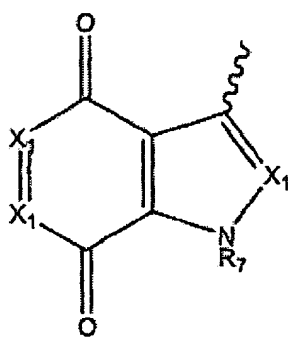
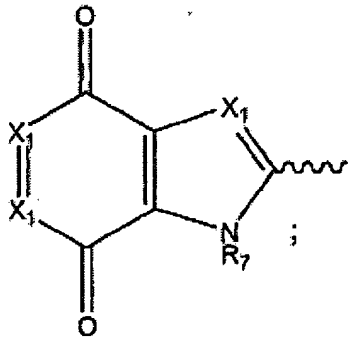


em que cada X_1 é independentemente N ou CR_8 em que R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, nitro, ciano, CHF_2, CF_3, CO_2H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, e $CON(R_7)_2$;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

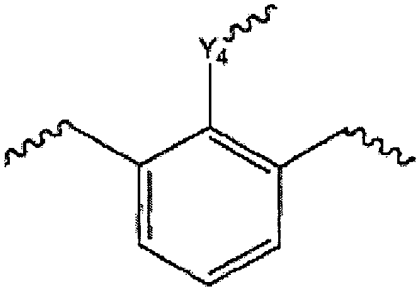
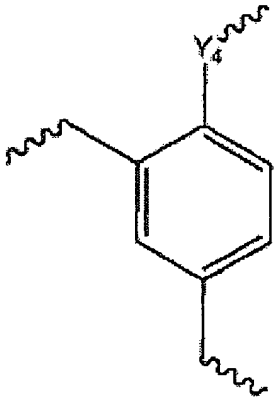
Z_3 é um grupo biorredutor apresentando a fórmula:




,

;

ou

L^2 é

ou

em que Y_4 é definido como acima;

com a condição de que na fórmula (XXII):

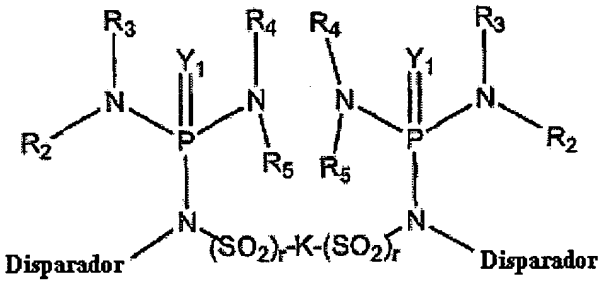
(i) pelo menos um de R_2-R_5 e um de R_2*-R_5* seja selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2- arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_2-R_5 e R_2*-R_5* é selecionado do grupo que consiste de 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2- arilsulfoniloxialquila, e 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e pelo menos um de NR_2R_3 e NR_2*R_3* seja ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_2*R_3* em conjunto, sejam ambos ; e

um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato farmaceuticamente aceitável, ou uma pró-droga dos mesmos.

32. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula (XXVI)



(XXVI)

em que, Y_1 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6;

Y_2 é O, S, NR_6 ou NSO_2R_6 em que cada R_6 é independentemente $(C_1\text{-}C_6)$alquila, $C_1\text{-}C_6$ heteroalquila, arila, ou heteroarila;

cada $R_2\text{-}R_5$ e $R_2^*\text{-}R_5^*$ é selecionado independentemente do grupo que consiste de hidrogênio, hidroxila, $C_1\text{-}C_6$ alquila, $C_1\text{-}C_6$ alcóxi, $C_1\text{-}C_6$ alquilamino, $C_1\text{-}C_6$ dialquilamino, arila, heteroarila; ou, em conjunto com quaisquer dois de $R_2\text{-}R_5$ ou $R_2^*\text{-}R_5^*$ formam um heterociclo;

cada disparador T é selecionado do grupo que consiste de

$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}[C(=O)\text{-}O]_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[\text{-}C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$ e

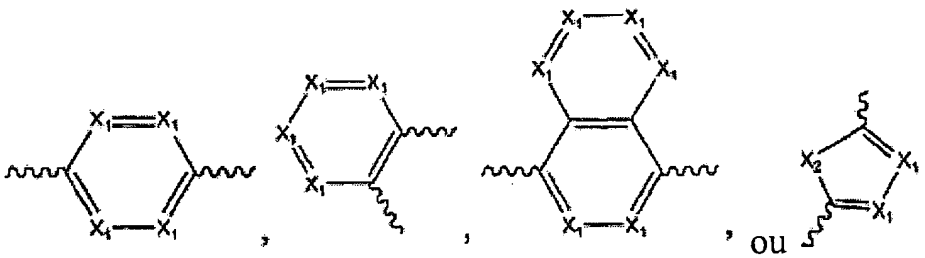
$-[C(Z_1)_2\text{-}Y_3]_v\text{-}(S(=O)_2)_q\text{-}[C(Z_1)_2\text{-}Z_2\text{-}Y_4]_u\text{-}[C(Z_1)_2]_z\text{-}[C(Z_1)=C(Z_1)]_g\text{-}Z_3$ em que cada um de z, v, q, u, e g é independentemente 0 ou 1;

Y_3 é S, O, ou NR_7 em que cada R_7 é independentemente hidrogênio, hidroxila, $C_1\text{-}C_6$ alquila, $C_1\text{-}C_6$ heteroalquila, $C_3\text{-}C_8$ cicloalquila, heterociclila, $C_1\text{-}C_6$ alcóxi, $C_1\text{-}C_6$ alquilamino, $C_1\text{-}C_6$ dialquilamino, arila, heteroarila;

Y_4 é O, S, ou $-NR_7\text{-}C(=O)\text{-}O\text{-}$;

cada Z_1 e Z_1 é independentemente hidrogênio, halogênio, $C_1\text{-}C_6$ alquila, $C_1\text{-}C_6$ heteroalquila, arila, heteroarila, $C_3\text{-}C_8$ cicloalquila, heterociclila, $C_1\text{-}C_6$ acila, $C_1\text{-}C_6$ heteroacila, aroíla, ou heteroaroíla;

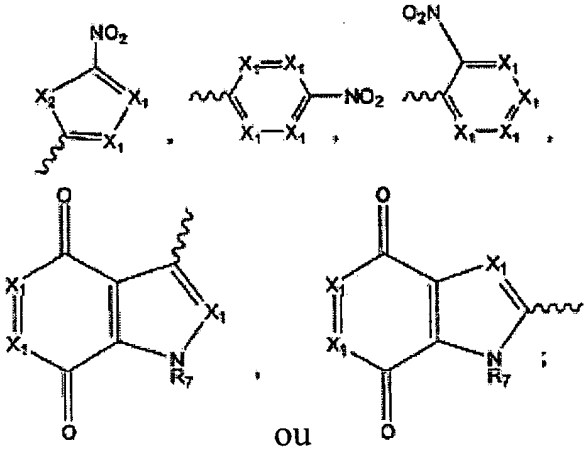
Z_2 é



em que cada X_1 é independentemente N ou CR_8 em que R_8 é independentemente hidrogênio, halogênio, nitro, ciano, CHF_2, CF_3, CO_2H, C_1-C_6 alquila, C_1-C_6 heteroalquila, C_1-C_6 cicloalquila, C_1-C_6 alcóxi, C_1-C_6 alquilamino, C_1-C_6 dialquilamino, arila, e $CON(R_7)_2$;

X_2 é NR_7, S, ou O; e

Z_3 é um grupo biorredutor apresentando a fórmula:



cada Z é independentemente C, S, ou P; cada t é independentemente 1 ou 2; cada r é independentemente 0 ou 1;

K é C_1-C_6 alquileno, C_1-C_6 heteroalquileno, arileno, ou heteroarileno;

com a condição de que na fórmula (XXI)

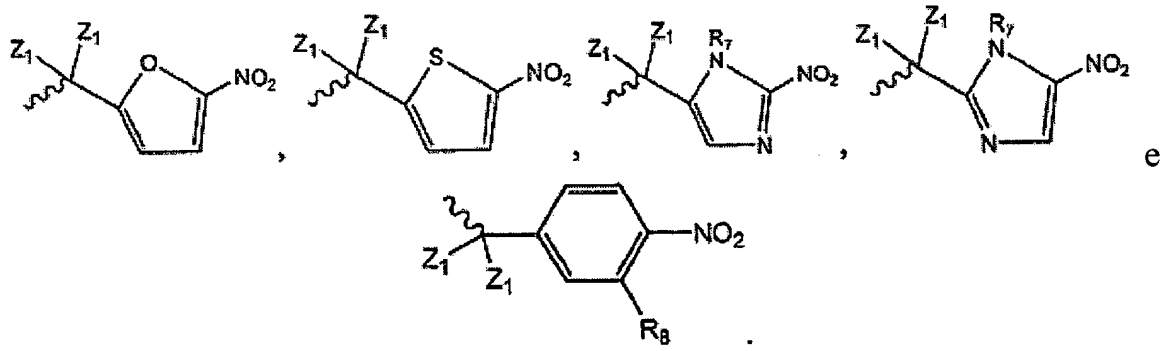
(i) pelo menos dois de R_1-R_4 e R_1-R_4* sejam 2-haloalquila, 2-alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, ou 2 heteroalquil-sulfoniloxialquila;

(ii) pelo menos um de R_1-R_4 e R_1-R_4* seja 2-haloalquila, 2-C_1-C_6 alquilsulfoniloxialquila, 2-heteroalquilsulfoniloxialquila, 2-arilsulfoniloxialquila, ou 2-heteroalquilsulfoniloxialquila; e um de NR_2R_3 e NR_2*R_3* seja ; ou

(iii) NR_2R_3 e NR_2^*-R_3* em conjunto sejam ambos ; e

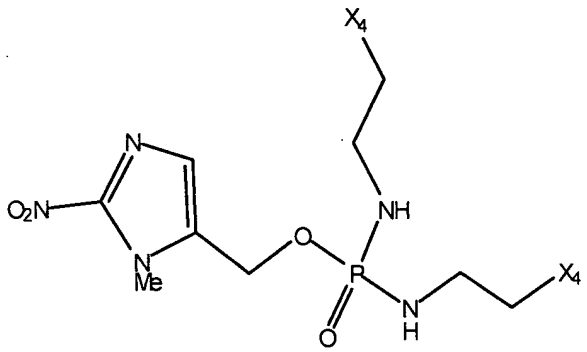
um isômero individual ou uma mistura racêmica ou não-racêmica de isômeros, bioisósteroes, farmacóforos, um sal, solvato, hidrato farmaceuticamente aceitável, ou uma pró-droga dos mesmos.

33. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou 15, caracterizado pelo fato de que disparador T é selecionado do grupo que consiste de:



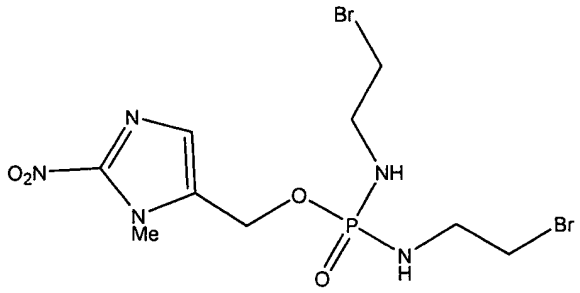
34. Composto de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que Z_1 é hidrogênio, metila, ou etila; R_7 é metila, trifluoroetila, etila, propila, e ciclo-hexila; e R_8 é OH ou $OP(=O)(OH)_2$; R_9 é hidrogênio ou C_1-C_6 alquila e cada X_4 é halo ou $R_{sul}S(=O)_2O$-.

35. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula:

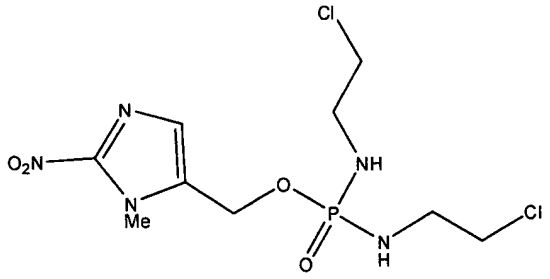


em que cada X_4 são ambos Cl ou Br.

36. Composto de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que é de fórmula:



37. Composto de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que é de fórmula:



38. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto como definido na reivindicação 35 e um excipiente, veículo, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

39. Uso de um composto da reivindicação 35, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar câncer.

40. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o composto como definido na reivindicação 36 e um excipiente, veículo, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

41. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o composto como definido na reivindicação 37 e um excipiente, veículo, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

42. Uso de um composto como definido na reivindicação 36, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar câncer.

43. Uso de um composto como definido na reivindicação 37, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar câncer.

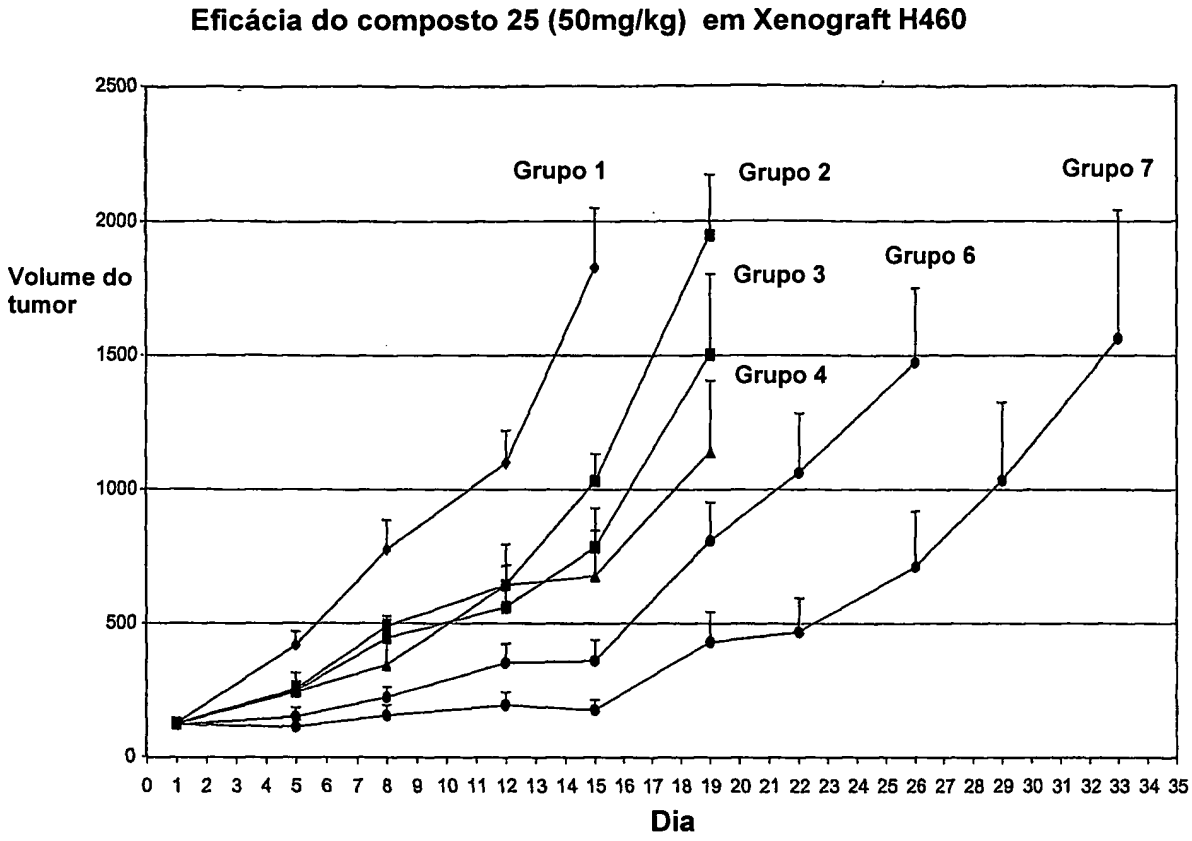

Eficácia do composto 25 (50mg/kg) em Xenograft H460
Volume do tumor
Dia
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3
Grupo 4
Grupo 6
Grupo 7
2500
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

FIGURA 1

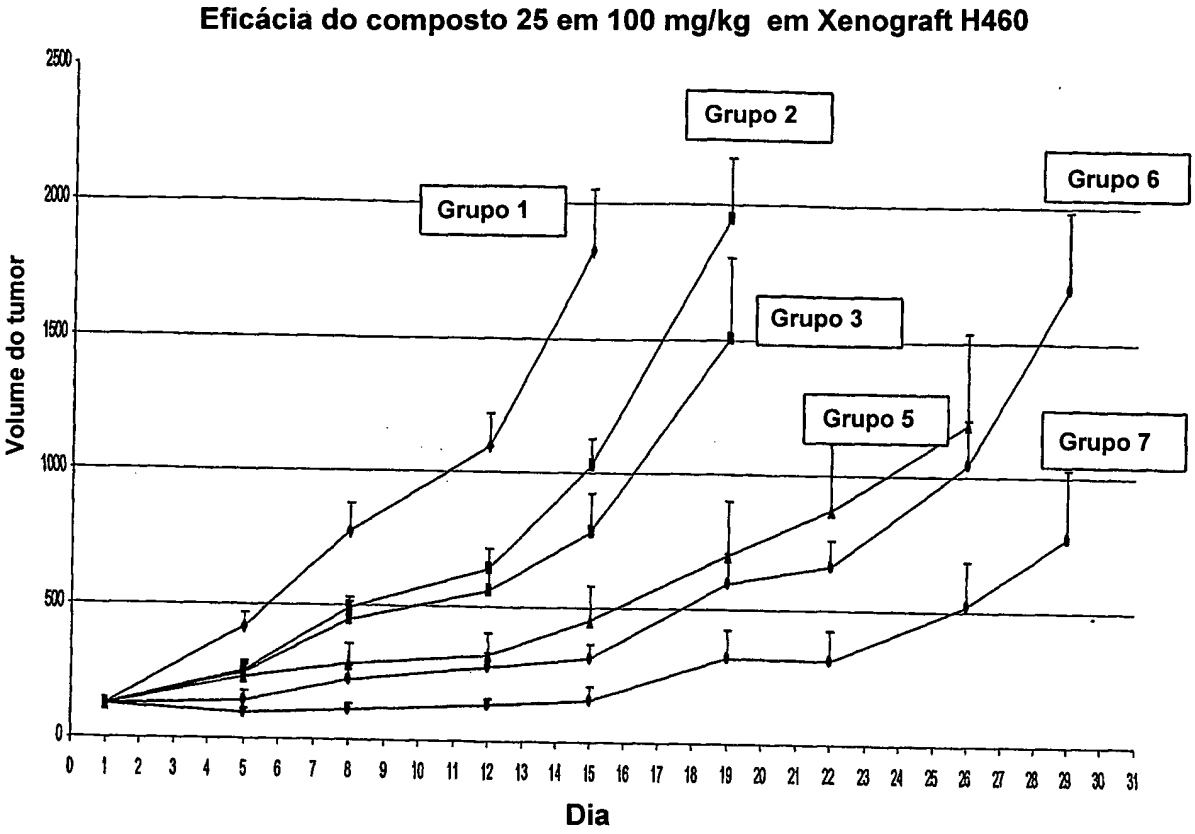

Eficácia do composto 25 em 100 mg/kg em Xenograft H460
Volume do tumor
Dia
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3
Grupo 5
Grupo 6
Grupo 7
0
500
1000
1500
2000
2500
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31

FIGURA 2

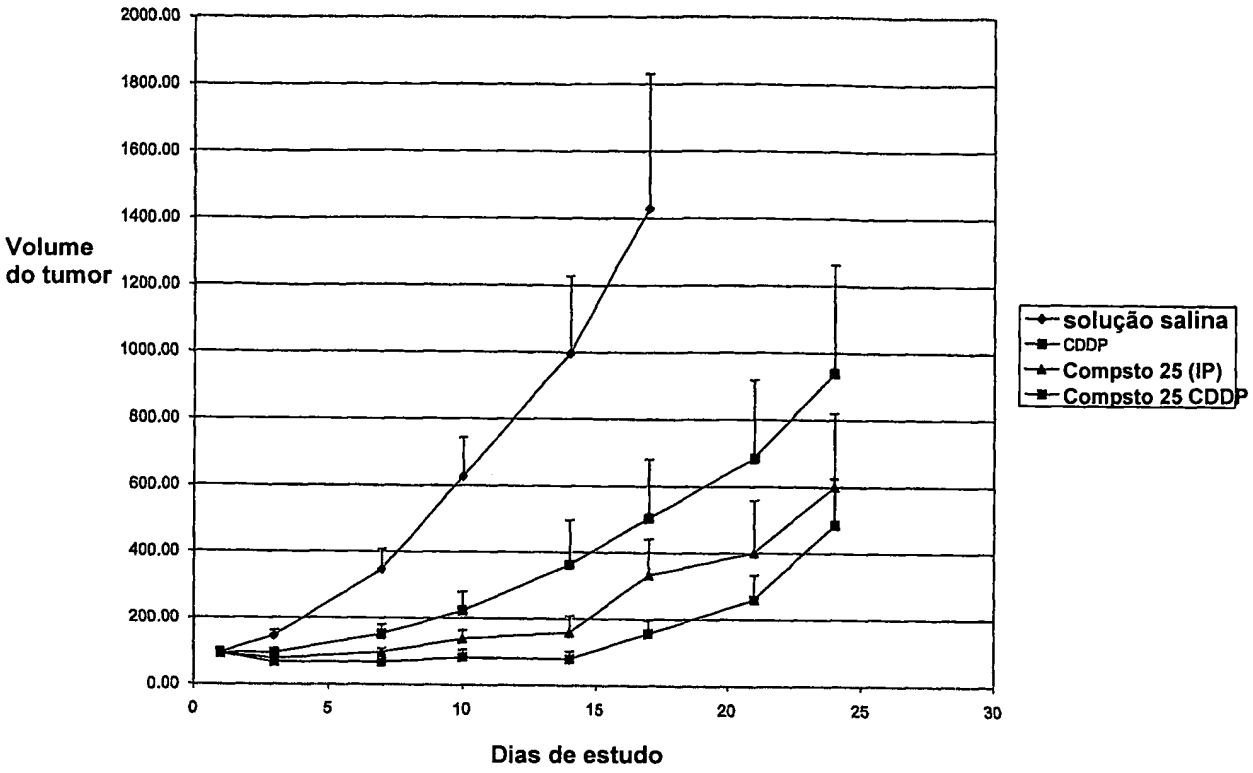

2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
Volume do tumor
0
5
10
15
20
25
30
Dias de estudo
solução salina
CDDP
Compsto 25 (IP)
Compsto 25 CDDP

FIGURA 3

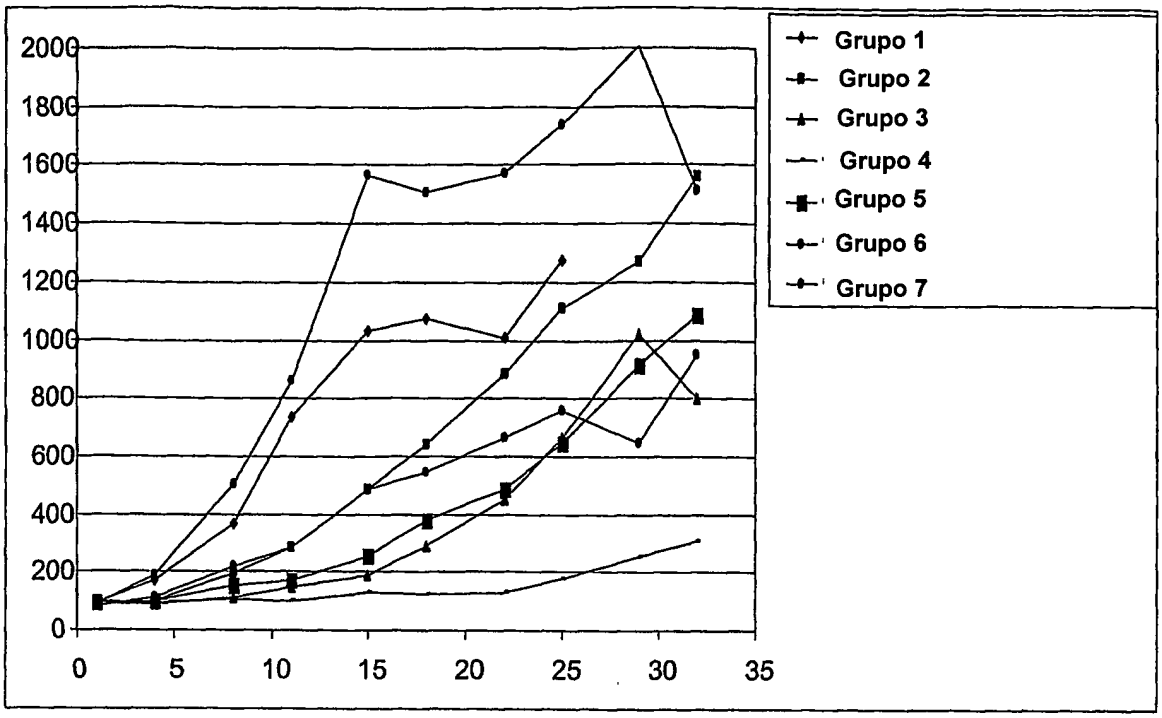

2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3
Grupo 4
Grupo 5
Grupo 6
Grupo 7

FIGURA 4

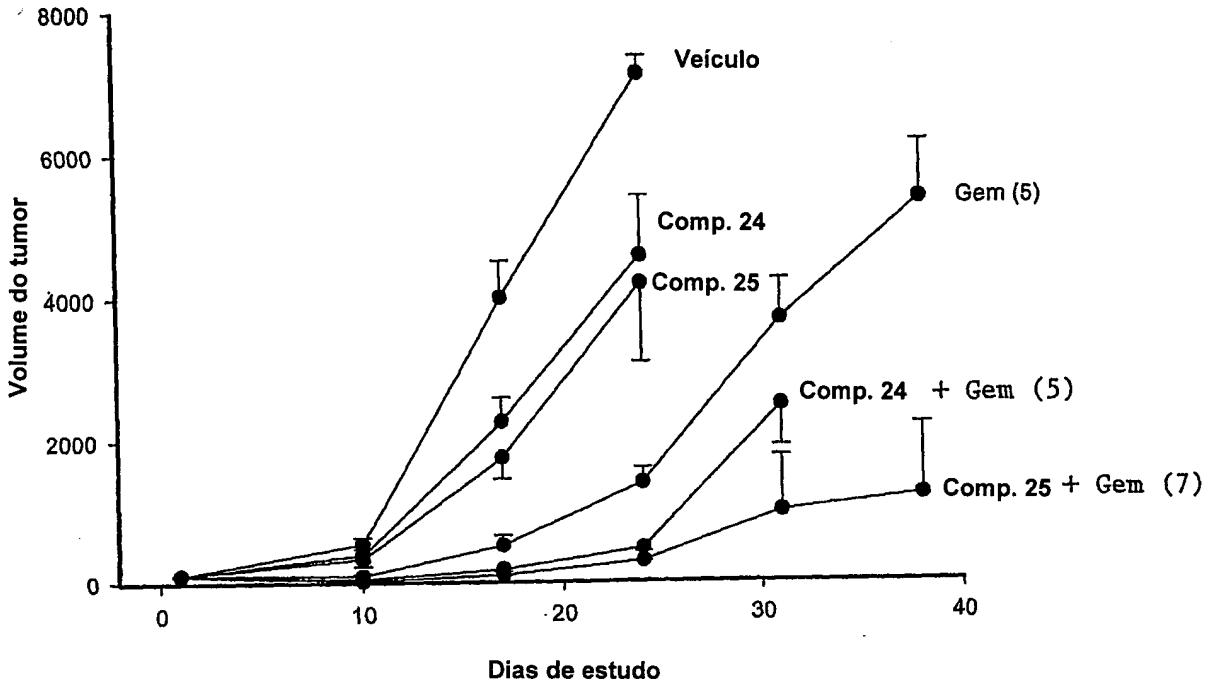

8000
6000
4000
2000
0
Volume do tumor
0
10
20
30
40
Dias de estudo
Veículo
Comp. 24
Comp. 25
Gem (5)
Comp. 24 + Gem (5)
Comp. 25 + Gem (7)

FIGURA 5

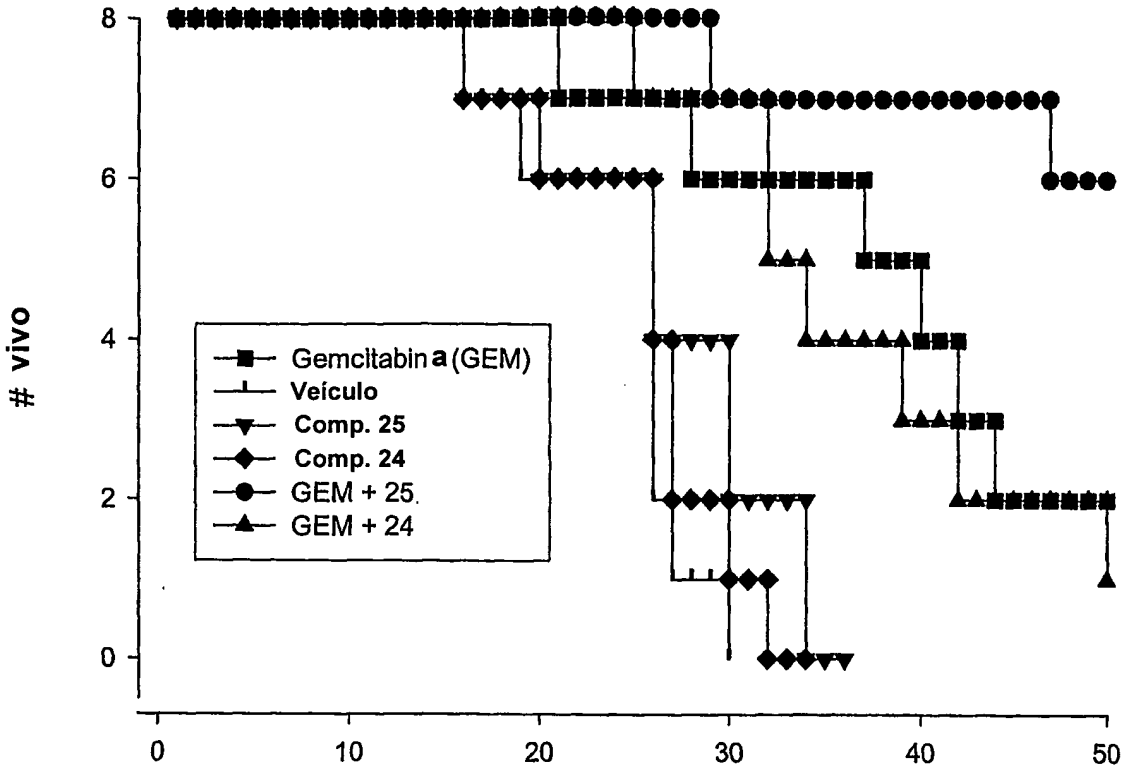

vivo
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
Gemcitabina (GEM)
Veículo
Comp. 25
Comp. 24
GEM + 25
GEM + 24

FIGURA 6

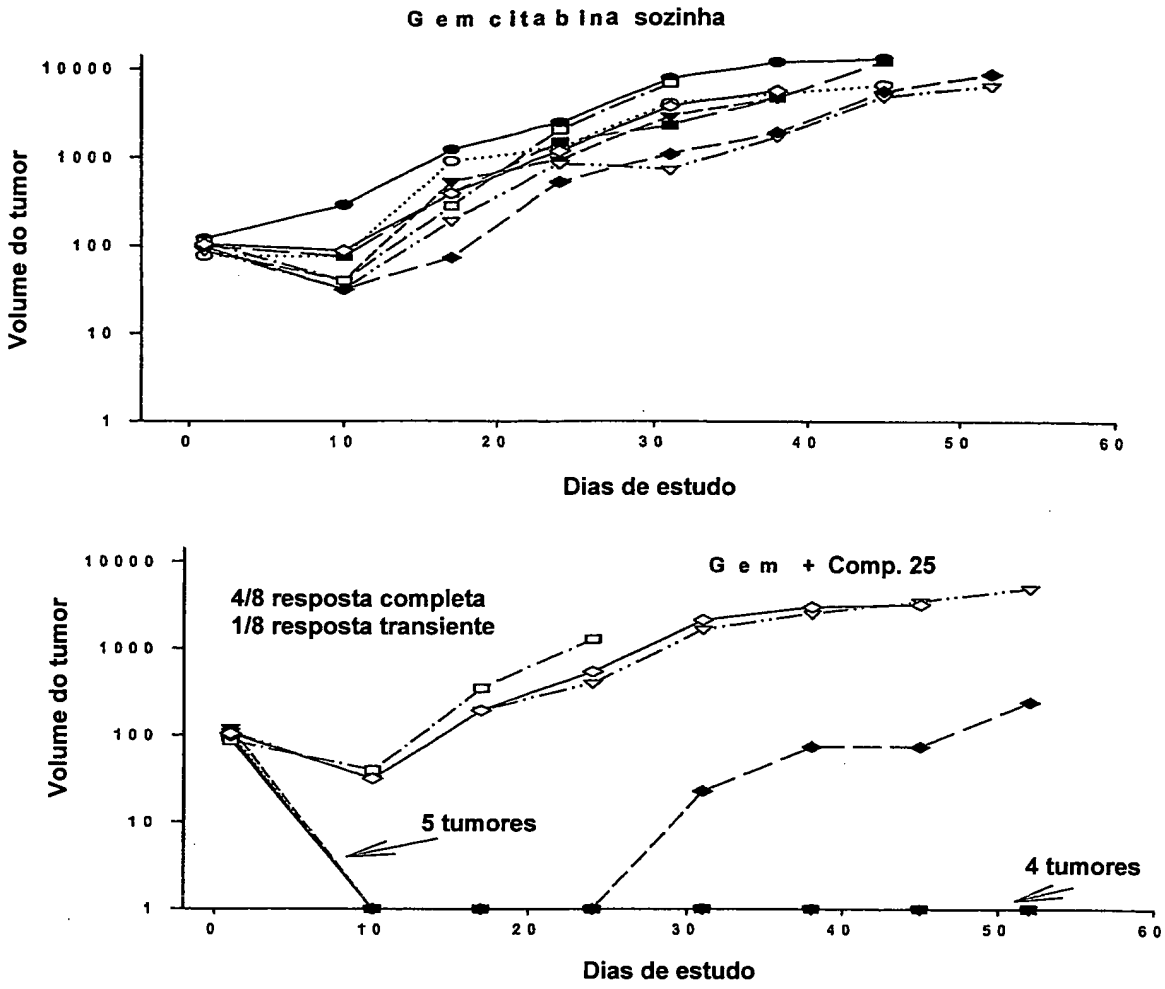
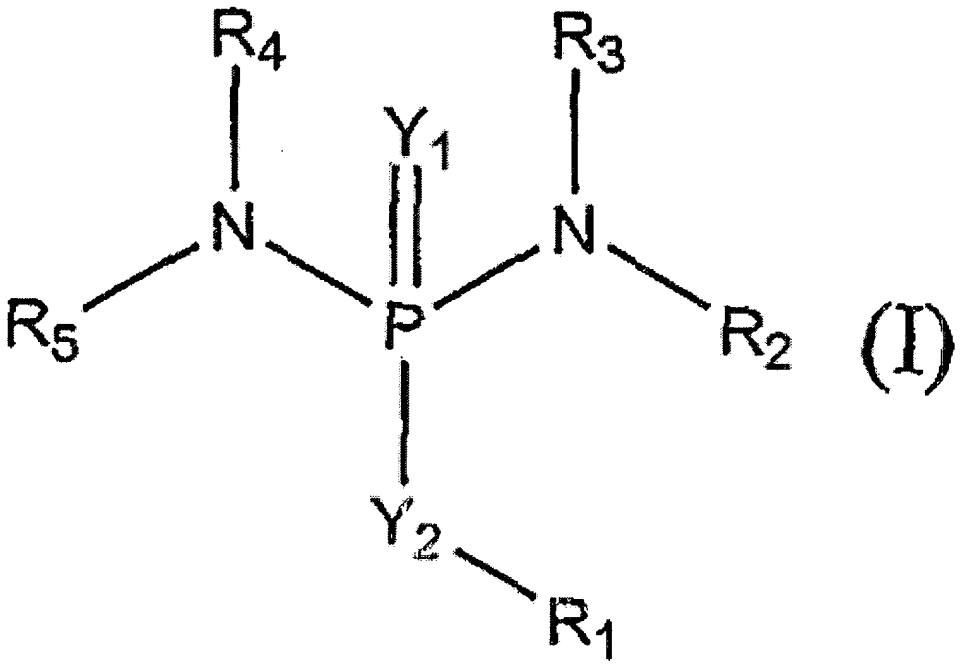

Gemcitabina sozinha
Volume do tumor
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60
Dias de estudo
Gem + Comp. 25
4/8 resposta completa
1/8 resposta transiente
5 tumores
4 tumores
Volume do tumor
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
60
Dias de estudo

FIGURA 7

PJ-061284-9



(I)

RESUMO

"COMPOSTO, FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM COMPOSTO"

Drogas alquiladoras de fosforoamidato podem ser usadas para tratar câncer quando administradas sozinhas ou em combinação com um ou mais agentes anti-neoplásicos.