

Received: 2004.09.07  
 Accepted: 2004.11.25  
 Published: 2004.12.07

## Leki oksazafosforinanowe. Poszukiwanie nowych pochodnych, badania metabolizmu i stosowanie nowych strategii terapeutycznych

Oxazaphosphorinane drugs. New analogues, metabolic studies, and therapeutic approaches

**Konrad Misiura**

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź

### Streszczenie

Omówiono badania z ostatnich kilku lat nad lekami oksazafosforinanowymi ze szczególnym podkreśleniem badań realizowanych w Polsce. Przedstawiono prace, które doprowadziły do odkrycia oryginalnego leku przeciwnowotworowego (*S*)-(-)-bromofosfamidu. Wykazano użyteczność fosforowego magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach metabolizmu ifosfamidu i możliwość wykorzystania pochodnych jego aktywnego metabolitu w terapii genowej.

**Słowa kluczowe:**

**cyklofosfamid • ifosfamid • (*S*)-(-)-bromofosfamid**

### Summary

Recent studies on oxazaphosphorinane drugs, with the main focus on those carried out in Poland, are briefly reviewed. Research leading to the introduction of the new antitumor drug (*S*)-(-)-bromofosfamide are presented. The utility of phosphorus nuclear magnetic resonance in studies of ifosfamide metabolism and an application of analogues of the final, active metabolite of this drug in gene therapy are shown.

**Key words:**

**cyclophosphamide • ifosfamide • (*S*)-(-)-bromofosfamide**

**Full-text PDF:**

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/6675.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6675.pdf)

**Word count:**

2503

**Tables:**

–

**Figures:**

7

**References:**

62

**Adres autora:**

dr Konrad Misiura, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, e-mail: kmisiura@bio.cbmm.lodz.pl

**Wykaz skrótów:**

**CF** – cyklofosfamid; **IF** – ifosfamid; **SBF** – (*S*)-(-)-bromofosfamid; **MF** – mafosfamid; **4H00IF** – 4-hydroperoksyifosfamid; **4H00BF** – 4-hydroperoksybromofosfamid; **4HOIF** – 4-hydroksyifosfamid; **aldolF** – aldoifosfamid; **iPAM** – izofosforoamid iperytowy; **4ketolF** – 4-ketoifosfamid; **karboksyIF** – karboksyifosfamid; **2DCE** – 2-dechloroetyloifosfamid; **3DCE** – 3-dechloroetyloifosfamid; **GDEPT** – genowo ukierunkowana terapia enzym-prolek (gene directed enzyme prodrug therapy)

## WPROWADZENIE

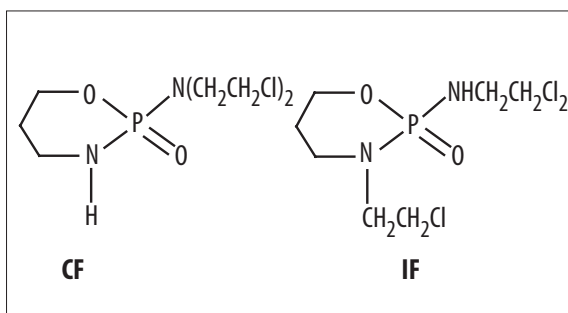
Cyklofosfamid (CF) i jego strukturalny izomer, ifosfamid (IF) (ryc. 1), fosforoamidoestrowe pochodne iperytu azotowego, są klinicznie szeroko stosowanymi przeciwnowotworowymi lekami alkilującymi [6,9,48]. W swojej strukturze zawierają one pierścień 1,3,2-oksazafosforinanu i wraz z kilkoma innymi preparatami tworzą grupę leków oksazafosforinanowych.

Związki te są prolekami, które pod działaniem cytochromu P450, głównie w wątrobie, ulegają aktywacji poprzez hydroksylację atomu węgla pierścienia w pozycji C-4. Tworzące się w wyniku kaskady samorzutnych reakcji aktywne metabolity CF i IF, dzięki obecności grup 2-chloroetyloamidowych wykazują aktywność cytotoksyczną będącą wynikiem bis-alkilowania w jądrze komórkowym komplementarnych nici DNA. CF i IF, ze względu na obecność w ich cząsteczkach asymetrycznego atomu fosforu, są związkami chiralnymi, i z tego powodu występują w postaciach enancjomerycznych, ale w leczeniu klinicznym są stosowane racematy. Badania nad metabolizmem leków oksazafosforinanowych oraz poszukiwanie nowych pochodnych w obrębie tej klasy związków i ich wykorzystanie w nowych, eksperymentalnych technikach terapii chorób nowotworowych, jest ciągle aktualne [3,4,8,11,12,23,30,31,53,56]. W niniejszym przeglądzie zostaną omówione badania dotyczące leków oksazafosforinanowych przeprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat ze szczególnym uwzględnieniem prac realizowanych w Polsce. Ze względu na zainteresowania autora pominięto w tym opracowaniu prace o charakterze czysto klinicznym.

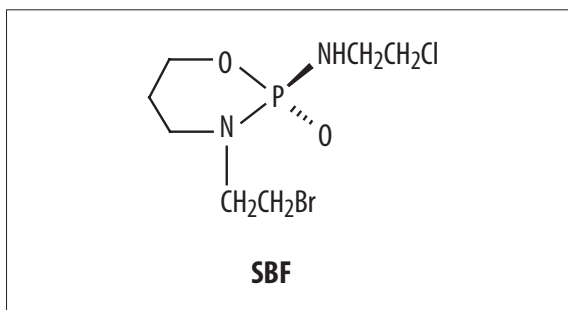
## NOWE POCHODNE IFOSFAMIDU

Pod koniec lat 80 XX w. w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi postawiono hipotezę, że istotny wpływ na aktywność przeciwnowotworową preparatów oksazafosforinanowych ma rodzaj grupy opuszczającej, od której zależy tworzenie się reaktywnych metabolitów zdolnych do alkilowania materiału genetycznego [39,61]. Bazując na tych przesłankach otrzymano serię pochodnych IF, zmodyfikowanych w podstawniku 2-chloroetylowym, połączonym z egzocyklicznym atomem azotu. W tej grupie związków pochodna bromowa charakteryzowała się największą aktywnością cytostatyczną. Prace nad syntezą [59,60], przeciwnowotworowymi [15], farmakokinetycznymi [24,58] oraz farmakologicznymi [21] właściwościami stereoizomerów bromowych analogów IF doprowadziły do wyselekcjonowania najbardziej aktywnego związku, (S)-(-)-3-(2-bromoetylo)-2-chloroetyloamino-1,3,2-oksazafosforinanu (SBF) (ryc. 2).

W badaniach na zwierzętach doświadczalnych preparat ten wykazywał podobną jak IF toksyczność wobec układu moczowego, szczególnie gdy jego stosowanie połączone było z użyciem Mesny (2-merkaptoetasulfonianu sodu), środka uroprotekcijnego dla leków oksazafosforinanowych [26]. Jednocześnie stwierdzono występowanie wzmożonego działania przeciwnowotworowego w przypadku stosowania SBF łącznie z podawaniem szczepionki – komórek uwalniających interleukinę 2 [27]. Przygotowując użycie SBF w badaniach klinicznych zoptymalizowano warunki



Ryc. 1. Cyklofosfamid (CF) i ifosfamid (IF)

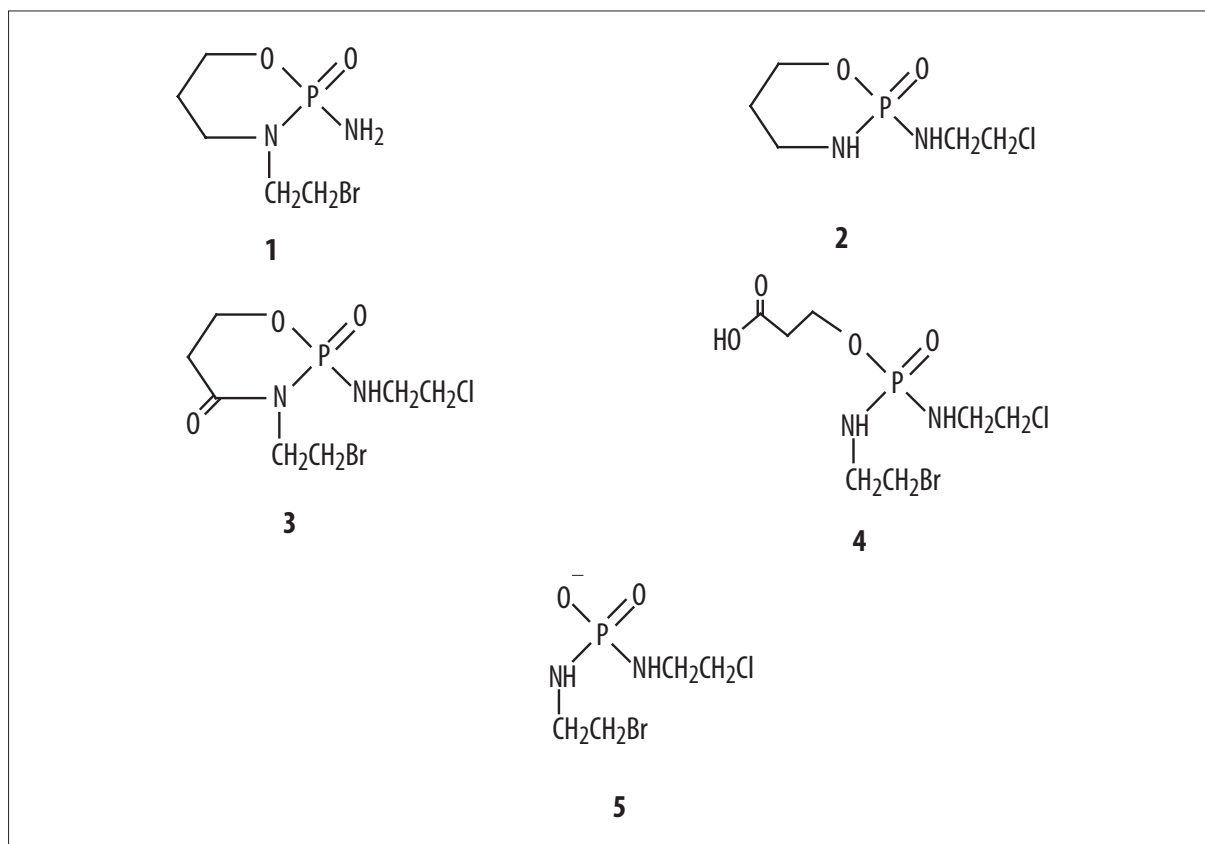


Ryc. 2. (S)-(-)-3-(2-bromoetylo)-2-chloroetyloamino-1,3,2-oksazafosforinan (SBF)

sześcioetapowej syntezy, uzyskując produkt z 25% wydajnością [38]. Zastosowane metody syntetyczne są w dużej części analogiczne z używanymi w przemysłowej produkcji IF w Polsce, co stwarza możliwość wykorzystania ich do opracowania technologii wytwarzania SBF. W Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu porównano aktywność przeciwnowotworową SBF i IF wobec trzech przeszczepialnych nowotworów u myszy (białaczka L1210, rak płuc Lewis i czerniak B16). Wykazano korzystny wzrost (w zakresie 14–127%) indeksu terapeutycznego *TI* dla SBF w porównaniu do IF. Z analizy toksyczności podostrej  $LD_5$  i ostrej  $LD_{50}$  u myszy dla SBF i IF wynika, że badany preparat jest 2,2–2,5 razy bardziej toksyczny niż lek referencyjny i dlatego SBF należy stosować w kilkukrotnie mniejszych dawkach niż IF. Jednocześnie dla obydwu związków obserwowano mniejszą toksyczność po podaniu doustnym, przy czym dla SBF było to bardziej widoczne niż w przypadku IF. Zachęcające wyniki badań przedklinicznych stały się podstawą do uzyskania rejestru [34] pozwalającego na przeprowadzenie badań klinicznych I/II fazy z SBF. Prace te poprzedzono określeniem farmakokinetyki SBF u ludzi po podaniu doustnym [25]. Następnie na podstawie wyników uzyskanych w trzech ośrodkach onkologicznych w Polsce określono dla SBF dawki maksymalnie tolerowane na 1,89 g/m<sup>2</sup> oraz dawkę toksyczną [52]. Otrzymane wyniki badań I/II fazy pozwalają rekomendować SBF do kolejnych faz badań klinicznych. Możliwość doustnego podawania SBF jest dogodna dla pacjentów. Należy także podkreślić, że SBF jest oryginalnym opracowanym w Polsce lekiem przeciwnowotworowym, który ostatnio osiągnął fazy badań klinicznych.

Kontynuując badania nad wdrożeniem SBF do praktyki klinicznej opracowano metody syntezy oczekiwanych metabolitów 1–5 (ryc. 3) tego preparatu [35].

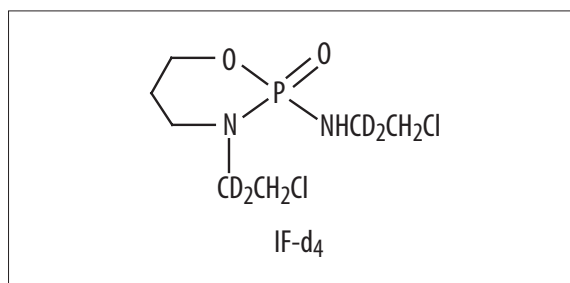




Ryc. 3. Metabolity SBF 1–5

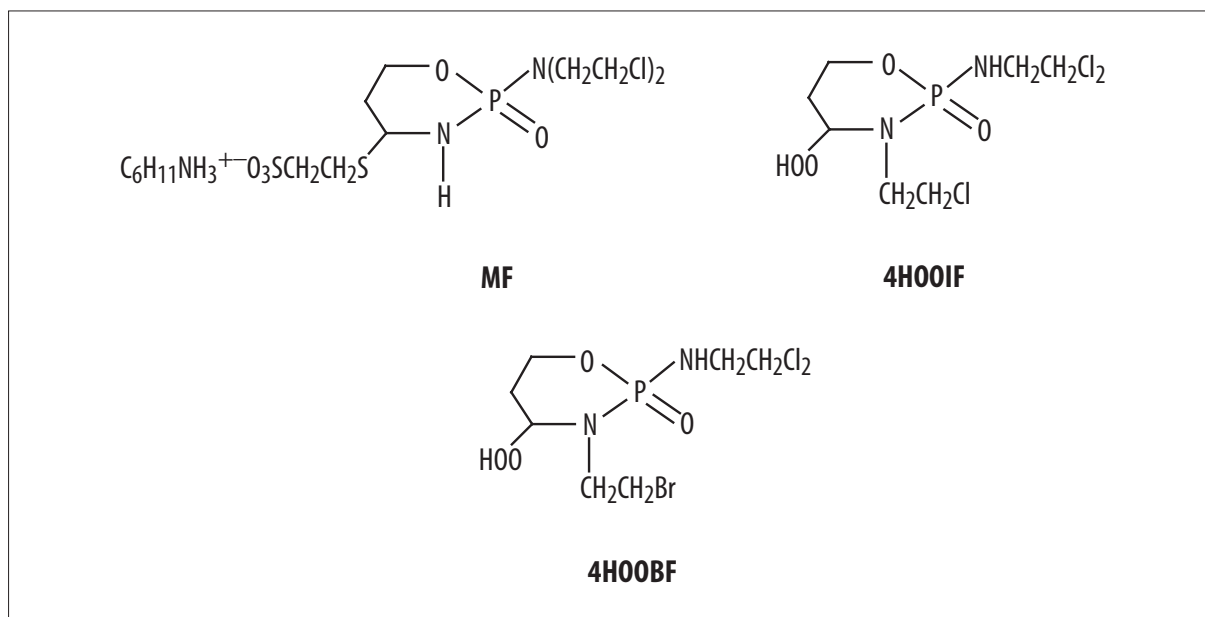
Związki 1–5 posłużą jako substancje wzorcowe w jakościowej i ilościowej analizie metabolizmu SBF. Badania te, łącznie z próbami określenia mechanizmu działania przeciwnowotworowego SBF, powinny doprowadzić do wyjaśnienia wyjątkowo dużej aktywności i stereoselektywności preparatu. Jego metabolit, związek 5, jest achiralny, a zatem proces biologicznego stereoróżnicowania musi następować we wcześniejszych etapach metabolizmu. Pewne sugestie na ten temat zostaną przedstawione poniżej, ale nadal zagadnienie to nie jest w pełni poznane. Należy również zauważyć, że SBF należy do nielicznej grupy aktywnych pochodnych iperytu azotowego, zawierających funkcję 2-bromoetylową. Inną pochodną tego typu jest kongener talimustyny o symbolu PNU 15977 [2].

Terapeutycznie wskazane użycie IF i SBF w dużych dawkach jest ograniczone z powodu występowania w trakcie leczenia działań niepożądanych, wśród których najważniejsze to nefrotoksyczność i neurotoksyczność [25,29,55]. Za najbardziej prawdopodobną przyczynę ich występowania uważa się uwalnianie aldehydu chlorooctowego w procesie metabolicznej transformacji IF poprzez hydroksylację atomów C-1 grup 2-chloroetylowych. Sformułowano hipotezę, że te niepożądane szlaki metaboliczne mogą być hamowane przez zastąpienie atomów wodoru w położeniu C-1 przez deuter [37]. W tym celu otrzymano serię deuteropodstawionych pochodnych ifosfamid i jego analogów bromowych, w postaci racemicznej jak i enancjomeicznej. Do wprowadzenia atomów deuteru zastosowano metodę halogeno-acetylowania i następczej redukcji grupy karbonylowej [38].



Ryc. 4. Tetradeutero podstawiony ifosfamid (IF-d4)

Tetradeutero podstawiony ifosfamid (IF-d4) (ryc. 4) poddano badaniom metabolizmu *in vitro* z użyciem mikrosomów wątroby szczura. Posługując się techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) wykazano występowanie efektów izotopowych w procesach hydroksylacji łańcuchów bocznych. Deutero podstawione preparaty poddano badaniom na aktywność przeciwnowotworową wobec białaczki L1210 u myszy. Związki niemodyfikowane zostały użyte w tych badaniach jako preparaty referencyjne. Wśród stereoisomerów związków deuterowanych enancjomery lewoskrętne charakteryzowały się większą aktywnością niż racematy. Podobne zależności obserwowano wcześniej dla stereoisomerów CF i IF [28] oraz bromowych analogów ifosfamid [15]. Zaobserwowane różnice w aktywnościach pomiędzy związkami deuterowanymi a nieznakowanymi potwierdzają hipotezę, że ścieżka metaboliczna IF prowadząca do aldehydu chlorooctowego jest niekorzystna biorąc pod uwagę właściwości terapeutyczne tego leku. Problem roli aldehydu chlorooctowego



Ryc. 5. Mafosfamid (MF) oraz pochodne 4-hydroperoksy ifosfamidu (4HOOIF) i bromofosfamidu (4HOOBF)

w terapii z użyciem IF był w ostatnich latach przedmiotem kontrowersji [5]. Badania z wykorzystaniem pochodnych deuterowych, jak i opisane poniżej badania metabolizmu IF [44], świadczą przeciw hipotezie sformułowanej przez badaczy amerykańskich [5] o korzystnym udziale tego metabolitu w terapii.

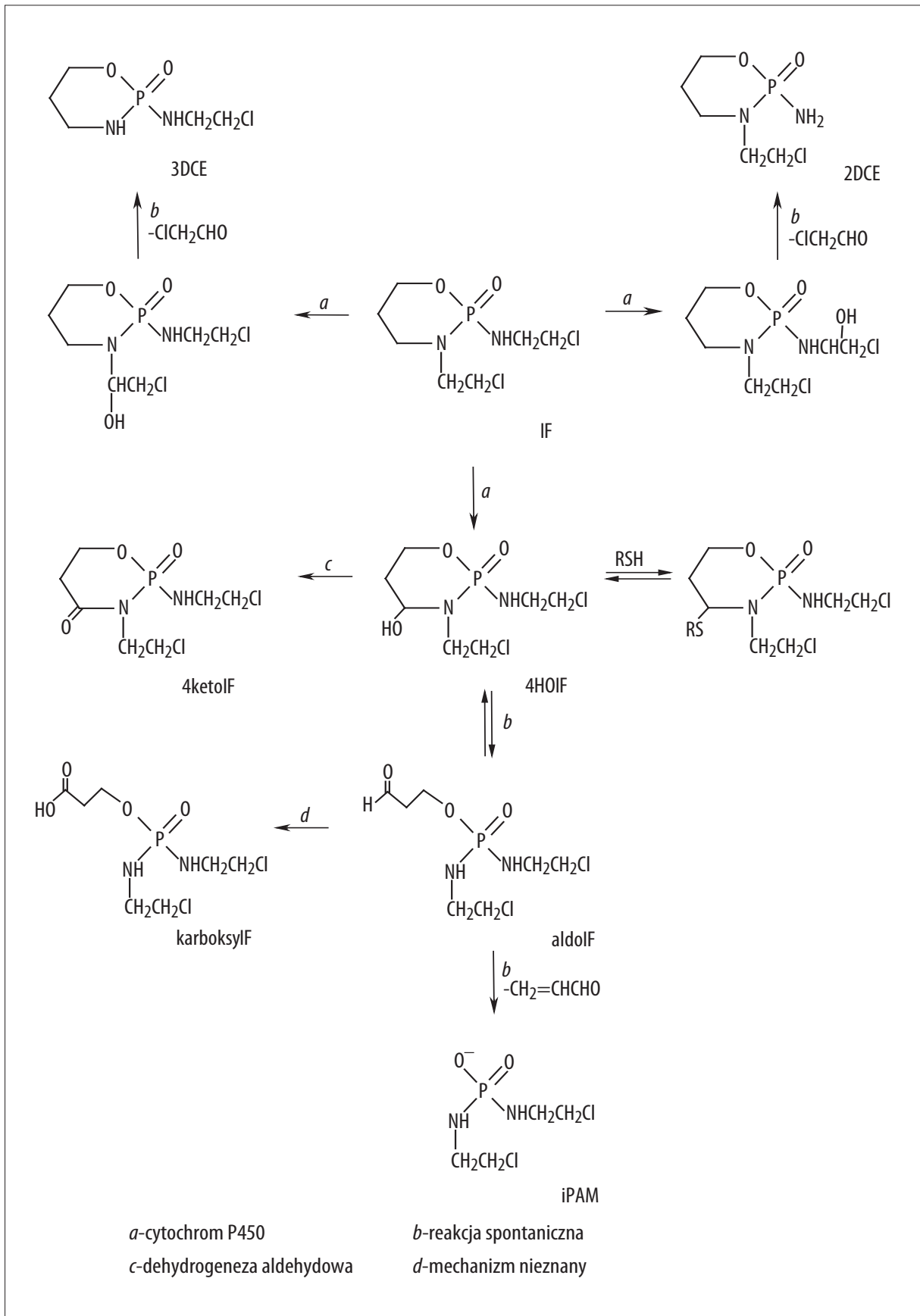
W celu uniknięcia niepożądanych procesów metabolicznej hydroksylacji IF w łańcuchach bocznych, zaplanowano otrzymanie tetrametylowej pochodnej ifosfamidu 3-(2-chloro-1,1-dimetyloetylo)-2-chloro-1,1-dimetyloetyloamino-1,3,2-oksazafosforinanu [36]. Podjęte syntetyz nie doprowadziły jednak do otrzymania tego związku. Zasadniczym problemem okazało się wprowadzenie grupy 2-chloro-1,1-dimetyloetylowej na atom azotu N-3 pierścienia 1,3,2-oksazafosforinanu. Możliwe natomiast okazało się otrzymanie pochodnej dimetylowej 3-(2-chloroetylo)-2-chloro-1,1-dimetyloamino-1,3,2-oksazafosforinanu. Zsyntetyzowano ją wykorzystując reakcję otwarcia pierścienia gem-dimetyloazirydynowego za pomocą chlorowodoru. Okazało się, że proces otwarcia pierścienia nie jest regioselektywny. Otrzymano, oprócz pożądanego związku z grupą 2-chloro-1,1-dimetyloetylową w około równomolowej ilości jego regioizomer 2-chloro-2,2-dimetyloetylowy. Związki te poddano badaniom metabolizmu *in vitro* z użyciem mikrosomów wątroby szczura. Posługując się techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykazano, że kinetyka ich hydroksylacji jest zbliżona do kinetyki metabolizmu IF. Związki dimetylowe były jednak znacznie mniej aktywne *in vivo*, wobec białaczki L1210 u myszy, niż IF. Wynik ten sugeruje, że wprowadzenie podstawników metylowych do grup 2-chloroetylowych powoduje obniżenie efektywności alkilowania DNA przez odpowiednie aktywne metabolity tych preparatów. A zatem, ten kierunek modyfikacji ifosfamidu nie wydaje się perspektywiczny. Równoległe z naszymi pracami badacze francuscy otrzymali pochodne IF zawierające po jednej grupie metylowej połączonej z atomem węgla C-1 funkcji 2-chloroetylowych [49]. Niestety, ani w tej, ani w następnych pra-

cach tych autorów, nie opisano aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych analogów IF.

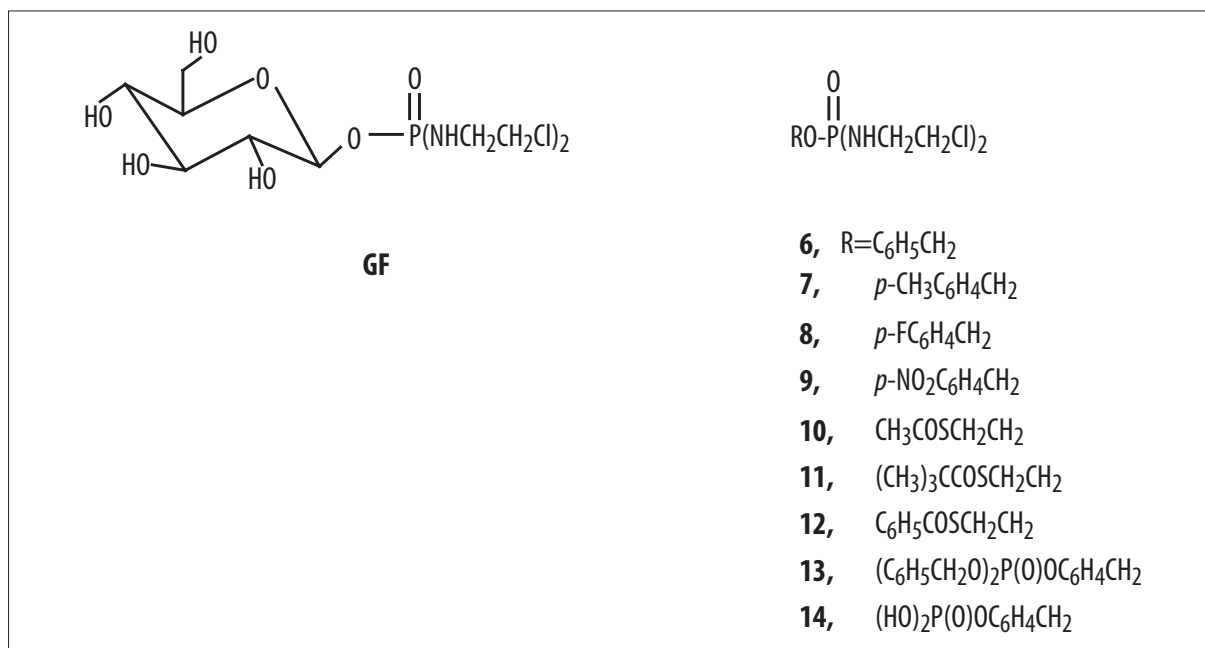
Wśród badanych leków oksazafosforinanowych enancjomery lewoskrętne są bardziej aktywne przeciwnowotworowo niż enancjomery prawoskrętne [15,28,38]. Celowym było określenie wpływu stereochemii na atomie fosforu na aktywność przeciwnowotworową pochodnych 4-hydroperoksy ifosfamid (4HOOIF) i bromofosfamid (4HOOBF) [42]. Pochodne 4-hydroperoksylowe (ryc. 5) należą do grupy preaktywowanych leków oksazafosforinanowych, z których mafosfamid (MF) jest stosowany klinicznie [57]. Zaletą tego leku jest brak konieczności metabolicznej aktywacji, co pozwala na stosowanie MF w zdecydowanie mniejszych dawkach niż CF i IF, natomiast jego wadą jest silna toksyczność w miejscu podania.

Substratami do syntezy stereoizomerów 4HOOIF i 4HOOBF były racemiczny i lewoskrętny IF i BF. Prowadząc ich ozonolizę w obecności nadtlenu wodoru otrzymano pożądaną produkty i zbadano ich aktywność *in vitro* w 4 liniach nowotworowych raka pochwy KB, raka odbytnicy SW707, raka pęcherza moczowego HCV29T i raka gruczołu piersiowego MCF-7. Pochodne ifosfamid były bardziej aktywne niż pochodne bromofosfamid, co było zaskakujące w odniesieniu do różnic obserwowanych dla SBF i IF. Prawdopodobnie o takim zróżnicowaniu aktywności zdecydowała obniżona chemiczna trwałość pochodnych bromowych. Dlatego do badań aktywności przeciwnowotworowej wobec białaczki L1210 u myszy wybrano pochodne ifosfamid. Podobnie jak w badaniach cytotoksyczności, nie stwierdzono znaczących różnic w aktywności izomerów *cis* i *trans*, a także związków racemicznych i enancjomerycznych. Sugeruje to, że różnice w aktywności przeciwnowotworowej stereoizomerów IF i BF wynikają nie ze stereo-selektywnego charakteru procesu hydroksylacji pierścienia oksazafosforinanylowego, lecz ze stereo-selektywności hydroksylacji łańcuchów bocznych. Hipotezę tę potwierdza fakt, iż dla IF i BF, gdzie metaboliczna hydrok-





Ryc. 6. Schemat metabolizmu ifosfamidu



Ryc. 7. Glufosamid (GF) oraz pochodne izofosforoamidu iperytowego

sylacja w grupach 2-chloroetylowych zachodzi w znacznym stopniu, obserwuje się znacznie większe stereozróżnicowanie we właściwościach przeciwnowotworowych niż dla CF, którego proces hydroksylacji łańcuchów bocznych ma charakter jedynie marginalny. Pochodne 4-hydroperoksy wykazywały ograniczoną trwałość podczas przechowywania, co prawdopodobnie uniemożliwia ich szersze zastosowanie terapeutyczne. Problem poszukiwania nowych praktykowanych pochodnych ifosfamidu jest ciągle aktualny. W ostatnim czasie prowadzono badania 4-metoksyifosfamidu, którego izomery *cis* i *trans* wykazywały dużą aktywność przeciwnowotworową *in vitro* [50]. Nie stwierdzono różnic w aktywnościach obu izomerów, podobnie jak w opisanych powyżej badaniach [42]. Otrzymano także sulfonylowe pochodne aldoifosfamidu i aldoifosfamidu [18] i wykazano ich dużą aktywność przeciwnowotworową *in vivo* wobec nowotworów opornych na leki oksazafosforinowe.

#### BADANIA METABOLIZMU IFOSFAMIDU

Metabolizm leków oksazafosforinowych był intensywnie badany już od wielu lat i należy on do jednych z najlepiej poznanych [3,4,11,23] (ryc. 6). W badaniach wykorzystano różne techniki analityczne, takie jak chromatografia cienkowarstwowa, gazowa i cieczowa, spektrometria masowa i magnetyczny rezonans jądrowy. Na podkreślenie zasługuje opracowane w Polsce zastosowanie fosforowego magnetycznego rezonansu jądrowego do badania metabolizmu IF [40]. Technika ta była później szeroko wykorzystywana przez inne grupy badawcze [14,20,32,33].

IF w pierwszym etapie jest hydroksylowany z udziałem cytochromu P450 w pierścieniu i w łańcuchach bocznych (schemat). Powstający 4OHIF znajduje się w równowadze tautomerycznej z aldoIF, który samorzutnie rozpada się, z uwolnieniem akroleiny, z utworzeniem aktywnego metabolitu iPAM. 4OHIF i aldoIF są utleniane odpowiednio

do 4ketoIF i karboksyIF, które należą do głównych metabolitów IF wydalanych z moczem. W przeciwieństwie do CF, u którego pierwszy etap hydroksylacji ogranicza się do reakcji w pierścieniu oksazafosforinowym, IF utleniany jest również w grupach 2-chloroetylowych dając nietrwałe pochodne hydroksylowe samorzutnie rozpadające się, z uwolnieniem aldehydu chlorooctowego oraz związków dechloroetylowych 2DCE i 3DCE. Oba te nieaktywne metabolity są także wydalane z moczem.

Niedawno podjęto próby znalezienia korelacji poziomu tworzącego się aldehydu chlorooctowego z występowaniem neuro- i nefrotoksyczności u dzieci leczonych IF [44]. Niepożądane procesy hydroksylacji zachodzące w łańcuchach 2-chloroetylowych, stanowią u pacjentów dorosłych do 50% całkowitego metabolizmu IF [23,40]. Badania metabolizmu IF [44] w grupie 26 dzieci (wiek 2–15 lat) z guzami litymi o różnym umiejscowieniu wykazały duże zróżnicowanie w ilościach 2DCE i 3DCE oraz niezmetabolizowanego IF wydalanych z moczem. Nie stwierdzono jednak ścisłej zależności pojawiania się u pacjentów objawów neurotoksycznych i nefrotoksycznych z obserwowanym podwyższonym poziomem 2DCE i 3DCE w moczu. Może to sugerować, że istnieją dodatkowe czynniki warunkujące wspomniane wyżej działania niepożądane. Czynnikiem takim może być np. zróżnicowanie u leczonych dzieci aktywności genów kodujących określone typy transferazy S-glutationu, enzymu prawdopodobnie odpowiedzialnego za procesy detoksyfikacji aldehydu chlorooctowego. Prace nad weryfikacją tej hipotezy są realizowane w Instytucie Pediatrii UM w Łodzi. Badania farmakogenetyczne, w powiązaniu z analizą metabolizmu IF, dają nadzieje na znalezienie markerów, które są związane z tzw. dobrą odpowiedzią terapeutyczną u indywidualnego pacjenta. Wykazano na przykład, że ekspresja określonych subtypów cytochromu P450 w tkance raka piersi może być powiązana z efektem terapeutycznym IF [54]. A zatem wskazane jest podjęcie prób modulowa-

nia aktywności wybranych genów subtypów cytochromu P450, co może doprowadzić do lepszego działania terapeutycznego, bądź ograniczenia działań niepożądanych związanych z leczeniem ifosfamidem.

## NOWE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

Toksyczność towarzysząca konwencjonalnej chemioterapii przeciwnowotworowej jest spowodowana przede wszystkim brakiem wybiórczości działania cytostatyków wobec komórek docelowych. Pożądaną selektywność można osiągnąć przez zastosowanie terapii genowej. Jedną z metod będących taką formą eksperymentalnej terapii przeciwnowotworowej jest enzymatyczna aktywacja proleku w genowo zmienionych komórkach rakowych, tzw. koncepcja „Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy” (GDEPT) [46,47]. W ciągu ostatnich kilku lat opracowano kilkanaście systemów prolek/enzym, a kilka z nich znajduje się już w badaniach klinicznych [10].

Ostatnio intensywnie była badana możliwość zastosowania w terapii genowej GDEPT cyklofosfamidu i ifosfamidu oraz aktywujące je cytochromy P450. Badania te prowadzone głównie w Stanach Zjednoczonych zostały podsumowane w kilku pracach przeglądowych [7,22,51,62]. Terapia z wykorzystaniem CF i IF oraz retrowirusowego dostarczania plazmidów kodujących izoformy cytochromu P450, tj. CYP2B1 i CYP2B6 znajduje się w II fazie badań klinicznych.

W oparciu o koncepcję GDEPT, w polskich laboratoriach podjęto prace nad wykorzystaniem w terapii genowej pochodnych izofosforoamidu iperytowego (iPAM), aktywnego metabolitu ifosfamidu [41,43]. Badania te były również interesujące ze względu na obserwowaną dużą aktywność przeciwnowotworową niektórych pochodnych iPAM. Glikozydowy ester iPAM, glufosfamid (GF), znajduje się w II fazie badań klinicznych [13] (ryc. 7).

Otrzymano trzy grupy pochodnych iPAM: benzylowe 6–9, które prawdopodobnie mogą być aktywowane poprzez cytochrom P450, acyloioetylowe 10–12 – aktywowalne za pomocą hydrolaz, oraz fosforanowe 13–14 – aktywowalne za pomocą fosfataz. Znalaziono korelację pomiędzy zdolnością preparatu do ulegania enzymatycznej aktywacji a jego cytotoksycznością i aktywnością przeciwnowotworową. Grupa pochodnych acyloioetylowych 10–12 wykazywała interesujące właściwości przeciwnowotworowe.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Aubert S.D., Li Y., Raushel F.M.: Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry*, 2004; 43: 5707–5715
- [2] Baraldi P.G., Balboni G., Romagnoli R., Spalluto G., Cozzi P., Geroni C., Mongelli N., Rutigliano C., Bianchi N., Gambari R.: PNU 157977: a new potent antitumour agent exhibiting low *in vivo* toxicity in mice injected with L1210 leukaemia cells. *Anticancer Drug Des.*, 1999; 14: 71–76
- [3] Baumann F., Preiss R.J.: Cyclophosphamide and related anticancer drugs. *J. Chromatogr. B*, 2001; 764: 173–192
- [4] Boddy A.V., Yule S.M.: Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin. Pharmacokinet.*, 2000; 38: 291–304
- [5] Borner K., Kisro J., Bruggemann S.K., Hagenah W., Peters S.O., Wagner T.: Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.*, 2000; 28: 573–576

Jednak wykorzystanie pochodnych iPAM w GDEPT powinno się opierać raczej o enzymy nieobecne lub wykazujące jedynie szczątkową aktywność w komórkach organizmów wyższych. Interesujące może być zastosowanie do tego celu fosfotriesteraz [1], enzymów, które próbuje się wykorzystywać m.in. do detoksyfikacji fosforoorganicznych gazów bojowych. Zastosowanie określonych pochodnych iPAM w GDEPT daje możliwość modyfikowania ich właściwości alkilujących. Taką szansę stwarza zamiana atomu(ów) chloru w podstawnikach 2-chloroetylowych na inne grupy opuszczające, np. brom. Prace nad wykorzystaniem w GDEPT pochodnych fosforoamidu iperytowego (PAM), aktywnego metabolitu cyklofosfamidu, prowadzone są w kilku innych ośrodkach. Ostatnio otrzymano odpowiednio zaplanowane kongenery PAM w celu ich aktywacji poprzez DT-diaforazę [16], karboksypeptydazę G2 [45], nitroreduktazę [17] i reduktazę pochodzącą z ludzkich cytochromów P450 [19].

## PODSUMOWANIE

Cyklofosfamid, lek prawie 50-letni, ciągle znajduje szerokie zastosowanie kliniczne w leczeniu wielu typów nowotworów. Inne leki oksazafosforinowe – ifosfamid, trofosfamid i mafosfamid są również użyteczne w chemioterapii. Ostatnio dołączył do tej grupy (S)-(–)-bromofosfamid, nowy, polski eksperymentalny lek będący po I fazie badań klinicznych. Planowane są dalsze prace nad tym preparatem. Nadal nie został poznany jego metabolizm oraz mechanizm działania, szczególnie w porównaniu do ifosfamidu. Poszukiwanie nowych pochodnych ifosfamidu mających mniej działań niepożądanych, takich jak nefrotoksyczność i neurotoksyczność, dotychczas nie zakończyło się pełnym sukcesem. Można sądzić, że bardziej obiecująca w realizacji tego celu może być droga inhibicji określonych subtypów cytochromu P450 poprzez podawane łącznie z ifosfamidem innych preparatów. Cyklofosfamid i ifosfamid zostały z sukcesem wykorzystane w terapii genowej enzym-prolek. Można przypuszczać, że w tej terapii będzie możliwe zastosowanie również odpowiednio zaplanowanych, enzymatycznie aktywowanych pochodnych ich końcowych metabolitów.

## Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Profesorom Czesławowi Radzikowskiemu i Wojciechowi Stecowi za dyskusję i krytyczne uwagi dotyczące pracy.

- [6] Carli M., Passone E., Perilongo G., Bisogno G.: Ifosfamide in pediatric solid tumors. *Oncology*, 2003; 65(Suppl. 2): 99–104
- [7] Chen L., Waxman D.J.: Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 2002; 8: 1405–1416
- [8] Colvin E.M., Sasaki J.C., Tran N.L.: Chemical factors in the action of phosphoramidic mustard alkylating anticancer drugs: Rules for computational chemistry. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 645–663
- [9] Colvin O.M.: An overview of cyclophosphamide development and clinical application. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 555–560
- [10] Fillat C., Carrio M., Cascante A., Sangro B.: Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene Ther.*, 2003; 3: 13–26
- [11] Furlanut M., Franceschi L.: Pharmacology of ifosfamide. *Oncology*, 2003; 65(Suppl. 2): 2–6

- [12] Gamcsik M.P., Dolan M.E., Andersson B.S., Murray D.: Mechanism of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 587–605
- [13] Giaccone G., Smit E.F., de Jonge M., Dansin E., Briasoulis E., Ardizzoni A., Douillard J.Y., Spaeth D., Lacombe D., Baron B., Bachmann P., Fumoleau P.: Glufosfamide administered by 1-hour infusion as a second-line treatment for advanced non-small cell lung cancer; a phase II trial of the EORTC – new drug development group. *Eur J Cancer*, 2004; 40: 667–672
- [14] Gilard V., Malet-Martino M. C., de Forni M. et al: Determination of the urinary excretion of ifosfamide and its phosphorylated metabolites by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1993; 31: 387–394
- [15] Glazman-Kuśnierczyk H., Matuszyk J., Radzikowski C.: Antitumor activity evaluation of bromine-substituted analogues of ifosfamide. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1992; 14: 883–911
- [16] Hernick M., Flader C., Borch R.F.: Design, Synthesis, and biological evaluation of indolequinone phosphoramidate prodrugs targeted to DT-diaphorase. *J. Med. Chem.*, 2002; 45: 3540–3548
- [17] Hu L., Yu Ch., Jiang Y., Han J., Li Z., Browne P., Race P.R., Knox R.J., Searle P.F., Hyde E.J.: Nitroaryl phosphoramides as novel prodrugs for *E. coli* nitroreductase activation in enzyme prodrug therapy. *J. Med. Chem.*, 2003; 46: 4818–4821
- [18] Jain M., Fan J.Y., Baturay N.Z., Kwon C.H.: Sulfonyl-containing aldophosphamide analogues as novel anticancer prodrugs targeted against cyclophosphamide-resistant tumor cell lines. *J. Med. Chem.*, 2004; 47: 3843–3852
- [19] Jain M., Kwon C.H.: 1,2-Benzisoxazole phosphorodiamidates as novel anticancer prodrugs requiring bioreductive activation. *J. Med. Chem.*, 2003; 46: 5428–5436.
- [20] Joqueviel C., Martino R., Gilard V., Malet-Martino M., Canal P., Niemeyer U.: Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Drug Metab Dispos.*, 1998; 26: 418–428
- [21] Juszkiewicz M., Kleinrok Z., Sawiniec Z.: Pharmacological properties of racemic chlorobromofosfamide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1994; 42: 405–413
- [22] Kan O., Kingsman S., Naylor S.: Cytochrome P450-based cancer gene therapy: Current status. *Expert Opin. Biol Ther.*, 2002; 2: 857–868
- [23] Kerbusch T., de Kraker J., Keizer H.J., van Putten J.W., Groen H.J., Jansen R.L., Schellens J.H., Beijnen J.H.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. *Clin. Pharmacokinet.*, 2001; 40: 41–62
- [24] Kobylńska K., Kobylńska M., Sobik B.: Pharmacokinetics of (–)-(S)-bromofosfamide after intravenous and oral administration in mice. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2001; 51: 596–599
- [25] Kobylńska K., Koralewski P., Sobik B., Gasiorek M., Kobylńska M.: Pharmacokinetics and toxicity of oral (–)-(S)-bromofosfamide in lung cancer patients. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2001; 51: 600–603
- [26] Kuśnierczyk H., Konarski L., Kowalski P., Radzikowski C.: Influence of Mesna on urotoxic effects of selected bromosubstituted analogs of ifosfamide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1997; 45: 79–85
- [27] Kuśnierczyk H., Pajtasz-Piasecka E., Radzikowski C.: Synergistic antitumor effects of chemo-immunotherapy with an oxazaphosphorine drug and IL-2-secreting cells in a mouse colon cancer model. *Med. Oncol.*, 1999; 16: 267–278
- [28] Kuśnierczyk H., Radzikowski C., Paprocka M., Budzyński W., Kinas R.W., Misiura K., Stec W.J.: Antitumor activity of optical isomers of cyclophosphamide, ifosfamide and trofosfamide as compared to clinically used racemates. *J. Immunopharmacol.*, 1986; 8: 455–480
- [29] Lewis L.D., Meanwell C.A.: Ifosfamide pharmacokinetics and neurotoxicity. *Lancet*, 1990; 335: 175–176
- [30] Ludman S.M.: The chemistry of the metabolism of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 627–643
- [31] Malet-Martino M., Gilard V., Martino R.: The analysis of cyclophosphamide and its metabolites. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 561–586
- [32] Mancini L., Payne G.S., Dzik-Jurasz A.S., Leach M.O.: Ifosfamide pharmacokinetics and hepatobiliary uptake *in vivo* investigated using single- and double-resonance <sup>31</sup>P MRS. *Magn. Reson. Med.*, 2003; 50: 249–255
- [33] Martino R., Crasnier F., Chouini-Lalanne N.: A new approach to the study of ifosfamide metabolism by the analysis of human body fluids with <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992; 260: 1133–1144
- [34] Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej, Centralna Ewidencja Badań Klinicznych nr 044/95
- [35] Misiura K.: Synthesis and stability studies of potential metabolites of (S)-(–)-bromofosfamide. *Pharmazie*, 2004; 59: 668–672
- [36] Misiura K., Kardacka K., Kuśnierczyk H.: Synthesis, *in vitro* metabolic studies, and antitumor activity of methyl analogues of ifosfamide. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 2001; 334: 291–294
- [37] Misiura K., Kinas R.W., Kuśnierczyk H.: Studies on side-chain hydroxylation of ifosfamide and its bromo analogue. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002; 12: 156–161
- [38] Misiura K., Kinas R.W., Kuśnierczyk H., Radzikowski C., Stec W.J.: (S)-(–)-Bromofosfamide (CBM-11): synthesis and antitumor activity and toxicity in mice. *Anticancer Drugs*, 2001; 12: 453–458
- [39] Misiura K., Kinas R.W., Stec W.J., Kuśnierczyk H., Radzikowski C., Sonoda A.: Synthesis and antitumor activity of analogues of ifosfamide modified in the N-(2-chloroethyl) group. *J. Med. Chem.*, 1988; 31: 226–230
- [40] Misiura K., Okruszek A., Pankiewicz K., Stec W.J., Czownicki Z., Utracka B.: Stereospecific synthesis of chiral metabolites of ifosfamide and their determination in the urine. *J. Med. Chem.*, 1983; 26: 674–679
- [41] Misiura K., Szymanowicz D., Kuśnierczyk H., Wietrzyk J., Opolski A.: Isophosphoramidate mustard analogues as prodrugs for anticancer gene-directed enzyme-prodrug therapy (GDEPT). *Acta Biochimica Pol.*, 2002; 49: 169–176
- [42] Misiura K., Szymanowicz D., Kuśnierczyk H., Wietrzyk J., Opolski A.: Synthesis and antitumor activity of atereoisomers of 4-hydroperoxy derivatives of ifosfamide and its bromo analogue. *Farmaco*, 2002; 57: 315–319
- [43] Misiura K., Szymanowicz D., Wietrzyk J., Opolski A.: Phosphate prodrugs of isophosphoramidate mustard. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.*, 2003; 60: 109–112
- [44] Misiura K., Zielińska E., Zubowska M.: Studies of ifosfamide metabolism in children using <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2003; 53: 372–377
- [45] Niculescu-Duvaz D., Niculescu-Duvaz I., Friedlos F., Martin J., Lehouritis P., Marais R., Springer J.C.: Self-immolative nitrogen mustards prodrugs cleavable by carboxypeptidase G2 (CPG2) showing large cytotoxicity differentials in GDEPT. *J. Med. Chem.*, 2003; 46: 1690–1705
- [46] Niculescu-Duvaz I., Friedlos F., Niculescu-Duvaz D., Davies L., Springer C.J.: Prodrugs for antibody- and gene-directed enzyme prodrug therapies (ADEPT and GDEPT). *Anticancer Drug Design*, 1999; 14: 517–538
- [47] Niculescu-Duvaz I., Spooner R., Marais R., Springer C.J.: Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconjug. Chem.*, 1998; 9: 4–22
- [48] O'Byrne K., Steward W.P.: The role of chemotherapy in the treatment of adult soft tissue sarcomas. *Oncology*, 1999; 56: 13–23
- [49] Paci A., Guillaume D., Husson H.-P.: Synthesis of side-chain-substituted ifosfamide analogs. *J. Heterocyclic Chem.*, 2001; 38: 1131–1134
- [50] Paci A., Martens T., Royer J.: Anodic oxidation of ifosfamide and cyclophosphamide: A biomimetic metabolism model of the oxazaphosphorinane anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001; 11: 1347–1349
- [51] Patterson A.V., Saunders M.P., Greco O.: Prodrugs in genetic chemoradiotherapy. *Curr. Pharm Des.*, 2003; 9: 2131–54
- [52] Radzikowski C.: Raporty z badań klinicznych I/II Fazy – wyniki przygotowywane do publikacji.
- [53] Rajski S.R., Williams R.M.: DNA cross-linking agents as antitumor. *Drugs, Chem. Rev.*, 1998; 98: 2723–2795
- [54] Schmidt R., Baumann F., Knupfer H., Brauckhoff M., Horn L.C., Schonfelder M., Kohler U., Preiss R.: CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes. *Br. J. Cancer*, 2004; 90: 911–916
- [55] Skinner R., Sharkey I.M., Pearson A.O., Graft A.W.: Ifosfamide, Mesna, and nephrotoxicity in children. *J. Clin. Oncol.*, 1993; 11: 173–190
- [56] Sladek N.E.: Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Curr. Pharm. Design*, 1999; 5: 607–625
- [57] Slave I., Schuller E., Falger J., Gunes M., Pillwein K., Czech T., Dietrich W., Rossler K., Dieckmann K., Prayer D., Hainfellner J.: Feasibility of long-term intraventricular therapy with mafosfamide (n=26) and etoposide (n=11): Experience in 26 children with disseminated malignant brain tumors. *J. Neurooncol.*, 2003; 64: 239–247
- [58] Sloderbach A., Hładoń B., Sochacki M., Kinas R.W., Kuśnierczyk H., Laskowska H.: Pharmacokinetic-stereoselective differentiation of some isomeric analogues of ifosfamide. *Pol. J. Pharmacol.*, 1997; 49: 463–469





- [59] Stec W.J., Radzikowski C., Szelejewski W., Kinas R., Misiura K., Gryniewicz G., Grodner J., Kuśnierczyk H., Kutner A., Pilichowska S.: Sposób wytwarzania N-acylowych pochodnych 1,3,2-oksazafosforinanu. Patent RP 149593
- [60] Stec W.J., Radzikowski C., Szelejewski W., Kinas R., Misiura K., Gryniewicz G., Grodner J., Kuśnierczyk H., Kutner A., Pilichowska S.: Sposób wytwarzania pochodnych 1,3,2- oksazafosforinanu. Patent RP 150330
- [61] Studzian K., Kinas R., Ciesielska E., Szmigiero L.: Effects of alkylating metabolites of ifosfamide and its bromo analogues on DNA of HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1992; 43: 937–943
- [62] Waxman D.J., Chen L., Hecht J.E.D., Jounaidi Y.: Cytochrome P450-Based cancer Gene therapy: Recent advances and future prospects. *Drug Met. Rev.*, 1999; 31: 503–522