

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 495 743**

51 Int. Cl.:

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008** **E 08797320 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2173337**

54 Título: **Fosfaplatinos y su uso en el tratamiento de cánceres resistentes a cisplatino y carboplatino**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 954126 P

20.09.2007 US 973926 P

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

17.09.2014

73 Titular/es:

**OHIO UNIVERSITY (100.0%)
TECHNOLOGY TRANSFER OFFICE UNIT 14 340
WEST STATE STREET
ATHENS, OHIO 45701, US**

72 Inventor/es:

BOSE, RATHINDRA N.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 495 743 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fosfaplatinos y su uso en el tratamiento de cánceres resistentes a cisplatino y carboplatino

Antecedentes de la invención

Los complejos de platino-diamina se conocen bien en la técnica debido al éxito extraordinario de cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino) para el tratamiento del cáncer ovárico, testicular, de cabeza y cuello, y otras formas de cáncer. Además, el cisplatino se usa junto con otros regímenes terapéuticos que incluyen la radioterapia. Este platino quimioterápico actúa como mediador en la apoptosis en la fase G2 del ciclo celular de manera predominante por medio de la inhibición de la transcripción y por medio de procesos de inhibición de la replicación, especialmente a dosis elevadas. En general se cree que la unión covalente al ADN por medio de los sitios N7 de las bases de guanina y adenina, de modo intra- e inter-catenario, es el suceso molecular clave en la transducción de una cascada de respuestas celulares que conducen a la apoptosis.

Aunque el cisplatino es muy eficaz, exhibe toxicidad renal, nefrotoxicidad, y neurotoxicidad. Además, muchos pacientes desarrollan resistencia al tratamiento con cisplatino con el tiempo, y por lo tanto no se curan mediante el tratamiento con cisplatino. Se cree también que otros dos fármacos de platino aprobados por la FDA, carboplatino (diamino-1,1-dicarboxilatociclobutano-platino(II)) y oxaliplatino (diamino-oxalatoplatino(II)), funcionan de una manera similar a la de cisplatino. El carboplatino es especialmente eficaz hacia las células tumorales resistentes a cisplatino, pero se necesitan dosis relativamente elevadas para tratar de manera eficaz a pacientes que son resistentes a cisplatino. Tales dosis elevadas también tienen toxicidades asociadas.

Se han sintetizado muchos complejos nuevos de platino-amina y se han ensayado sus actividades antineoplásicas. Sin embargo, solamente algunos de estos complejos (algunos de los cuales se enumeran en la Figura 14) han exhibido resultados prometedores. Estos complejos nuevos contienen una diversidad de ligandos sustituibles distintos de amina, así como ligandos amina no sustituibles que se cree que son importantes para la unión al ADN y la absorción celular. En general, estos y otros complejos de platino-amina relevantes conocidos en la técnica se sintetizan mediante el proceso usado para preparar cisplatino, concretamente en el que tetracloroplatinato (PtCl_4^{2-}) recibe los ligandos amina para convertirse en $\text{PtCl}_2(\text{amina/diamina})$. Partiendo del complejo de tetracloro se proporcionan en general otros productos, y así también se puede usar PtCl_4^{2-} para asegurar un rendimiento elevado y la pureza del isómero cis, seguido por la conversión de PtCl_4^{2-} en $\text{PtCl}_2(\text{amina/diamina})$ y después en $\text{PtCl}_2(\text{amina/diamina})$. Al convertir $\text{PtCl}_2(\text{amina/diamina})$ en $\text{PtCl}_2(\text{amina/diamina})$, el complejo di-yodo se convierte en complejo diaqua tratando el primero con dos equivalentes de nitrato de plata u otras sales de plata solubles a pH bajo. El complejo diaqua resultante reacciona fácilmente con cloruro potásico o ácido clorhídrico para producir el complejo dicloro de interés. En general, los complejos de platino de interés se sintetizan a partir del complejo diaqua correspondiente a un pH bajo para introducir los ligandos sustituibles, ya que la dimerización o polimerización del complejo diaqua tiene lugar rápidamente a un pH superior, lo que genera productos indeseables.

En vez de ligandos cloro sustituibles, los complejos de platino-amina de la técnica también tienen nitrógeno, azufre, carboxilato, y fosfonato como ligandos sustituibles. Sin embargo, una característica de esos complejos, que son los más prometedores para tratar el cáncer, es un ligando de base fuerte sustituible coordinado con platino (un ácido débil). Los ejemplos de tales combinaciones fuerte-débil que han exhibido propiedades antineoplásicas excelentes son los complejos de platino con carboxilato, carbonato, fosfonato.

A pesar de los intentos extraordinarios de sustituir cisplatino con agentes quimioterápicos más eficaces, los complejos de platino(II) y platino(IV) con fosfatos como ligandos sustituibles han quedado en gran medida sin investigar. Esto es principalmente debido al hecho de que los primeros trabajos sobre los complejos de platino(II)-fosfato normalmente dieron como resultado complejos dinucleares conectados por fosfato. A pesar de los informes sobre las propiedades antineoplásicas excelentes de ciertos complejos de fosfatoplatino(II) dinucleares, el estudio adicional de sus aplicaciones fue limitado debido a la escasa solubilidad de estos complejos en disoluciones acuosas. Aunque se conocen ciertos complejos monoméricos de pirofosfato y trifosfato en la técnica, tales complejos no son adecuados para las composiciones farmacéuticas porque experimentan la hidrólisis del fosfato en disoluciones moderadamente ácidas, lo que da como resultado productos dinucleares insolubles (véase el documento US 7.342.122 de Odani et al., que describe un dímero del complejo monomérico am-2 que se describe en la presente memoria y en Bose et al., Inorg. Chem. 1985, 24, 3989-3996; véase también el documento WO 2005/000858 de Odani et al., que describe am-2 monomérico como un fármaco antineoplásico potencial).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de alternativas estables y eficaces al cisplatino y carboplatino para el tratamiento de cánceres.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona composiciones que comprenden fosfaplatinos, complejos de fosfato monoméricos estables de platino (II) y (IV), para el uso en un método para tratar el cáncer, como se define en las reivindicaciones.

También se proporcionan métodos para producir y aislar fosfaplatinos, como se define en las reivindicaciones.

Se describen métodos para tratar cánceres, que incluyen los cánceres resistentes a cisplatino y/o carboplatino, mediante la administración de una cantidad eficaz de fosfaplatinós, solos o en combinación, con un excipiente farmacéuticamente aceptable, a un sujeto que necesita tal tratamiento.

Descripción breve de los dibujos

5 La FIGURA 1 muestra estructuras de algunos de los complejos de platino (II) y platino (IV) de la presente invención, en los que R1, R2, R3 y S son como se definen en las reivindicaciones. De acuerdo con las reivindicaciones 1 y 20, ciertos complejos que se excluyen de estas estructuras también forman parte de la invención. En ciertas realizaciones, R1 y R2 se seleccionan de amina, metil amina, etil amina, propil amina, isopropil amina, butil amina, ciclohexano amina, anilina, piridina, y piridina sustituida. En ciertas realizaciones, R3 se selecciona de etilendiamina y ciclohexanodiamina.

En ciertas realizaciones, se reivindican las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos.

15 La FIGURA 2 muestra estructuras de ciertos complejos aislados de la presente invención, concretamente (A) diamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II), también conocido como am-2; (B) *cis*-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), también conocido como am-4; (C) 1,2-etanodiamino(dihidrogenopirofosfato) platino(II), también conocido como en-2; (D) 1,2-etanodiamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), también conocido como en-4; (E) (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II), también conocido como dach-2; y (F) (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), también conocido como dach-4.

La FIGURA 3 muestra la estructura cristalina de rayos X de am-4 con un contraión de sodio.

20 La FIGURA 4 muestra la estructura cristalina de rayos X de en-4 en sus diferentes conformaciones, vista desde el lado de pirofosfato.

La FIGURA 5 muestra el grado de protonación de los complejos mostrados en la Figura 2, tal como se mide mediante el desplazamiento químico de ^{31}P , como función del pH. Las constantes de acidez estimadas se enumeran en la Tabla 1. Estos datos proporcionan conocimientos sobre las diferencias de solubilidad de estos complejos entre la disolución ácida y la disolución neutra. En las condiciones descritas a valores de pH por debajo de 2, estos complejos están completamente protonados, y por lo tanto se espera que exhiban una solubilidad reducida.

30 La FIGURA 6 exhibe la estabilidad diferencial de dach-2 a (A) pH 4,2 y (B) pH 8. A pH 8, no se observó descomposición de dach-2, tal como se demuestra mediante la retención del ión de pirofosfato coordinado con platino(II) hasta seis días. En contraste, a pH 4,2, es evidente una descomposición considerable debida a la aparición de la señal de pirofosfato libre. Partiendo del espectro inferior en cada panel, se registraron los espectros a intervalos de tiempo de 24 horas.

La FIGURA 7 es un gráfico de la comparación del efecto citotóxico de dach-2, cisplatino, y carboplatino en función de la concentración micromolar en líneas de células ováricas humanas resistentes a cisplatino y carboplatino (A2780/C30). Esta línea celular es resistente a cisplatino 30 micromolar y carboplatino 100 micromolar.

35 La FIGURA 8 es un gráfico que compara el efecto citotóxico de dach-2 con los fármacos antineoplásicos cisplatino y carboplatino aprobados por la FDA hacia líneas de células ováricas humanas (A2780).

40 La FIGURA 9 representa la citotoxicidad de dach-2 hacia líneas de células de cáncer de cabeza y cuello (A) sensibles a cisplatino y (B) resistentes a cisplatino. Los valores de CI₅₀ para dach-2 para las células sensibles a cisplatino están por debajo de 1 micromolar, y para las células resistentes a cisplatino, están por debajo de 5 micromolar.

45 La FIGURA 10 muestra que a una concentración dada, las células absorben dach-2 (tal como se determina mediante espectroscopía de absorción atómica) en cantidades reducidas en comparación con cisplatino. Por ejemplo, a una concentración 10 μM , la acumulación de cisplatino en las células A2780 fue 3,0 ng Pt/ 10^6 células, mientras dach-2 mostró 1,0 ng Pt/ 10^6 células. Se mantiene una tendencia similar para las acumulaciones de platino para otras concentraciones.

La FIGURA 11 muestra el grado de unión al ADN de cisplatino en función de la concentración en la línea de células ováricas humanas (A2780) medida mediante espectroscopía de absorción atómica después de incubar cisplatino durante 2 horas. No se detectó platino unido al ADN mediante la misma técnica cuando las células A2780 se trataron con dach-2 hasta una concentración 50 micromolar, incluso cuando las células se trataron durante 24 horas.

50 La FIGURA 12 es una comparación de la unión a la base guanina (el sitio de unión al ADN predominante de cisplatino) entre cisplatino (parte inferior), am-2 (centro), y dach-2 (parte superior) mediante espectroscopía de RMN de protón. El espectro superior exhibe una señal para la base de guanina libre a 8,05 ppm para el hidrógeno H8 del anillo de purina, el espectro inferior revela una señal adicional a 8,43 ppm para el protón de H8 debido a la unión de guanina a cisplatino por medio del sitio de N7 del anillo de purina, y el espectro del centro indica solamente la señal

de H8 de guanina sin unir, pero no la señal de platino unido. El espectro inferior se registró después de 48 horas. Los espectros central y superior se registraron después de 96 y 106 horas, respectivamente. El hecho de que los complejos de la presente invención no se unan de manera covalente a las bases de guanina (el sitio de unión al ADN para cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino) sugiere unos mecanismos apoptóticos que son diferentes de los propuestos para cisplatino.

La FIGURA 13 muestra datos de espectroscopía de ^1H RMN que confirman la ausencia de unión al ADN en células ováricas humanas mediante dach-2. En el experimento asociado, dach-2 se dejó reaccionar con ADN bicatenario de timo de ternero, un oligonucleótido sintético (5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3'), un dinucleótido (dGpG), y monofosfatos de nucleótidos (5'-dGMP y 5'-dAMP) a concentraciones hasta 250 veces mayores que las de las dosis celulares. El grado de unión al ADN se monitorizó mediante espectroscopía de ^1H RMN. En paralelo, se llevaron a cabo reacciones similares con cisplatino en condiciones idénticas. Los resultados de un experimento de RMN típico mediante el uso de un oligonucleótido 25-mérico se muestran en la figura, que demuestra que dach-2 no exhibe una unión medible al ADN, mientras cisplatino forma fácilmente aductos covalentes con el ADN, tal como se demuestra mediante la formación de señales nuevas en la región de 8,4 a 8,95 ppm. Sin embargo, el cisplatino formó fácilmente aductos con todos los nucleótidos indicados anteriormente, mientras no se observaron señales detectables de RMN para la unión de dach-2 a los nucleótidos incluso después de siete días.

La FIGURA 14 muestra estructuras de algunos de los complejos de platino activos conocidos en la técnica que se están usando como fármacos, que se están estudiando como fármacos potenciales, o que se están sometiendo a ensayos clínicos.

La FIGURA 15 muestra estructuras de complejos usados para formar los complejos de fosfaplatino de la FIGURA 1; X es halógeno, R1, R2 y R3 se seleccionan cada uno independientemente de aminas alifáticas o aromáticas sustituidas o sin sustituir.

Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan complejos de platino (II) y (IV)-pirofosfato monoméricos estables (denominados fosfaplatinos) para el tratamiento del cáncer, que incluye el tratamiento de cánceres resistentes a cisplatino y/o carboplatino. En general, los fosfaplatinos no experimentan hidrólisis fácilmente, son solubles en disolución acuosa a pH neutro, y son estables en disolución acuosa a pH neutro. Además, los fosfaplatinos muestran una citotoxicidad general en las líneas celulares cancerosas, y son eficaces en las líneas celulares que son resistentes a uno o ambos de cisplatino y carboplatino. Por lo tanto, los fosfaplatinos son eficaces, y en ciertos casos más eficaces, para inducir la muerte de las células cancerosas en comparación con los fármacos antineoplásicos conocidos de platino, y exhiben una estabilidad y solubilidad deseables en disoluciones que son adecuadas para la administración a pacientes. Tal como se usa en la presente memoria, en referencia a los fosfaplatinos de la invención, estable se refiere a la resistencia de los complejos a la hidrólisis cuando se mantienen en disolución acuosa a un pH en el intervalo de 6-8 durante un periodo de tiempo de entre 2 y seis días.

Se cree que los fosfaplatinos, a diferencia de cisplatino, carboplatino, y los agentes antineoplásicos basados en platino relacionados, no se unen de manera covalente al ADN. Debido a que se cree que la resistencia a cisplatino procede de la reparación eficaz de la lesión del ADN mediante una diversidad de enzimas que incluyen las enzimas de reparación de escisiones nucleares, y debido a que los fosfaplatinos no se unen de manera covalente al ADN, la resistencia hacia los fosfaplatinos debida al mecanismo de reparación del ADN es improbable. Los datos sugieren que los fosfaplatinos desencadenan la sobreexpresión de los factores de transcripción fas y relacionados con fas y ciertos genes proapoptóticos tales como Bak y Bax. Además, la unión celular de los fosfaplatinos es mucho menor que la de cisplatino, y sin embargo los fosfaplatinos exhiben una citotoxicidad extraordinaria. Así, la presente invención proporciona agentes antineoplásicos de platino eficaces que tienen un objetivo molecular diferente que los de la técnica.

En ciertas realizaciones, los complejos tienen las fórmulas generales mostradas en la Figura 1, en las que R1, R2, R3 y S son como se definen en las reivindicaciones. De acuerdo con las reivindicaciones 1 y 20, ciertos complejos que se excluyen de estas estructuras también forman parte de la invención. En ciertas realizaciones, R1 y R2 se seleccionan de amina, metil amina, etil amina, propil amina, isopropil amina, butil amina, ciclohexano amina, anilina, piridina, y piridina sustituida. En ciertas realizaciones, R3 se selecciona de etilendiamina y ciclohexanodiamina.

En ciertas realizaciones, se reivindican las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos. Así, los agentes antineoplásicos de la presente invención incluyen, en ciertas realizaciones, los complejos de la Figura 2.

También se proporcionan en la presente memoria métodos para sintetizar y aislar complejos de platino (II) y (IV)-pirofosfato monoméricos estables. En un ejemplo, el método incluye formar complejos que tienen la fórmula de la Figura 1 (I) y (III) manteniendo una mezcla de reacción acuosa que comprende pirofosfato en exceso y un complejo de platino de las fórmulas mostradas en la Figura 15 en las que R¹, R², R³ y X son como se define en las reivindicaciones; a una temperatura de alrededor de 30 a alrededor de 60 grados Celsius durante un periodo de alrededor de 12 a alrededor de 18 horas a un pH de alrededor de 7 a alrededor de 9.

Los complejos mostrados en la Figura 15 se pueden producir de cualquier manera adecuada. En ciertos ejemplos, tal como se describe en general en la técnica, los complejos de *cis*-(amina/diamina)dicloroplatino(II) se pueden preparar convirtiendo K_2PtCl_4 en K_2PtI_4 mediante la adición de yoduro potásico. Esto se hace reaccionar después con los ligandos amina deseados. Los complejos de *cis*-(amina/diamina)diiodoplatino(II) resultantes se transforman después en los complejos de *cis*-(amina/diamina)diaquaplatino(II) correspondientes in situ añadiendo dos equivalentes de nitrato de plata. La especie *cis*-diaqua $[Pt(amina/diamina)_2(H_2O)_2]^{2+}$ se convierte después en los complejos de *cis*-dicloro mediante la adición de cloruro potásico.

Se entenderá que se pueden usar otras condiciones de reacción adecuadas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la temperatura puede ser de alrededor de 35 a alrededor de 45 grados C. Así, la temperatura de reacción puede ser de alrededor de 30-31, 31-32, 32-33, 33-34, 34-35, 35-36, 36-37, 37-38, 38-39, 39-40, 40-41, 41-42, 42-43, 43-44, 44-45, 45-46, 46-47, 47-48, 48-49, 49-50, 50-51, 51-52, 52-53, 53-54, 54-55, 55-56, 56-57, 57-58, 58-59, 59-60 grados C, y los incrementos entre ellos. Se han obtenido buenos resultados a 40 grados C. En ciertos ejemplos, la reacción se deja desarrollar de alrededor de 13 a alrededor de 16 horas. Así, el tiempo de reacción puede ser de alrededor de 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 16-17, y 17-18 horas y los incrementos entre ellos. Se han obtenido buenos resultados con tiempos de reacción de 15 horas. En ciertos ejemplos, el pH puede ser de alrededor de 6-7, 7-8, y 8-9 y los incrementos entre ellos. Se han obtenido buenos resultados a un pH de alrededor de 8.

El método incluye además concentrar posteriormente la mezcla de reacción acuosa de forma que no se formen precipitados de pirofosfato. Se entenderá que la mezcla de reacción acuosa se puede concentrar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la mezcla de reacción acuosa se puede concentrar mediante evaporación rotatoria.

El método incluye además bajar rápidamente el pH de la mezcla de reacción a un pH menor de 2 mediante la adición de un ácido adecuado. En ciertos ejemplos, se puede usar ácido nítrico para bajar el pH. En ciertas realizaciones, el pH está en el intervalo de alrededor de 1 a menos de 2. Se han obtenido buenos resultados a pH 1.

En ciertos ejemplos, el método también incluye la mezcla de reacción a una temperatura de entre 5 grados Celsius y la temperatura ambiente después de concentrar la mezcla de reacción. En otros ejemplos, el método también incluye enfriar la mezcla de reacción a una temperatura de entre 5 grados Celsius y la temperatura ambiente después de bajar el pH de la mezcla de reacción.

En otras realizaciones, se proporcionan métodos para formar complejos según la Figura 1 (II) y (IV). Los métodos son como se describieron anteriormente, pero además comprenden añadir a la mezcla de reacción peróxido de hidrógeno, y opcionalmente un reactivo seleccionado del grupo de sales de acetato, sales de butirato, y sales de alfa-hidroxi ácidos después de mantener la mezcla de reacción a una temperatura de alrededor de 30 a alrededor de 60 grados Celsius durante un periodo de alrededor de 12 a alrededor de 18 horas a un pH de alrededor de 7 a alrededor de 9.

En ciertos ejemplos, el reactivo opcional añadido junto con peróxido de hidrógeno antes de concentrar la mezcla de reacción se selecciona de acetato sódico, butirato sódico, y sales sódicas de alfa-hidroxi ácidos. En otros ejemplos, el reactivo opcional añadido junto con peróxido de hidrógeno antes de concentrar la mezcla de reacción se selecciona de acetato potásico, butirato potásico, y sales potásicas de alfa-hidroxi ácidos.

El método de síntesis y aislamiento de los complejos monoméricos descritos en la presente memoria se puede distinguir respecto de la técnica, ya que el método nuevo no produce compuestos de fosfato diméricos u oligoméricos. Por ejemplo, el método informado por Bose et al. en Inorg. Chem. 1985, 24, 3989-3996 ("Bose 1985"), que implica el aislamiento de $Pt(NH_3)_2(H_2P_2O_7)$ (am-2) de la mezcla de reacción absorbiendo el complejo de pirofosfato aniónico en una resina de intercambio aniónico a pH neutro y eluyéndolo con un eluyente de pH inferior, no fue útil para la síntesis y el aislamiento de am-4, en-2, en-4, dach-2, y dach-4. Cuando se usó el método de Bose 1985, estos complejos se descompusieron en los lechos de intercambio iónico cuando la separación se intentó mediante elución con un electrolito de pH inferior. Inicialmente, los complejos se volvieron de color negro pardusco, seguido de la formación de un precipitado negro insoluble dentro de las resinas de intercambio iónico. La separación de am-4, en-2, en-4, dach-2, y dach-4 de sus mezclas de reacción respectivas fue posible solamente cuando el método de Bose 1985 se modificó como se describe en la presente memoria. Cada mezcla de reacción se concentró mediante evaporación a vacío hasta el punto de que el ácido pirofosfórico sin reaccionar no precipitó cuando se bajó el pH en una etapa posterior (la solubilidad del ligando pirofosfato varía mucho con el pH). Para iniciar la precipitación selectiva, las concentraciones finales fueron de 0,05 M a 0,08 M, ya que la reducción adicional del volumen dio como resultado la coprecipitación del pirofosfato sin reaccionar que debe estar presente en exceso durante la reacción. Después de concentrar, las mezclas de reacción se enfriaron y el pH se bajó rápidamente a 1,0 para inducir la precipitación aprovechando las diferencias de solubilidad entre las formas protonadas y desprotonadas de los complejos.

A pH neutro, los complejos de Pt(II) y Pt(IV) monoméricos aislados de la presente invención son estables. Tal como se indica mediante los espectros de ^{31}P RMN, en el intervalo de pH 6-8 los complejos no experimentaron disociación debida a la pérdida de un ligando amina o pirofosfato a lo largo del intervalo de tiempo de seis días a pH neutro en disolución acuosa. Sin embargo, en el mismo intervalo de tiempo, fue evidente una disociación lenta debida a la liberación del ligando pirofosfato a pH 4,2 por la aparición de la señal de pirofosfato libre a -10,3 ppm. Al mismo

tiempo, se formó un producto insoluble de platino(II) dinuclear conectado por pirofosfato. Los datos también indican que la descomposición ácida depende en gran medida de la acidez, cuanto mayor sea la acidez, más rápida será la descomposición (véase la Figura 5, Tabla 1, y Tabla 2).

5 Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ , ppm) para complejos de platino(II) y platino(IV)-pirofosfato desprotonados y las constantes de acoplamiento de Pt-P

Complejo	δ - ^{31}P , ppm	δ - ^{195}Pt , ppm	$J_{\text{P-Pt}}$, Hz
am-2	2,12	-1503	23,44
dach-2	1,78	-1729	25,03
en-2	1,93	N/A	29,73
am-4	2,32	1733	15,38
dach-4	2,41	1613	25,91
en-4	2,35	1582	25,91

Tabla 2. Valores de pKa calculados (-log de las constantes de acidez) para los complejos de Pt(II) y Pt(IV)-pirofosfato determinados a partir de los desplazamientos químicos de fósforo-31

Complejo	pKa ₁	pKa ₂
am-2	2,9±0,3 (3,8±0,1)	4,7±0,2
en-2	2,2±0,1	4,4±0,1
dach-2	2,6±0,2 (3,3±0,1)	4,4±0,2
am-4	2,0±0,1	4,7±0,1
en-4	<2	4,3±0,1

Los complejos de la presente invención son útiles para tratar diversos cánceres. Los ensayos citotóxicos en líneas de células ováricas humanas (A2780) y células ováricas de hámster chino (CHO) demuestran que estos complejos son eficaces como una primera ronda de tratamiento, y los ensayos con células ováricas resistentes a cisplatino y carboplatino (C30) (véase la Tabla 3) demuestran que estos complejos son una segunda ronda de tratamiento adecuada para los cánceres resistentes. Los complejos de la presente invención son especialmente deseables, porque pueden tener una toxicidad reducida *in vivo*. Estos complejos son absorbidos por las células en cantidades reducidas, en comparación con cisplatino, lo que indica que se pueden necesitar dosis inferiores en comparación con las dosis de cisplatino y otros agentes quimioterápicos de platino. Por ejemplo, a una concentración de 10 μM , la acumulación de cisplatino en las células A2780 fue 3,0 ng Pt/10⁵ células, mientras dach-2 mostró 1,0 ng Pt/10⁶ células, y en las líneas de células resistentes, dach-2 mostró 1,4 ng Pt/10⁶ células en su valor de CI₅₀, mientras cisplatino mostró > 5 ng Pt/10⁵ células, aunque el valor de CI₅₀ para el primer complejo es menor de la mitad del segundo complejo (véase la Figura 10 y la Tabla 4).

20 Tabla 3. Valores de CI₅₀ en concentraciones μM para Fosfaplatinos, cisplatino, y carboplatino en líneas celulares A270, A2780/C30 y CHO

Complejo	A780	A2780/C30	CHO
Cisplatino	7,5 ±1,5	110±11,29	29±3
Carboplatino	90±13	>200	>200
dach-2	20±4	48±5	35±5
dach-4	180±15	155±17	116±17
am-2	100±11	>200	120±30
am-4	175±22	>200	>200
en-4	170±33	>200	>200

Tabla 4. Acumulaciones Celulares Comparativas (ng/10⁶ células) de Platino para cisplatino y pirodach-2 en Líneas Celulares A2780 y A2780/C30

	A2780		A2780/C30	
Concentración (μM)	Cisplatino	dach-2	Cisplatino	dach-2
10	3,00 ± 0,05	1,00 ± 0,20	1,00 ± 0,10	0,10 ± 0,08
20	5,00 ± 0,06	1,50 ± 0,30	2,00 ± 0,40	1,00 ± 0,02
30	6,00 ± 0,10	3,00 ± 1,00	2,00 ± 0,50	1,00 ± 0,02
50	20,00 ± 1,00	5,00 ± 0,30	5,00 ± 1,00	2,00 ± 0,10

Los datos sugieren que los complejos de la presente invención pueden inducir la apoptosis mediante mecanismos moleculares y celulares diferentes que los de cisplatino y otros fármacos de platino. En primer lugar, la ausencia de unión covalente (véase la Figura 12 y el Ejemplo 13) indica que los complejos de la invención no funcionan a través de la ruta de unión al ADN. Los expertos en la técnica creen en general que la resistencia adquirida a cisplatino se debe a la eliminación eficaz de platino del ADN mediante el proceso de reparación de escisiones de nucleótidos. Debido a la ausencia aparente de unión al ADN, y por lo tanto la posibilidad de que los mecanismos de reparación del ADN no funcionen con los complejos de la invención, se puede eliminar la resistencia celular a los complejos. Esta conclusión está respaldada por los datos de citotoxicidad que demuestran que dach-2 es activo en líneas celulares resistentes tanto a cisplatino como a carboplatino (véase la Tabla 3).

En segundo lugar, existen pruebas de que los complejos de la presente invención inducen la apoptosis mediante mecanismos moleculares y celulares diferentes de los de cisplatino y otros fármacos de platino que proceden de experimentos en los que dach-2 se dejó reaccionar con cisteína y glutatión (datos no mostrados). El ligando pirofosfato de dach-2 se sustituyó fácilmente con una unión concomitante por medio del tiol, lo que indica posibles sitios de anclaje de las proteínas de la superficie celular a través de residuos de cisteína o metionina.

En tercer lugar, también existen pruebas de que los complejos de la presente invención inducen la apoptosis mediante mecanismos moleculares y celulares diferentes que los de cisplatino y otros fármacos de platino, que proceden de experimentos que implican la sobreexpresión de fas y sus miembros asociados (véase el Ejemplo 11). Tal sobreexpresión en respuesta a los complejos de la invención implica que muy probablemente están implicadas rutas de transducción de señales distintas de las rutas de lesión del ADN en la exhibición de las actividades citotóxicas de los complejos de la invención. Por término medio, fas se sobreexpresó en un factor de seis cuando las células se trataron con los complejos de la presente invención, aunque no se observó una sobreexpresión significativa en las células tratadas con cisplatino.

Como se describe en la presente memoria, los complejos de la presente invención son tan eficaces o más eficaces que los usados habitualmente cisplatino y carboplatino, por lo que se proporciona un método de tratamiento del cáncer para pacientes que previamente carecían de alternativas eficaces al tratamiento con cisplatino y carboplatino. Sin embargo, no es necesario que un paciente se haya tratado previamente con cisplatino o carboplatino para tratarlo con los complejos descritos en la presente memoria. La administración del tratamiento la puede llevar a cabo el personal médico en un hospital u otra instalación médica.

Los complejos de la presente invención se administran y dosifican de acuerdo con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el método de administración, el calendario de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos para los médicos. La "cantidad eficaz" farmacéuticamente para los propósitos de la presente memoria se determina así mediante tales consideraciones, tal como se conoce en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para conseguir una mejora que incluye, pero sin limitación, una tasa de supervivencia mejorada o una recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores, según sean seleccionados como medidas adecuadas por los expertos en la técnica. Los complejos de la presente invención se pueden administrar a animales, que incluyen mamíferos.

Los complejos de la presente invención se pueden administrar de diversas maneras. Se debería indicar que se pueden administrar como el complejo, y se pueden administrar solos en disolución acuosa aprovechando la solubilidad excelente de estos complejos, o como un ingrediente activo en combinación con excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los complejos se pueden administrar de manera oral, subcutánea o parenteral, que incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intraamigdalina, e intranasal, así como intratecal y técnicas de infusión. También son útiles los implantes de los complejos. El paciente a tratar es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos que incluyen el hombre. Los excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los excipientes para implantes se refieren en general a rellenos, diluyentes o materiales de encapsulación sólidos o líquidos inertes y atóxicos que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención.

Las dosis pueden ser dosis simples o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días. El tratamiento tiene en general una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad, y la eficacia del fármaco y la especie del paciente a tratar.

Cuando los complejos de la presente invención se administran de manera parenteral, se formularán en general en una forma farmacéutica unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El excipiente puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, polietilen glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. También se pueden usar vehículos no acuosos tales como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas de disolventes para las composiciones. Además, se pueden añadir diversos aditivos que aumentan la estabilidad, esterilidad, e isotonicidad de las composiciones, que incluyen conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, carbohidratos, cloruro sódico, y similares. Se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante el uso de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente, o aditivo usado tendría que ser compatible con los complejos.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando los complejos utilizados en la práctica de la presente invención en la cantidad necesaria del disolvente adecuado con otros diversos ingredientes, según se desee.

Se puede administrar una formulación farmacológica de la presente invención al paciente en una formulación inyectable que contenga cualquier excipiente compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos, y diluyentes; o los complejos utilizados en la presente invención se pueden administrar de manera parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de administración dirigida tales como anticuerpos monoclonales, administración en vectores, iontoforesis, matrices poliméricas, liposomas, y microesferas. Los expertos en la técnica conocen otros muchos implantes, sistemas de administración, y módulos.

La invención se describe además con detalle mediante referencia a los ejemplos experimentales siguientes. Estos ejemplos se proporcionan con fines de ilustración solamente, y no se deben considerar limitantes.

La descripción anterior y los ejemplos siguientes demuestran la síntesis de complejos de platino-pirofosfato de una manera diferente a los métodos de síntesis descritos previamente. Se ha demostrado que estos complejos tienen actividades antineoplásicas, incluso en los cánceres resistentes a cisplatino y carboplatino. De manera inesperada, las actividades antineoplásicas mostradas son comparables y activas a dosis relativamente inferiores que las de ciertos complejos de platino administrados actualmente. También de manera inesperada, los datos sugieren que los complejos de la presente invención tienen un mecanismo de acción diferente que el de los complejos de platino administrados actualmente, concretamente no se unen al ADN durante el tratamiento. Así, los complejos de la presente invención representan una clase nueva de agentes terapéuticos de platino útiles para tratar cánceres, que incluyen los cánceres resistentes a cisplatino y carboplatino, en los que previamente ha sido difícil obtener un tratamiento eficaz.

Ejemplo 1: Diamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II) (am-2)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de cisplatino en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, la disolución se concentró hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N precipitó el producto en forma de un polvo amarillo claro. La precipitación se completó enfriando en hielo, y el producto se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua fría y acetona. Producción de Pt(NH₃)₂(H₂P₂O₇): 0,04 g (30%). El espectro de ³¹P RMN muestra un único pico a 2,12 ppm, pH 7,99 con respecto a ácido fosfórico del 85% como referencia externa. La resonancia de ¹⁹⁵Pt RMN se detecta a -1503 ppm.

Ejemplo 2: *Cis*-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) (am-4)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de cisplatino en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, se añadió 1 mL de H₂O₂ del 30% a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar durante otras 3 horas. La disolución se concentró después hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N precipitó el producto en forma de un

polvo amarillo claro. La precipitación se completó enfriando en hielo, y el producto se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua fría y acetona. Producción de *cis*, *trans*-Pt(NH₃)₂(OH)₂(H₂P₂O₇): 0,05 g (34%). El espectro de ³¹P RMN muestra un único pico a 2,32 ppm, pH 8,11, con una constante de acoplamiento de ¹⁹⁵Pt-³¹P de 15,4 Hz. El espectro de ¹⁹⁵Pt RMN muestra un quinteto a 1733 ppm con una constante de acoplamiento de ¹⁹⁵Pt-¹⁴N de 232 Hz.

5 Ejemplo 3: 1,2-Etanodiamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II) (en-2)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de dicloro(etilendiamino)platino(II) en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, la disolución se concentró hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N no precipitó el producto. El producto se caracterizó *in situ* mediante ³¹P RMN. Se observa un único pico a 1,93 ppm en el espectro de ³¹P RMN con una constante de ¹⁹⁵Pt-³¹P de 29,73 Hz.

Ejemplo 4: 1,2-Etanodiamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV) (en-4)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de dicloro(etilendiamino)platino(II) en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, se añadió 1 mL de H₂O₂ del 30% a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar durante otras 3 horas. La disolución se concentró después hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N precipitó el producto en forma de un polvo amarillo claro. La precipitación se completó enfriando en hielo, y el producto se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua fría y acetona. Producción de *trans*-Pt(OH)₂(C₂H₈N₂)(H₂P₂O₇): 0,07 g (49%). El espectro de ³¹P RMN muestra un único pico a 2,30 ppm, pH 8,13, con una constante de acoplamiento de ¹⁹⁵Pt-³¹P de 25,9 Hz. El espectro de ¹⁹⁵Pt RMN mostró un pico ancho a 1582 ppm.

Ejemplo 5: (*Trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II) (dach-2)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de dicloro(*trans*-1,2-diaminociclohexil)platino(II) en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, la disolución se concentró hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N precipitó el producto en forma de un polvo amarillo claro. La precipitación se completó enfriando en hielo, y el producto se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua fría y acetona. Producción de *trans*-Pt(C₆H₁₄N₂)(H₂P₂O₇): 0,05 g (38%). El espectro de ³¹P RMN muestra un único pico a 1,78 ppm, pH 7,93 con una constante de ¹⁹⁵Pt-³¹P de 25,03 Hz. La señal de ¹⁹⁵Pt RMN se registra a -1729 ppm.

Ejemplo 6: (*Trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV) (dach-4)

Se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,4 g) y 0,1 g de dicloro(*trans*-1,2-diaminociclohexil)platino(II) en 250 mL de agua destilada, pH 8, y se incubó a 40 grados C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, se añadió 1 mL de H₂O₂ del 30% a la mezcla de reacción, y se dejó reaccionar durante otras 3 horas. La disolución se concentró después hasta 5-10 mL mediante evaporación rotatoria y se filtró para eliminar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápida del pH hasta aproximadamente 1,0 mediante la adición de HNO₃ 1 N precipitó el producto en forma de un polvo amarillo claro. La precipitación se completó enfriando en hielo, y el producto se aisló mediante filtración a vacío y se lavó con agua fría y acetona. Producción de *trans*-Pt(OH)₂(C₆H₁₄N₂)(H₂P₂O₇): 0,07 g (52%). El espectro de ³¹P RMN muestra un único pico a 2,41 ppm, pH 7,95, con una constante de acoplamiento de ¹⁹⁵Pt-³¹P de 25,9 Hz. El espectro de ¹⁹⁵Pt RMN mostró un pico ancho a 1613 ppm.

Ejemplo 7

La espectroscopía de ³¹P RMN se puede usar para confirmar que los complejos de diamino(pirofosfato)platino(II) y diamino(dihidroxo)(pirofosfato)platino(IV) respectivos mostrados en la Figura 2 y descritos en los Ejemplos 1-6 se sintetizaron y aislaron mediante el método nuevo descrito en la presente memoria.

Cada uno de los complejos exhibió una única resonancia de ³¹P RMN con desplazamientos químicos en el intervalo 1,78-2,12 ppm. Estos desplazamientos químicos están 9-11 ppm a campo bajo en comparación con el ligando pirofosfato libre, de forma coherente con los desplazamientos químicos de coordinación observados para los quelatos de fosfato informados en la técnica. Los complejos de pirofosfato monodentados no se detectaron en los productos finales, tal como se revela mediante la ausencia de los dos grupos de dobletes esperados. Los datos de ³¹P RMN también demostraron que la oxidación de los complejos de Pt(II) hasta complejos de Pt(IV) mediante H₂O₂ fue selectiva, tal como se demostró mediante la formación de un complejo de pirofosfatoplatino(IV) único en cada caso.

Ejemplo 8

Se obtuvieron células de cáncer ovárico humano, A2780, del Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, PA). Las células se cultivaron en monocapa mediante el uso de RPMI 1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 0,25 unidades/mL de insulina y penicilina/estreptomicina en un incubador a 37 grados C gasificado continuamente con un 5% de CO₂. Las células se subcultivaron mediante el uso de un 0,0625% de tripsina en HBSS para mantener las células en crecimiento exponencial.

Se determinaron los valores de CI50 mediante el uso de un ensayo clonogénico. Brevemente, se sembraron 500 células A2780 de una suspensión de células individuales en placas Petri de 60 mm 24 horas antes del tratamiento con el fármaco para permitir la unión de las células. En el día del tratamiento con el fármaco, se decantó el medio y se substituyó con el fármaco, y estas células tratadas se colocaron de nuevo en el incubador a 37 grados C durante 1 hora. Se establecieron placas por triplicado para cada concentración de fármaco. Después del tratamiento con fármaco de 1 hora, el medio que contenía el fármaco se decantó y se substituyó con medio fresco. Estas placas se devolvieron al incubador a 37 grados C durante 1 semana para la formación de colonias. Las colonias se fijaron y se tiñeron mediante el uso de violeta cristal al 2% en metanol absoluto. Se puntuaron las colonias que contenían más de 50 células. Se calculó la media del número de colonias puntuadas de las placas por triplicado y este número se dividió por el número de células sembradas para obtener un valor de la fracción de células que formaron colonias. Estos valores de la fracción de células que formaron colonias se corrigieron después para obtener la eficacia de siembra dividiéndolos por el número de células que formaron colonias en las placas que no se trataron con el fármaco.

La Tabla 3 muestra la actividad antineoplásica de los complejos descritos en la presente memoria, expresada como los valores de CI50, en comparación con cisplatino y carboplatino. Como se puede observar a partir de los datos, dach-2 exhibe una mejor eficacia que cisplatino y carboplatino en las líneas de células resistentes. Además, dach-4 muestra una actividad muy superior a carboplatino. Los datos también demuestran que dach-4 es igual o más eficaz hacia las células cancerosas resistentes a cisplatino/carboplatino y las células sensibles a cisplatino, lo que indica además que los fosfaplatinós pueden no desarrollar resistencia.

A diferencia de cisplatino y carboplatino, se predice que los complejos de fosfato de la presente invención exhiben menos toxicidad debido a la presencia de ligandos fosfato que podrían ayudar a transportar de manera eficaz estos complejos a la célula. Además, a diferencia de cisplatino, estos complejos de fosfato no exhibieron una unión medible al ADN en 72 horas, tal como se muestra en la Figura 12. Se cree que cisplatino funciona mediante la unión al ADN genómico. Así, los complejos de fosfato de la presente invención tienen objetivos celulares diferentes.

Ejemplo 9

Se trató una línea de células ováricas resistentes a cisplatino (C30) (Hamaguchi, et al., 1993), obtenida del Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, PA), con los complejos de platino monoméricos de la presente invención (mostrados en la Figura 2). Esta línea celular tiene también resistencia cruzada a carboplatino. Las células se cultivaron en monocapa mediante el uso de RPMI 1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 0,25 unidades/mL de insulina y penicilina/estreptomicina en un incubador a 37 grados C gasificado continuamente con un 5% de CO₂. Las células se subcultivaron mediante el uso de un 0,025% de tripsina en HBSS para mantener las células en crecimiento exponencial.

Se determinaron los valores de CI50 mediante el uso de un ensayo clonogénico. Brevemente, se sembraron 500 células C30 de una suspensión de células individuales en placas Petri de 60 mm 24 horas antes del tratamiento con el fármaco para permitir la unión de las células. En el día del tratamiento con el fármaco, se decantó el medio y se substituyó con el fármaco, y estas células tratadas se colocaron de nuevo en el incubador a 37 grados C durante 1 hora. Se establecieron placas por triplicado para cada concentración de fármaco. Después del tratamiento con fármaco de una hora, el medio que contenía el fármaco se decantó y se substituyó con medio fresco. Estas placas se devolvieron al incubador a 37 grados C durante 1 semana para la formación de colonias. Las colonias se fijaron y se tiñeron mediante el uso de violeta cristal al 2% en metanol absoluto. Se puntuaron las colonias que contenían más de 50 células. Se calculó la media del número de colonias puntuadas de las placas por triplicado y este número se dividió por el número de células sembradas para obtener un valor de la fracción de células que formaron colonias. Estos valores de la fracción de células que formaron colonias se corrigieron después para obtener la eficacia de siembra dividiéndolos por el número de células que formaron colonias en las placas que no se trataron con el fármaco.

Ejemplo 10

Las líneas celulares UMSCC10b (sensible a cisplatino) y UMSCC10b/15s (resistente a Cisplatino) derivadas de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello humano se obtuvieron del Dr. Stephen B. Howell de la Universidad de California, San Diego. Las células se cultivaron en RPMI 1640 con un 10% de suero bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con aproximadamente 20.000 células/500 µl de medio en cada pocillo de las placas. Las células se expusieron a dach-2 con concentraciones variables que oscilaron desde 1,12 µM hasta un máximo de 72 µM. Se prepararon disoluciones

de reserva de complejo dach-2 y se añadieron alícuotas de estas disoluciones para hacer esas concentraciones efectivas. Las células se dejaron crecer después durante 72 horas. Se usaron veinte concentraciones diferentes en este estudio. Cada concentración tuvo un control para un total de 12 controles.

- 5 Se calcula que la CI50 para UMSCC10b (sensible a cisplatino) es menor de 1,0 μM . En comparación, el valor de CI50 para cisplatino es 17 μM en la misma línea (véase Zheng et al., Clinical Cancer Research, 1997, 3, 1157-1165). Se determinó que la CI50 para UMS.CC10b/15s (resistente a cisplatino) es 5 μM . La Figura 9 muestra la curva de supervivencia celular para las líneas de células sensibles a cisplatino y resistentes a cisplatino.

Ejemplo 11

- 10 Se llevaron a cabo experimentos de expresión génica preliminares que implicaban los complejos de la presente invención en comparación con cisplatino (datos no mostrados) con una matriz de genes apoptóticos que contenía 84 genes que incluían la superfamilia BCL2, tanto pro- y anti-apoptóticos, caspasas, la familia BIR, factores activadores de receptores de TNF, p53 y sus análogos, y miembros asociados a fas, mediante PCR en tiempo real. Un examen más detallado de los dos grupos de expresiones génicas indica claramente varias diferencias en los patrones de expresión. Por ejemplo, fas y los miembros de la superfamilia de genes fas se sobreexpresaron en las células tratadas con dach-2, mientras el cisplatino ejerció cambios insignificantes en la expresión de estos genes. De 15 manera específica, fas se sobreexpresó 6 veces en comparación con el control, y los genes TNFRS, tal como TNFRSF-10B, se sobreexpresaron 2-3 veces respecto de los controles. Estos últimos factores de receptores pertenecen a la superfamilia fas. Es interesante observar que los miembros de BCL2 proapoptóticos, tales como BAK1 y BAX, se sobreexpresaron alrededor de 2-3 veces mediante dach-2, mientras cisplatino no produjo cambios 20 significativos en su expresión.

Ejemplo 12: Acumulación celular de platino y estimación del platino unido al ADN

- El contenido de platino se estimó cuantitativamente en un espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (Perkin Elmer AA-600) a partir de curvas de calibración establecidas mediante el uso de cisplatino o pirodach-2 en agua. Se sembraron células (5×10^6) en matraces T75cm². Después de 24 h, estas células se trataron con las 25 diferentes concentraciones (0, 10, 20, 30 y 50 μM) de cisplatino y pirodach-2. Después de una exposición de 1 hr con los complejos de platino, se eliminó el medio que contenía fármaco y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) helada. Las células se tripsinizaron después y se centrifugaron hasta un sedimento. Los sedimentos celulares se digirieron en HNO₃ concentrado y H₂O₂ antes del análisis, según el método de McGahan. Los datos informados en la Tabla 4 se recogieron de tres experimentos independientes, y cada uno se 30 llevó a cabo por duplicado. Para la acumulación de cisplatino, los datos se obtuvieron de ensayos por triplicado de una única muestra a una concentración dada.

- Para las medidas de ADN-Pt, se sembraron $1,0 \times 10^7$ células en matraces T75cm². Después de 24 hr, los complejos de platino se añadieron a las diferentes concentraciones 0, 10, 20, 30 y 50 μM . Las células se trataron con los 35 complejos de platino durante 24 horas. Tras el tratamiento, se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS helado. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron hasta un sedimento. Se extrajo el ADN mediante el uso de un equipo de purificación de ADN Wizard[®] SV (Promega). El ADN se calculó cuantitativamente a partir de la absorción a 260 nm mediante el uso de un instrumento NanoDrop UV-Vis.

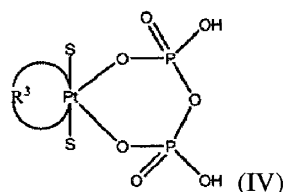
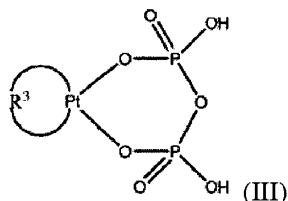
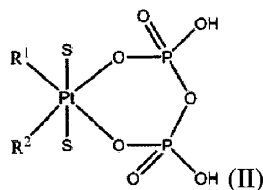
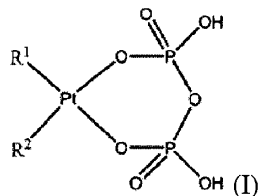
Ejemplo 13: Unión Platino-ADN mediante RMN

- Se llevaron a cabo experimentos de espectroscopía de RMN de protón en un instrumento de RMN de 500 MHz 40 Bruker en D₂O del 99% (atómico) con una secuencia de pulsos de supresión de agua. Las muestras contuvieron cisplatino (2,0 mM) o pirodach-2 (2,0 mM) y nucleótidos (5'-dGMP, 5'-dAMP, dGpG (5,0 mM)), y ADN monocatenario y bicatenario (timo de ternero, 5,0 mM) a pH 7,0 mantenido con tampones fosfato y carbonato (10-20 mM). Las reacciones de cisplatino (0,25 mM) y pirodach-2 (0,25 mM) con un 25-mero sintético: 5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3' (0,25 mM) se llevaron a cabo también en condiciones idénticas. Las 45 reacciones se llevaron a cabo hasta 7 días, y se registraron los espectros de ¹H y ³¹P RMN a intervalos de tiempo regulares. Normalmente, se usó un ancho de pulso de 5 μs con un retardo de repetición de 1,0 s para las medidas. En general, se seleccionó una anchura de barrido de 10.000 Hz y 32 K puntos de datos para recoger la caída libre de la inducción. Se aplicó un factor de ensanchamiento de línea de 1 Hz para la transformada de Fourier. Los desplazamientos químicos, con respecto al pico de H-O-D, son a 4,67 ppm.

50

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el uso en un método para tratar el cáncer que comprende:
uno o más complejos de platino (II) o (IV) monoméricos aislados según las fórmulas I, II, III y IV:



en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente de NH₃, y aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir;

en la que cada R³ se selecciona de aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir;

en la que cuando uno de R¹ y R² es NH₃, el otro de R¹ y R² no es NH₃; y

en la que cada S se selecciona independientemente de hidróxido, ácido acético, ácido butírico, y alfa-hidroxi ácidos; o

cis-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV) monomérico aislado;

o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1, en la que R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente de NH₃, metil amina, etil amina, propil amina, isopropil amina, butil amina, y ciclohexano amina.

3. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1, en la que R³ se selecciona de etilendiamina y ciclohexanodiamina.

4. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1, en la que el complejo de platino monomérico aislado es:

1,2-etanodiamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II), o

(*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II), o

cis-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), o

1,2-etanodiamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), o

(*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV).

5. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1, en la que el complejo de platino monomérico aislado es (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II).

6. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1, en la que el complejo de platino monomérico aislado es (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV).

7. Una composición para el uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 1 que comprende: uno o más complejos de platino monoméricos aislados seleccionados de

(i) *cis*-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV);

(ii) 1,2-Etanodiamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II);

(iii) 1,2-Etanodiamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV);

(iv) (*Trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II);

(v) *Trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV); y

(vi) sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 8. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 7, en la que el complejo de platino monomérico aislado es estable en disolución acuosa a un pH de alrededor de 6 a alrededor de 8.

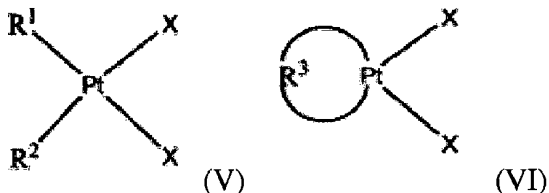
9. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 7, en la que el complejo de platino monomérico aislado no se une al ADN.

10 10. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 7, en la que el complejo de platino monomérico aislado desencadena la sobreexpresión de fas y factores de transcripción relacionados con fas, o de genes proapoptóticos.

11. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 10, en la que los genes proapoptóticos son Bak y Bax.

12. Un método para preparar un complejo de platino (II) monomérico aislado que comprende:

15 (i) mantener una mezcla de reacción acuosa que comprende pirofosfato en exceso y un complejo de platino según la fórmula V o VI:



en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente de NH₃, y aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir,

en la que R³ se selecciona de aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir; y

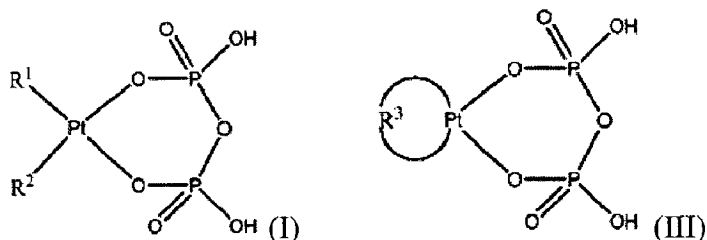
en la que X se selecciona independientemente de halógenos;

20 a una temperatura de alrededor de 30 a alrededor de 60 grados Celsius durante un periodo de alrededor de 12 a alrededor de 18 horas a un pH de alrededor de 7 a alrededor de 9;

(ii) concentrar posteriormente la mezcla de reacción acuosa de manera que no se formen precipitados de pirofosfatos;

(iii) bajar rápidamente el pH de la mezcla de reacción hasta un pH menor de 2 mediante la adición de un ácido;

25 en la que el complejo de platino (II) monomérico aislado tiene una fórmula de I o III:



en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente de NH₃, y aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir;

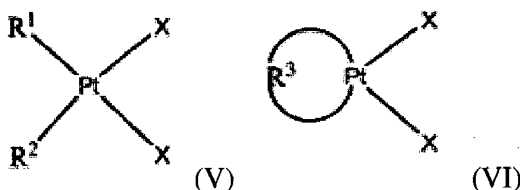
en la que R³ se selecciona de diaminas alifáticas sustituidas o sin sustituir; y

30 en la que el complejo de platino monomérico aislado es estable en disolución acuosa a un pH de alrededor de 6 a alrededor de 9.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el complejo de platino monomérico aislado preparado es (*Trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II).

14. Un método para preparar un complejo de platino (IV) monomérico aislado que comprende:

(i) mantener una mezcla de reacción acuosa que comprende pirofosfato en exceso y un complejo de platino según la fórmula V o VI:



en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente de NH₃, y aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir,

en la que R³ se selecciona de aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir, y

en la que X se selecciona independientemente de halógenos;

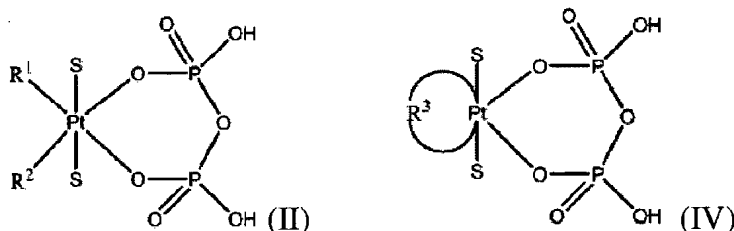
a una temperatura de alrededor de 30 a alrededor de 60 grados Celsius durante un periodo de alrededor de 12 a alrededor de 18 horas a un pH de alrededor de 7 a alrededor de 9;

(ii) añadir a la mezcla de reacción peróxido de hidrógeno, y opcionalmente un reactivo seleccionado del grupo de sales de acetato, sales de butirato, y sales de alfa-hidroxi ácidos, y las combinaciones de las mismas;

(iii) concentrar posteriormente la mezcla de reacción acuosa de manera que no se formen precipitados de pirofosfato;

(iv) bajar rápidamente el pH de la mezcla de reacción hasta un pH menor de 2 mediante la adición de ácido nítrico;

en la que el complejo de platino (IV) monomérico aislado tiene una fórmula de II o IV:



en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente de NH₃, y aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir;

en la que R³ se selecciona de aminas alifáticas sustituidas o sin sustituir;

en la que cada S se selecciona independientemente de hidróxido, ácido acético, ácido butírico, y alfa-hidroxi ácidos; y

en la que el complejo de platino monomérico aislado es estable en disolución acuosa a un pH de alrededor de 6 a alrededor de 9.

15. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 14, en el que la temperatura es 40 grados Celsius y el tiempo de reacción es 15 horas y el pH es de 7 a 8.

16. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 14, que comprende además enfriar la mezcla de reacción a una temperatura de entre 5 grados Celsius y la temperatura ambiente después de concentrar la mezcla de reacción, o después de bajar el pH de la mezcla de reacción.

17. El método de la reivindicación 14, en el que el reactivo opcional añadido junto con peróxido de hidrógeno antes de la concentración de la mezcla de reacción se selecciona de acetato sódico, butirato sódico, y sales sódicas de alfa-hidroxi ácidos, o de acetato potásico, butirato potásico, y sales potásicas de alfa-hidroxi ácidos.

18. El método de la reivindicación 14, en el que el peróxido de hidrógeno está a una concentración vol/vol inicial del 30%.

19. El método de la reivindicación 14, en el que el complejo de platino monomérico aislado preparado es:

cis-diamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), o

1,2-Etanodiamino-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV), o

Trans-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV).

- 5 20. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un complejo de platino monomérico aislado seleccionado de diamino(dihidrogenopirofosfato)platino(II) y los complejos de la reivindicación 1 y al menos un excipiente, diluyente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable, para el uso en un método para tratar un cáncer que es resistente a uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino.
21. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1 o la reivindicación 20, en el que el cáncer se selecciona de cáncer testicular, pulmonar de células pequeñas, y de cabeza y cuello.
- 10 22. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 1 o la reivindicación 20, en el que el cáncer es ovárico.
23. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que el complejo de platino monomérico aislado es como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 15 24. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 23, en la que el complejo de platino monomérico aislado es (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)(dihidrogenopirofosfato)platino(II).
25. La composición para el uso en un método para tratar el cáncer de la reivindicación 23, en la que el complejo de platino monomérico aislado es (*trans*-1,2-ciclohexanodiamino)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino(IV).

Figura 1

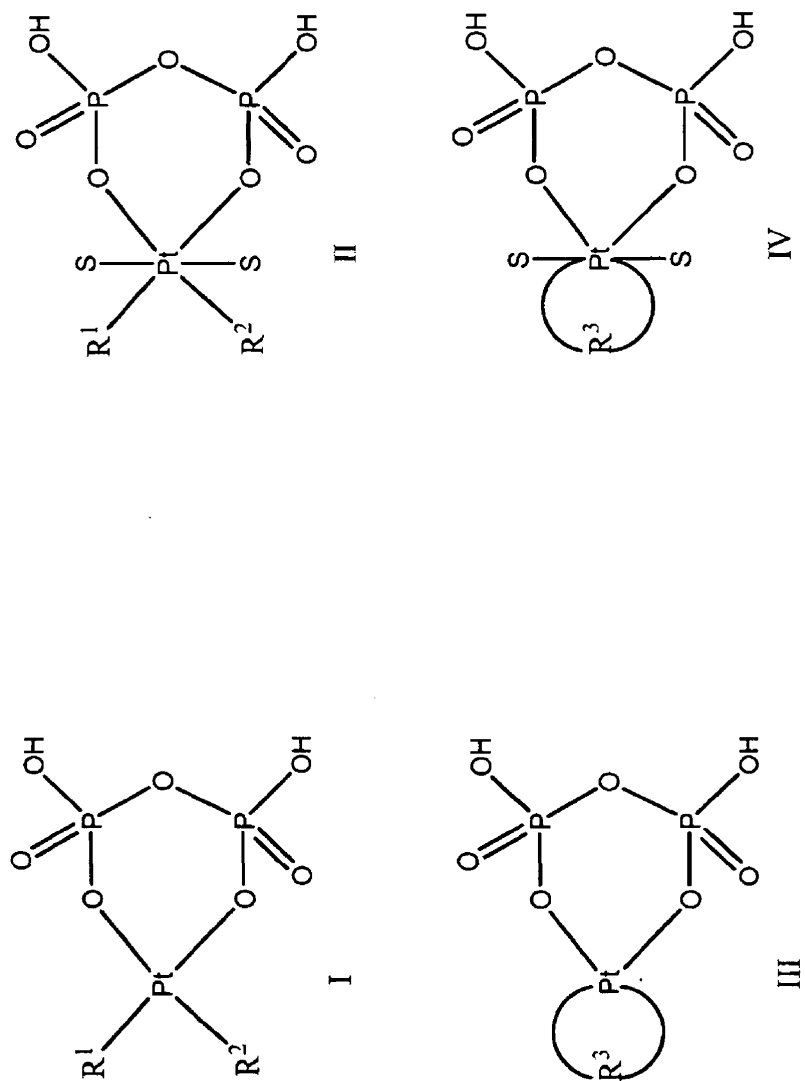


Figura 2

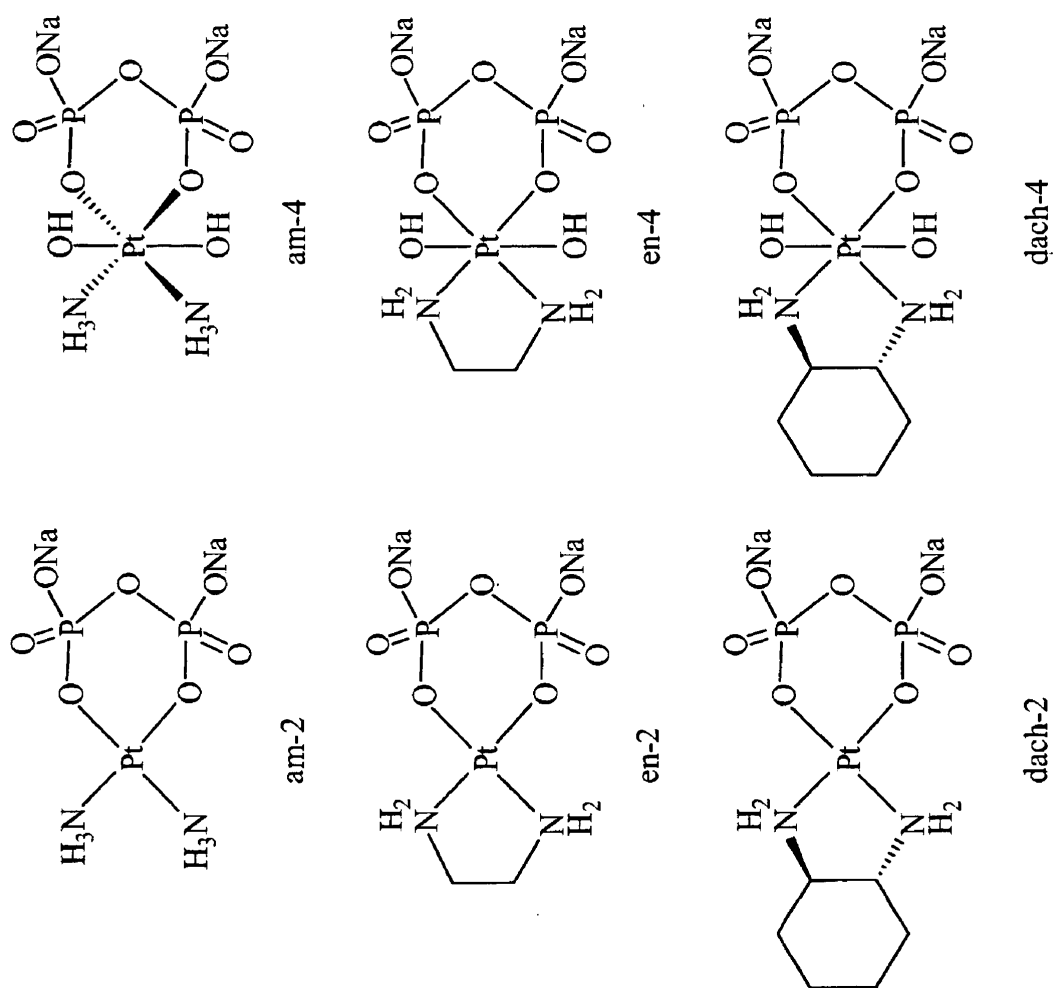


Figura 3

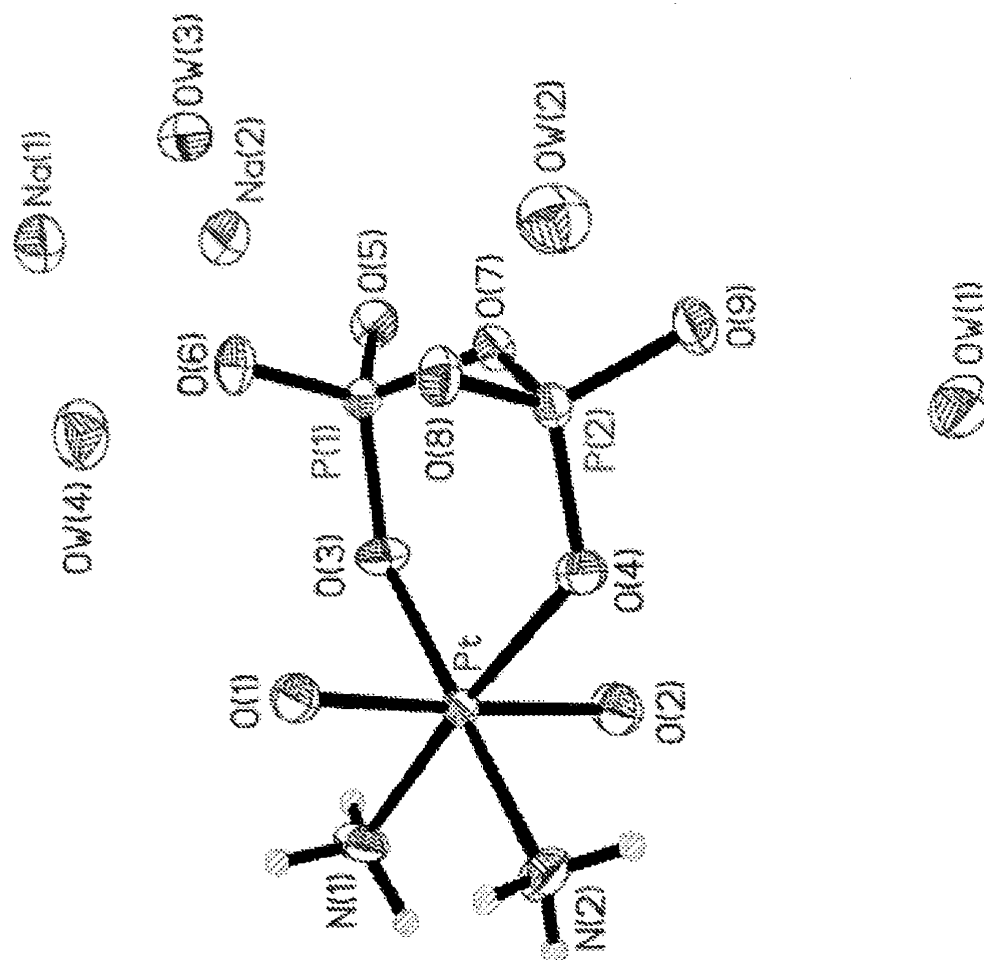


Figura 4

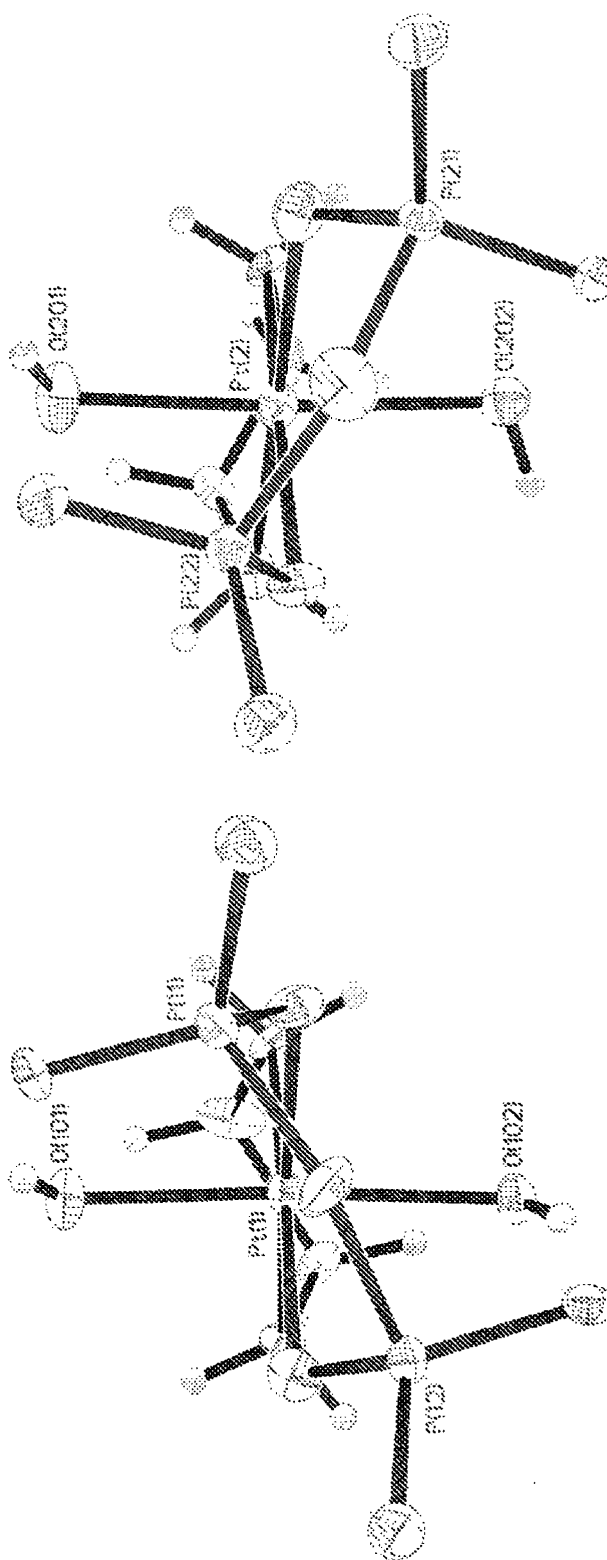


Figura 5

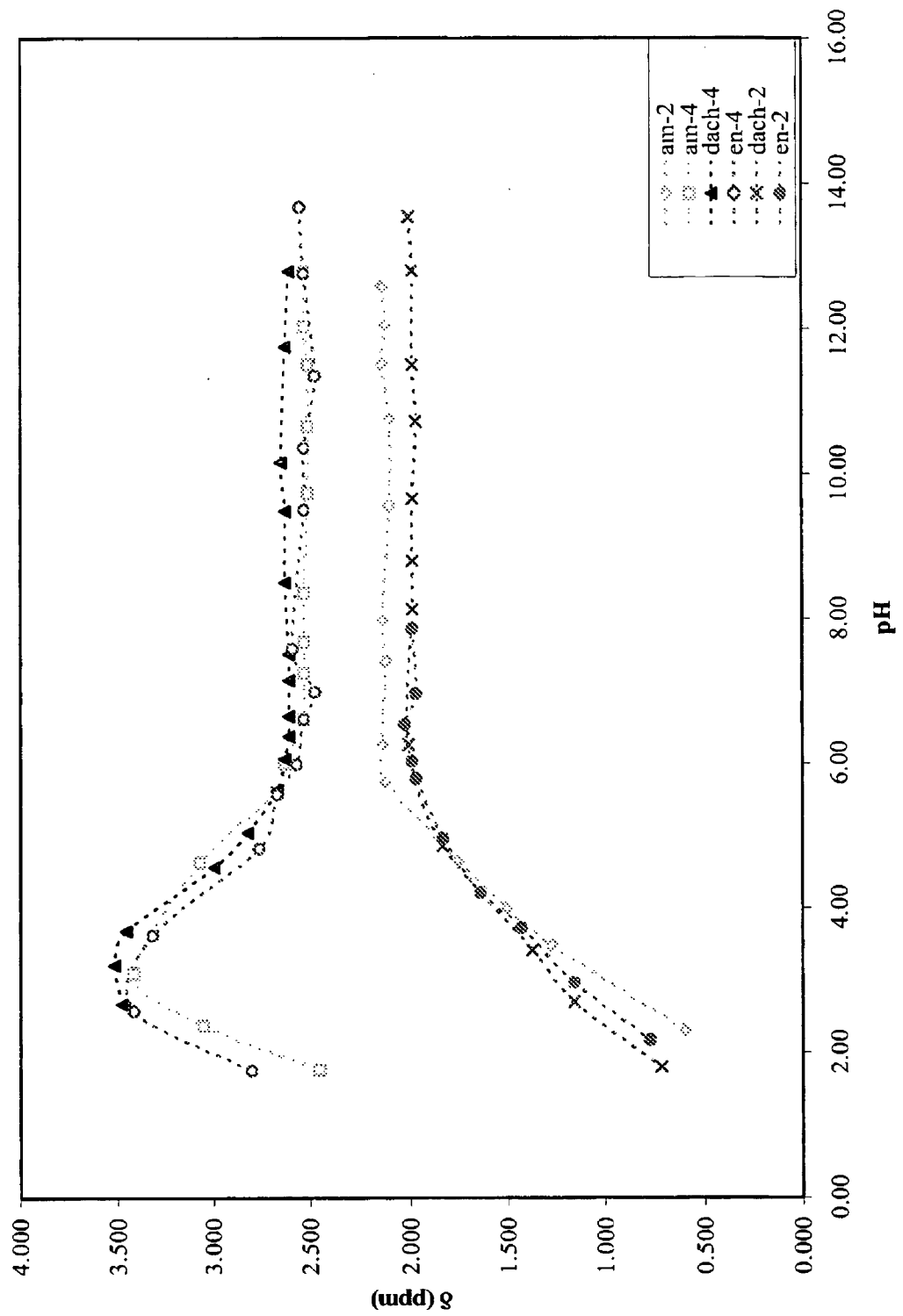
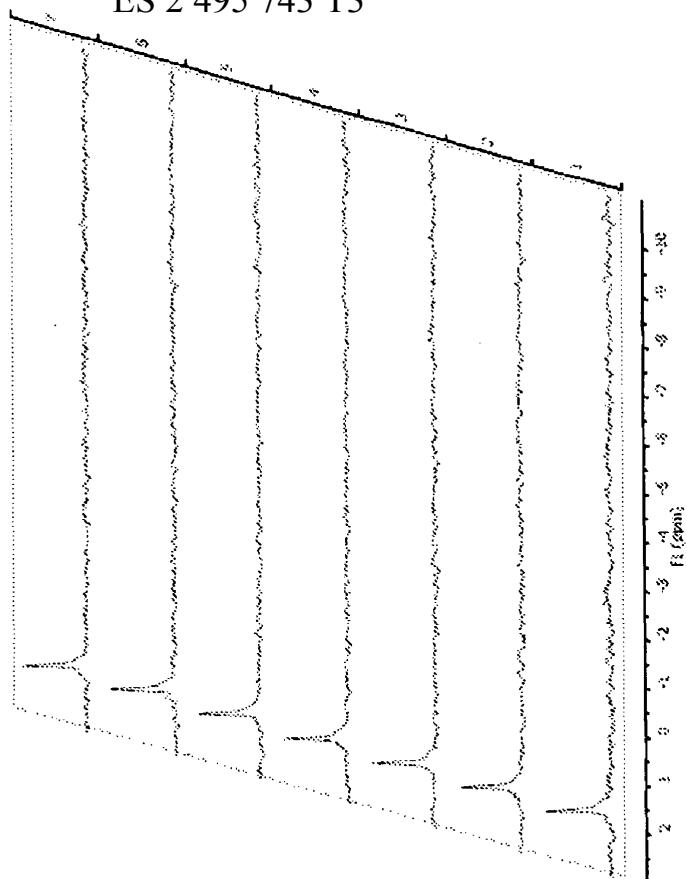


Figura 6

B



A

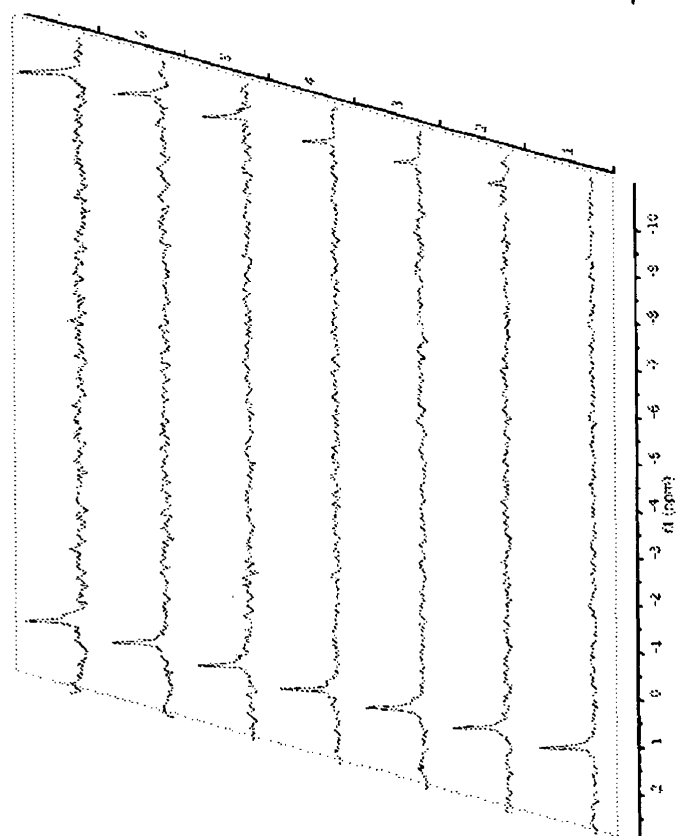


Figura 7

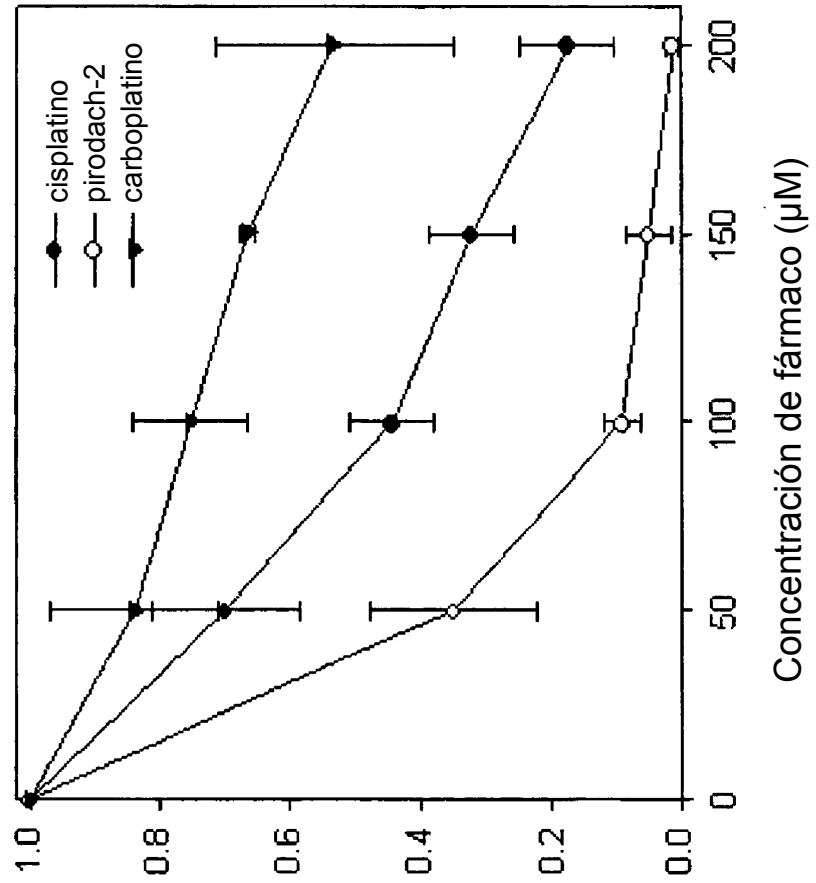
Células A2780/C30

Figura 8

Células A2780

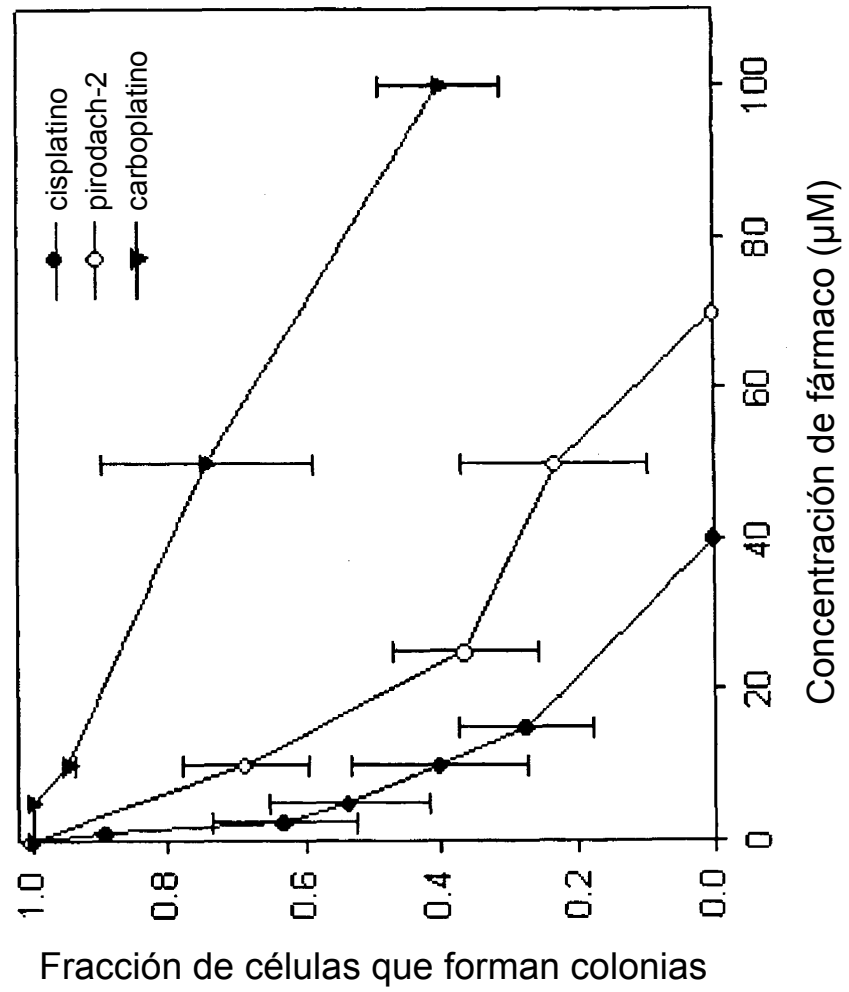
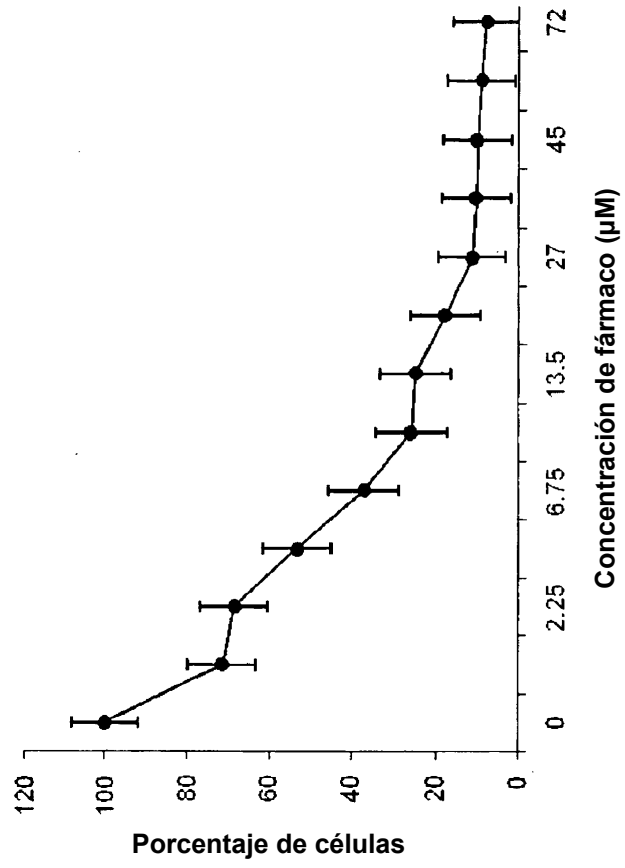


Figura 9

B



A

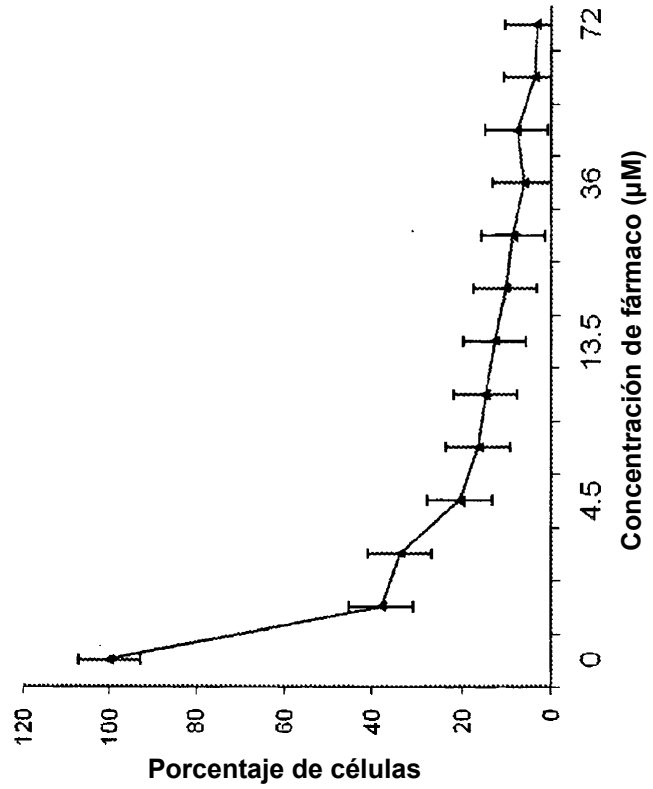


Figura 10

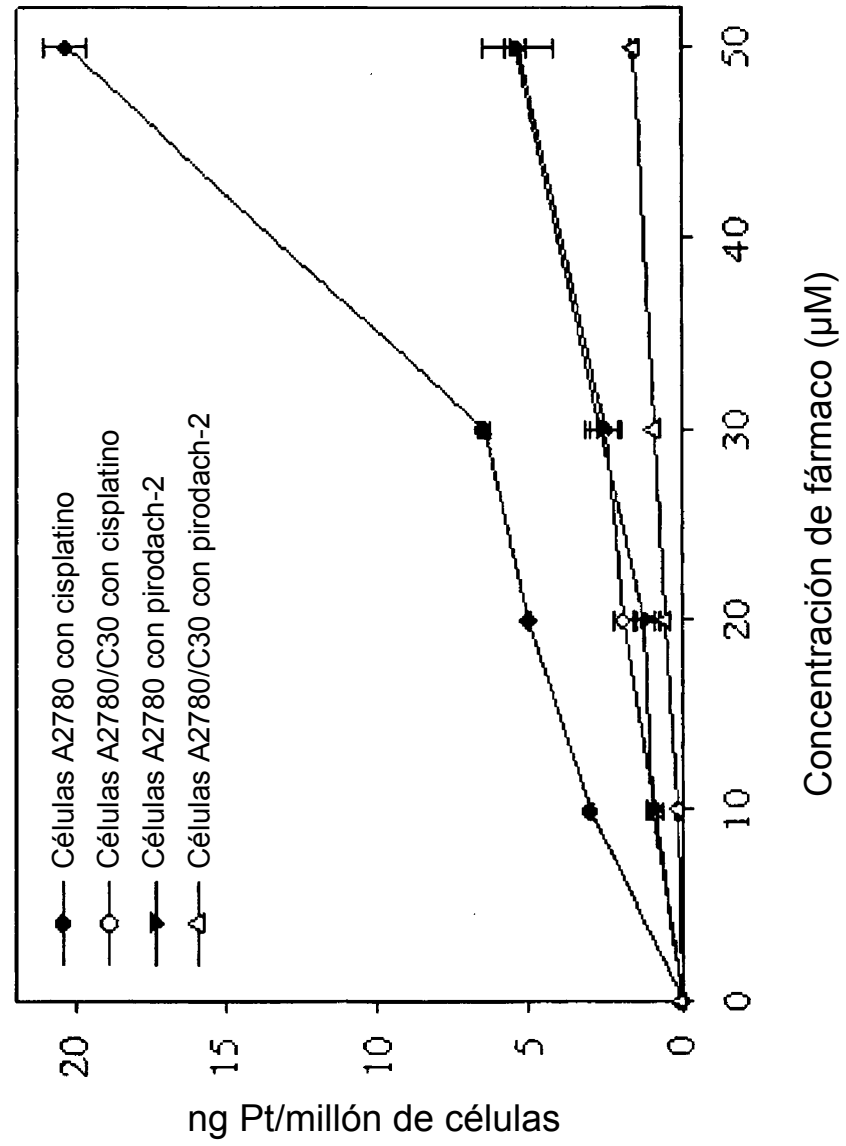
Acumulación celular de platino

Figura 11

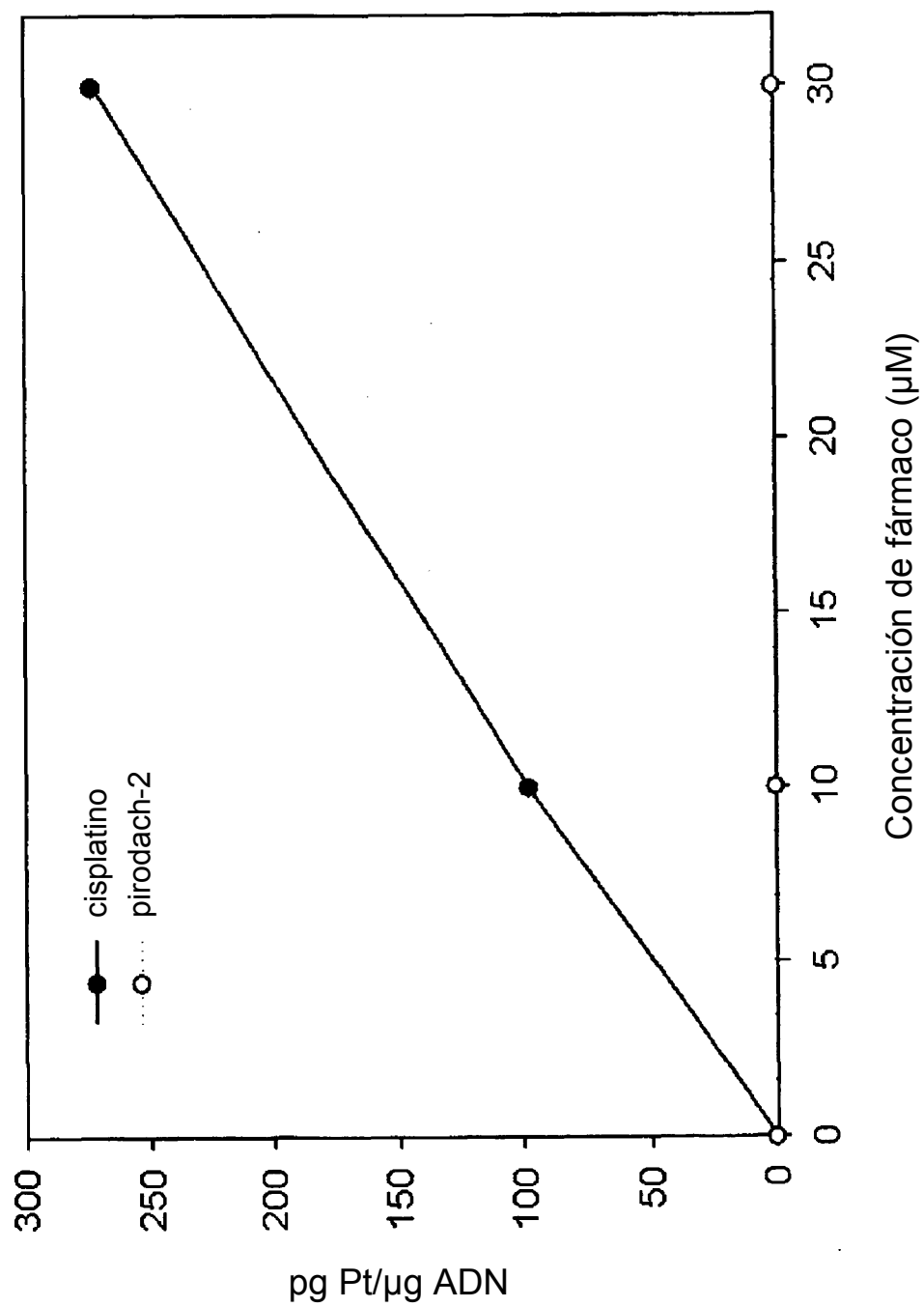


Figura 12

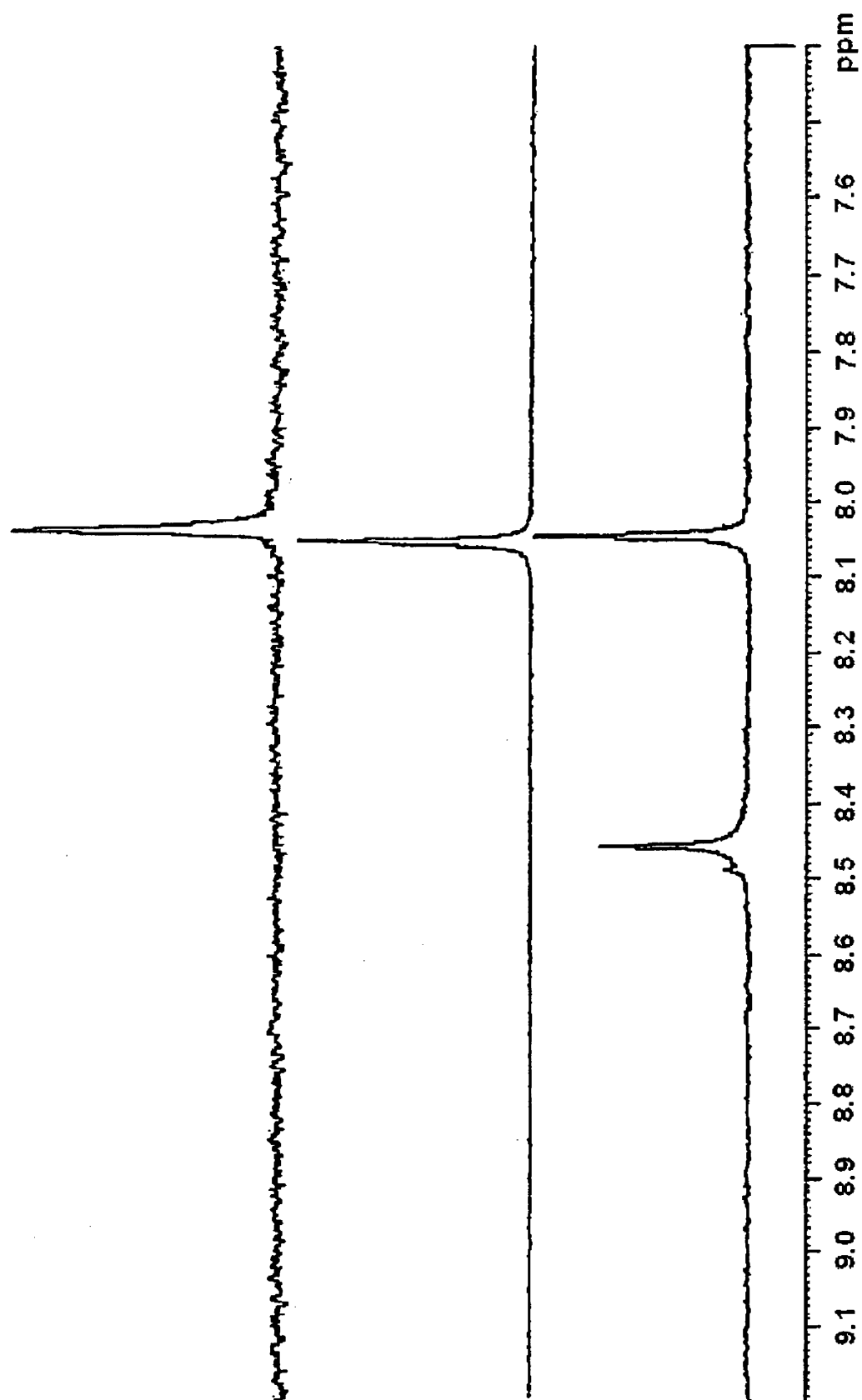


Figura 13

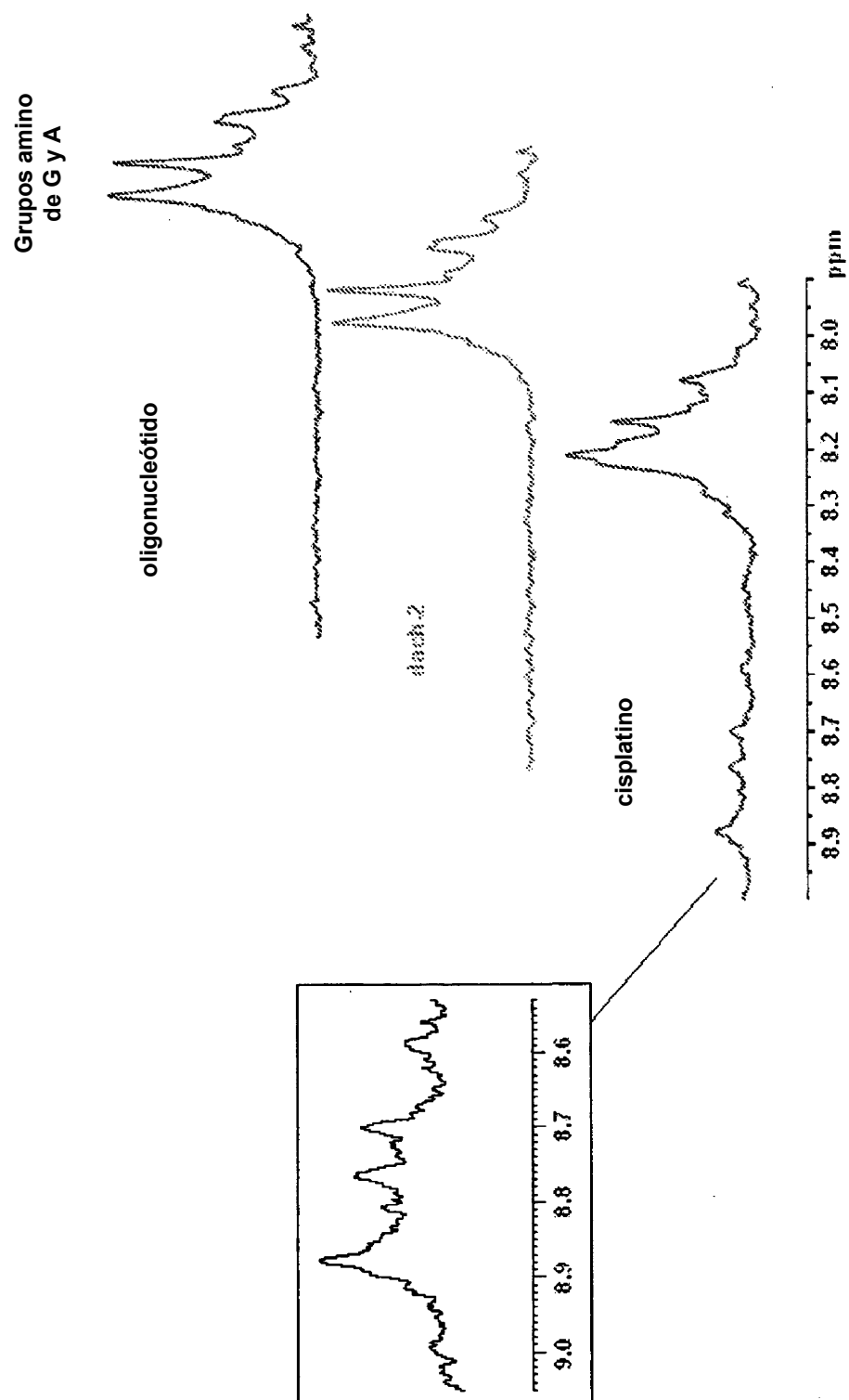
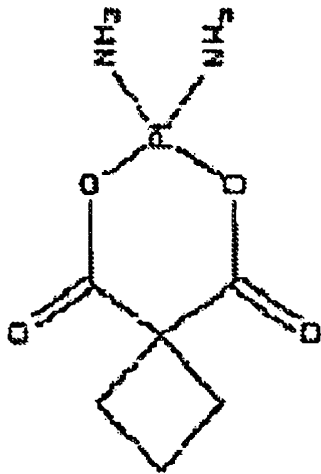
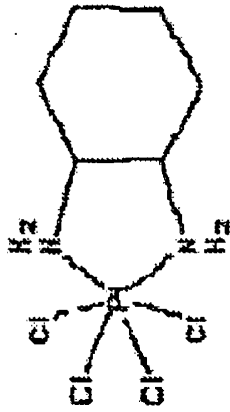


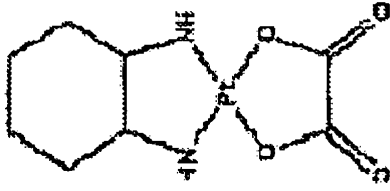
Figura 14



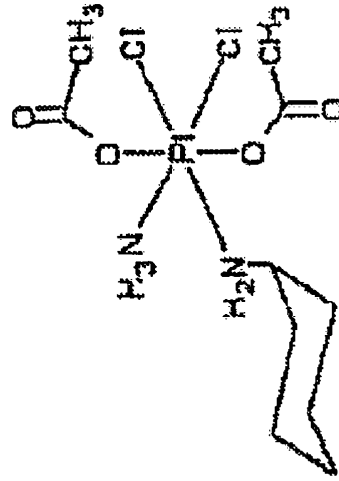
carboplatino



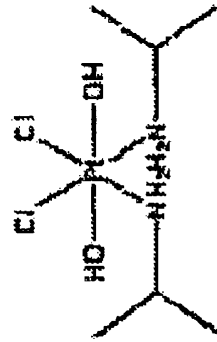
ormaplatino
tetraplatino



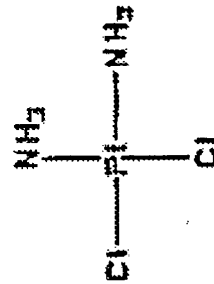
oxaliplatino



satraplatino
JM216

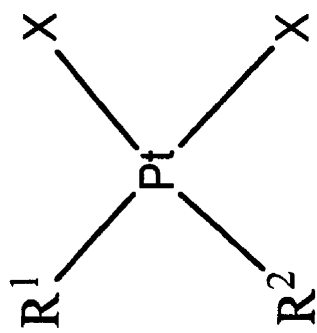


iproplatino
CHIP

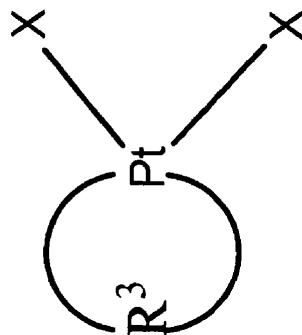


cisplatin
cis-DDP

Figura 15



V



VI