

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 591**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/00** (2006.01)

**A01N 65/00** (2009.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/6615** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2006 E 06738715 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 1863495**

54 Título: **Sal de calcio y de sodio de mio-inositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**18.03.2005 US 663491 P**

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

**30.03.2015**

73 Titular/es:

**NORMOXYS, INC. (100.0%)  
300 Market Street  
Boston, MA 02135 , US**

72 Inventor/es:

**NICOLAU, CLAUDE;  
LEHN, JEAN-MARIE;  
FYLAKTAKIDOU, KONSTANTINA, C. y  
GREFERATH, RUTH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 532 591 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

Sal de calcio y de sodio de mio-inositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato para el tratamiento del cáncer

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 USC 119(e) a la Solicitud Provisional US 60/663.491 presentada el 18 de marzo, 2005.

### 5 Campo de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones para usar la sal de calcio de inositol-tripirofosfato (ITPP-Ca) para aumentar la administración de oxígeno por la sangre roja. ITPP-Ca es un efector alostérico de la hemoglobina que tiene la capacidad de cruzar la membrana plasmática de los glóbulos rojos y disminuir la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina de los glóbulos rojos. La presente invención está dirigida además al uso de ITPP-Ca para inhibir la angiogénesis y aumentar la sensibilidad a la radiación de tumores hipóxicos. La presente invención está dirigida además al uso de ITPP-Ca para aumentar PO<sub>2</sub> en tumores hipóxicos.

### Antecedentes de la invención

En el sistema vascular de un ser humano adulto, la sangre tiene un volumen de aproximadamente 5 a 6 litros. Aproximadamente una mitad de este volumen está ocupada por células, incluyendo los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos), y plaquetas de la sangre. Los glóbulos rojos comprenden la mayoría de los componentes celulares de la sangre. El plasma, la parte líquida de la sangre, es aproximadamente 90 por ciento agua y 10 por ciento varios solutos. Estos solutos incluyen proteínas plasmáticas, metabolitos orgánicos y productos de desecho, y compuestos inorgánicos.

La función principal de los glóbulos rojos es transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos del cuerpo, y transportar dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones para su eliminación. Muy poco oxígeno es transportado por el plasma sanguíneo porque el oxígeno sólo es débilmente soluble en disoluciones acuosas. La mayor parte del oxígeno que lleva la sangre es transportado por la hemoglobina de los eritrocitos. Los eritrocitos en los mamíferos no contienen núcleo, mitocondria o cualesquiera otros orgánulos intracelulares, y no usan el oxígeno en su propio metabolismo. Los glóbulos rojos contienen aproximadamente 35 por ciento en peso de hemoglobina, que es responsable de unir y transportar el oxígeno.

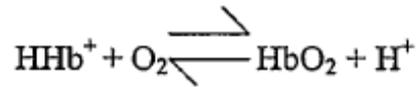
La hemoglobina es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 64.500 daltons. Contiene cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos prostéticos hemo a los que se unen los átomos de hierro en el estado ferroso. La globina normal, la parte proteica de la molécula de hemoglobina, consiste en dos cadenas alfa y dos cadenas beta. Cada una de las cuatro cadenas tiene una estructura terciaria característica en la que la cadena está plegada. Las cuatro cadenas polipeptídicas se ajustan conjuntamente en una organización aproximadamente tetraédrica, para constituir la estructura cuaternaria característica de la hemoglobina. Hay un grupo hemo unido a cada cadena polipeptídica que puede unir reversiblemente una molécula de oxígeno molecular. Cuando la hemoglobina se combina con oxígeno, se forma oxihemoglobina. Cuando el oxígeno se libera, la oxihemoglobina se reduce a desoxihemoglobina.

La administración de oxígeno a los tejidos, incluyendo tumores, depende de varios factores incluyendo, pero no limitado a, el volumen del flujo de sangre, el número de glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina en los glóbulos rojos, la afinidad por oxígeno de la hemoglobina y, en determinadas especies, la proporción molar de hemoglobinas intraeritrocíticas con alta y baja afinidad por el oxígeno. La afinidad por el oxígeno de la hemoglobina también depende de cuatro factores, concretamente: (1) la presión parcial de oxígeno; (2) el pH; (3) la concentración de 2,3-difosfoglicerato (DPG) en la hemoglobina; y (4) la concentración de dióxido de carbono. En los pulmones, a una presión parcial de oxígeno de 100 mm Hg, aproximadamente el 98% de la hemoglobina circulante está saturada con oxígeno. Esto representa la capacidad total de transporte de oxígeno de la sangre. Cuando está completamente oxigenada, 100 ml de sangre completa de mamífero puede transportar aproximadamente 21 ml de oxígeno gaseoso.

El efecto de la presión parcial de oxígeno y el pH en la capacidad de la hemoglobina para unirse al oxígeno se ilustra mejor por el examen de la curva de saturación de oxígeno de la hemoglobina. Una curva de saturación de oxígeno representa el porcentaje de sitios totales de unión a oxígeno de una molécula de hemoglobina que están ocupados por moléculas de oxígeno cuando las disoluciones de la molécula de hemoglobina están en equilibrio con diferentes presiones parciales de oxígeno en la fase de gas.

La curva de saturación de oxígeno para la hemoglobina es sigmoideal. Así, la unión de la primera molécula de oxígeno incrementa la afinidad de la hemoglobina restante para unir moléculas de oxígeno adicionales. Al incrementarse la presión parcial de oxígeno, se alcanza un plató en el que cada una de las moléculas de hemoglobina está saturada y contiene el límite superior de cuatro moléculas de oxígeno.

La unión reversible de oxígeno por la hemoglobina está acompañada por la liberación de protones, según la ecuación:



5 Así, un incremento en el pH empujará el equilibrio hacia la derecha y causa que la hemoglobina se una a más oxígeno a una presión parcial dada. Una disminución en el pH disminuirá la cantidad de oxígeno unida.

10 En los pulmones, la presión parcial de oxígeno en los espacios de aire es aproximadamente 90-100 mm Hg y el pH también es alto respecto al pH normal de la sangre (hasta 7,6). Por lo tanto, la hemoglobina tenderá a volverse casi máximamente saturada con oxígeno en los pulmones. A esa presión y pH, la hemoglobina está aproximadamente 98 por ciento saturada con oxígeno. Por otra parte, en los capilares en el interior de los tejidos periféricos, la presión parcial de oxígeno es sólo aproximadamente 25 a 40 mm Hg y el pH también es casi neutro (aproximadamente 7,2 a 7,3). Como las células musculares usan oxígeno en una proporción alta, disminuyendo de esta manera la concentración local de oxígeno, se favorece la liberación de parte del oxígeno unido al tejido. Al pasar la sangre a través de los capilares en los músculos, el oxígeno se liberará desde la hemoglobina casi saturada en los glóbulos rojos al plasma sanguíneo y después a las células musculares. La hemoglobina liberará aproximadamente un cuarto de su oxígeno unido al pasar a través de los capilares musculares, de manera que cuando deja el músculo, sólo estará aproximadamente 75 por ciento saturada. En general, la hemoglobina en la sangre venosa que deja el tejido varía entre aproximadamente 65 y 97 por ciento de saturación con oxígeno en sus circuitos repetidos entre los pulmones y los tejidos periféricos. Así, la presión parcial de oxígeno y el pH trabajan conjuntamente para conseguir la liberación de oxígeno por la hemoglobina.

20 Un tercer factor importante en la regulación del grado de oxigenación de la hemoglobina es el efecto alostérico 2,3-difosfoglicerato (DPG). DPG es el efector fisiológico normal de la hemoglobina en los eritrocitos de mamíferos. DPG regula la afinidad de unión al oxígeno de la hemoglobina en los glóbulos rojos en relación con la presión parcial de oxígeno en los pulmones. A mayor concentración de DPG en la célula, menor es la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

25 Cuando la administración de oxígeno a los tejidos se reduce crónicamente, la concentración de DPG en los eritrocitos es mayor que en individuos normales. Por ejemplo, a altas altitudes la presión parcial de oxígeno es significativamente menor. Correspondientemente, la presión parcial de oxígeno en los tejidos es menor. En unas pocas horas después de que un sujeto humano normal se mueve a una mayor altitud, el nivel de DPG en los glóbulos rojos se incrementa, causando que haya más DPG unido y que la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina disminuya. Los incrementos en el nivel de DPG de los glóbulos rojos también ocurren en pacientes que padecen hipoxia. Este ajuste permite que la hemoglobina libere su oxígeno unido más fácilmente en los tejidos para compensar la oxigenación disminuida de la hemoglobina en los pulmones. El cambio inverso ocurre cuando la gente está aclimatada a altas altitudes y desciende a altitudes menores.

30 Tal y como se aísla normalmente de la sangre, la hemoglobina contiene una cantidad considerable de DPG. Cuando la hemoglobina está "desprovista" de su DPG, muestra una afinidad mucho mayor por el oxígeno. Cuando el DPG se incrementa, la afinidad de unión para el oxígeno de la hemoglobina disminuye. Un efector alostérico fisiológico tal como DPG es por lo tanto esencial para la liberación normal de oxígeno de la hemoglobina en los tejidos.

35 Aunque DPG es el efector fisiológico normal de la hemoglobina en los glóbulos rojos de mamíferos, se encuentra que los inositoles fosforilados juegan el mismo papel en los eritrocitos de algunos pájaros y reptiles. Aunque el inositol hexafosfato (IHP) es incapaz de pasar a través de la membrana de los eritrocitos de mamíferos, es capaz de combinarse con la hemoglobina de los glóbulos rojos de mamíferos en el sitio de unión de DPG para modificar la conformación alostérica de la hemoglobina, cuyo efecto es reducir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Por ejemplo, DPG puede reemplazarse por IHP, que es mucho más potente que DPG en la reducción de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina. IHP tiene una afinidad 1.000 veces mayor para la hemoglobina que DPG (R.E. Benesch et al., *Biochemistry*, Vol. 16, páginas 2594-2597 (1977)) e incrementa la P<sub>50</sub> de la hemoglobina hasta valores de 96,4 mm Hg a pH 7,4 y 37 grados C (*J. Biol. Chem.*, Vol. 250, páginas 7093-7098 (1975)).

40 La capacidad de liberar oxígeno de los glóbulos rojos de mamíferos puede aumentarse introduciendo determinados efectores alostéricos de la hemoglobina en los eritrocitos, disminuyendo de esta manera la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y mejorando la economía del oxígeno de la sangre. Este fenómeno sugiere varias aplicaciones médicas para el tratamiento de individuos que están experimentando una oxigenación disminuida de sus tejidos debido a la función inadecuada de sus pulmones o sistema circulatorio.

45 Debido a los beneficios médicos potenciales que se pueden conseguir a partir del uso de estos eritrocitos modificados, se han desarrollado varias técnicas en la técnica anterior para permitir la encapsulación de efectores alostéricos de la hemoglobina en eritrocitos. De acuerdo con esto, se han diseñado numerosos dispositivos para asistir o simplificar el procedimiento de encapsulación. Los métodos de encapsulación conocidos en la técnica incluyen púso osmótico (hinchamiento) y reconstitución de células, lisis controlada y resellado, incorporación de

liposomas, y electroporación. Los métodos actuales de electroporación hacen que el procedimiento sea comercialmente irrealizable en una escala adecuada para uso comercial.

Las referencias siguientes describen la incorporación de polifosfatos en glóbulos rojos por la interacción de liposomas cargados con IHP: Gersonde, et al., "Modification of the Oxygen Affinity of Intracellular Hemoglobin by Incorporation of Polyphosphates into Intact Red Blood Cells and Enhanced O<sub>2</sub> Release in the Capillary System", *Bibliothca. Haemat.*, No. 46, p. 81-92 (1980); Gersonde, et al., "Enhancement of the O<sub>2</sub> Release Capacity and of the Bohr-Effect of Human Red Blood Cells after Incorporation of Inositol Hexaphosphate by Fusion with Effector-Containing Lipid Vesicles", *Origins of Cooperative Binding of Hemoglobin* (1982); y Weiner, "Right Shifting of Hb-O<sub>2</sub> Dissociation in Viable Red Cells by Liposomal Technique", *Biology of the Cell*, Vol. 47, (1983).

Además, las Pat. U.S. Nos. 4.192.869, 4.321.259 y 4.473.563 de Nicolau et al. describen un método mediante el cual vesículas lipídicas cargadas con fluido se fusionan con membranas de eritrocitos, depositando sus contenidos en los glóbulos rojos. De esta manera, es posible transportar efectores alostéricos, tales como IHP en eritrocitos, donde debido a su constante de unión mucho mayor, IHP reemplaza a DPG en su sitio de unión en la hemoglobina.

Según la técnica de liposomas, IHP se disuelve en un tampón fosfato hasta que la disolución está saturada y se suspende una mezcla de vesículas lipídicas en la disolución. La suspensión se somete a tratamiento ultrasónico o un proceso de inyección, y se centrifuga. La suspensión superior contiene vesículas lipídicas pequeñas que contienen IHP, que se recogen. Los eritrocitos se añaden a la suspensión recogida y se incuban, tiempo durante el cual las vesículas lipídicas que contienen IHP se fusionan con las membranas celulares de los eritrocitos, depositando de esta manera sus contenidos en el interior de los eritrocitos. Los eritrocitos modificados se lavan y se añaden a plasma para completar el producto.

Los inconvenientes asociados con la técnica de liposomas incluyen una baja reproducibilidad de las concentraciones de IHP incorporadas en los glóbulos rojos y hemólisis significativa de los glóbulos rojos después del tratamiento. Además, la comercialización no es práctica porque el procedimiento es tedioso y complicado.

En un intento de resolver los inconvenientes asociados con la técnica de liposomas, se desarrolló un método de lisis y resellado de glóbulos rojos. Este método se describe en la publicación siguiente: Nicolau, et al., "Incorporation of Allosteric Effectors of Hemoglobin in Red Blood Cells. Physiologic Effects", *Bibliothca. Haemat.*, No. 51, p. 92-107, (1985). Las Pat. U.S. relacionadas Nos. 4.752.586 y 4.652.449 de Ropars et al. también describen un procedimiento para encapsular sustancias que tienen actividad biológica en eritrocitos humanos o animales por la lisis controlada y resellado de los eritrocitos, lo que evita las interacciones glóbulos rojos-liposoma.

La técnica se caracteriza mejor como un sistema de diálisis de flujo continuo, que funciona de una manera similar a la técnica de pulso osmótico. Específicamente, se suministra continuamente al compartimento primario de al menos un elemento de diálisis con una suspensión acuosa de eritrocitos, mientras el compartimento secundario del elemento de diálisis contiene una disolución acuosa que es hipotónica respecto a la suspensión de eritrocitos. La disolución hipotónica produce la lisis de los eritrocitos. El lisado de eritrocitos se pone en contacto con la sustancia biológicamente activa que se va a incorporar en el eritrocito. Para resellar las membranas de los eritrocitos, se incrementa la presión osmótica y/o oncótica del lisado de eritrocitos y se recupera la suspensión de eritrocitos resellados.

En las Pat. U.S. relacionadas Nos. 4.874.690 y 5.043.261 de Goodrich et al., se describe una técnica relacionada que implica la liofilización y reconstitución de glóbulos rojos, Como parte del proceso de reconstitución de los glóbulos rojos, se describe la adición de varios polianiones, incluyendo IHP. El tratamiento de los glóbulos rojos según el proceso descrito resulta en una célula con una actividad inalterada. Presumiblemente, el IHP se incorpora en la célula durante el proceso de reconstitución, manteniendo de esta manera la actividad de la hemoglobina.

En las Pat. U.S. Nos. 4.478.824 y 4.931.276 de Franco et al., se describe un segundo método y aparato relacionado para introducir eficazmente agentes no iónicos, incluyendo IHP, en glóbulos rojos de mamíferos mediante la lisis y resellado eficaz de las células. El procedimiento se describe como la "técnica de pulso osmótico". En la práctica de la técnica de pulso osmótico, un suministro de glóbulos rojos empaquetados se suspende y se incuba en una disolución que contiene un compuesto que difunde fácilmente en y fuera de las células, siendo la concentración del compuesto suficiente para causar la difusión de éste en las células de manera que los contenidos de las células se vuelven hipertónicos. A continuación, se crea un gradiente iónico trans-membrana diluyendo la disolución que contiene las células hipertónicas con un medio acuoso esencialmente isotónico en presencia de al menos un agente deseado que se va a introducir, causando de esta manera la difusión de agua en las células con un hinchamiento consecuente y un incremento en la permeabilidad de las membranas exteriores de las células. Este "pulso osmótico" causa la difusión de agua en las células y un hinchamiento resultante de las células que incrementa la permeabilidad de la membrana celular exterior al agente deseado. El incremento en la permeabilidad de la membrana se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente sólo para permitir el transporte del al menos un agente en las células y la difusión del compuesto fuera de las células.

Los polianiones que pueden usarse en la práctica de la técnica de pulso osmótico incluyen pirofosfato, tripilfosfato, inositoles fosforilados, 2,3-difosfoglicerato (DPG), adenosina trifosfato, heparina, y ácidos policarboxílicos que son solubles en agua, y no alteran las membranas de bicapa lipídica exterior de los glóbulos rojos.

La técnica de pulso osmótico tiene varias limitaciones incluyendo bajo rendimiento de encapsulación, resellado incompleto, pérdida de contenido celular y una disminución correspondiente de la duración de la vida de las células. La técnica es tediosa, complicada e inadecuada para automatización. Por estas razones, la técnica de pulso osmótico ha tenido poco éxito comercial.

5 Otro método para encapsular varias sustancias biológicamente activas en eritrocitos es la electroporación. La electroporación se ha usado para la encapsulación de moléculas extrañas en diferentes tipos celulares, incluyendo IHP en glóbulos rojos, como se describe en Mouneimne, et al., "Stable rightward shifts of the oxyhemoglobin dissociation curve induced by encapsulation of inositol hexaphosphate in red blood cells using electroporation", FEBS, Vol. 275, No. 1, 2, pp. 117-120 (1990). Véase, también la Patente U.S. No. 5.612.207.

10 La angiogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido u órgano y está relacionada con la tensión de oxígeno en los tejidos. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos y los animales experimentan angiogénesis sólo en situaciones específicas, restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la cicatrización de heridas, desarrollo fetal y embrionario, y formación del cuerpo lúteo, endometrio y placenta.

15 La angiogénesis está controlada a través de un sistema altamente regulado de estimuladores e inhibidores angiogénicos. El control de la angiogénesis está alterado en determinados estados patológicos y, en muchos casos, el daño patológico asociado con las enfermedades está relacionado con una angiogénesis incontrolada. Se piensa que tanto la angiogénesis controlada como incontrolada proceden de una manera similar. Las células endoteliales y pericitos, rodeados por una membrana basal, forman los vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis empieza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por las células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que recubren el lumen de los vasos sanguíneos, sobresalen a través de la membrana basal. Los estimuladores angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células que migran forman un "brote" fuera del vaso sanguíneo parental en el que las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan entre sí para formar bucles capilares, creando un nuevo vaso sanguíneo.

La angiogénesis persistente, desregulada, ocurre en muchos estados patológicos, metástasis tumorales, y crecimiento anormal por células endoteliales. Los diversos estados patológicos en los que está presente una angiogénesis desregulada se han agrupado conjuntamente como enfermedades dependientes de angiogénesis o asociadas con angiogénesis.

30 La hipótesis de que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis se propuso en primer lugar en 1971. (Folkman, *New Eng. J. Med.*, 285: 1182-86 (1971)). En sus términos más simples, esta hipótesis afirma: "Una vez ha ocurrido la "captación" ("take") del tumor, cada incremento en la población de células tumorales debe estar precedido de un incremento en nuevos capilares que convergen en el tumor". La "captación" del tumor se entiende actualmente para indicar una fase prevascular de crecimiento tumoral en la que una población de células tumorales que ocupa unos pocos milímetros cúbicos de volumen, y que no superan unos pocos millones de células, pueden sobrevivir en los microvasos existentes del huésped. La expansión del volumen tumoral más allá de esta fase requiere la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares. Por ejemplo, las micrometástasis pulmonares en la fase prevascular temprana en los ratones serían indetectables excepto por un microscopio de alta resolución en secciones histológicas.

40 La angiogénesis se ha asociado con varios tipos diferentes de cáncer, incluyendo tumores sólidos y tumores transportados por la sangre. Los tumores sólidos con los que se ha asociado la angiogénesis incluyen, pero no están limitados a, rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y osteosarcoma. La angiogénesis también está asociada con tumores transportados por la sangre, tales como leucemias, cualquiera de las distintas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que ocurre la proliferación no restringida de glóbulos blancos, habitualmente acompañado de anemia, coagulación alterada de la sangre, y agrandamiento de los ganglios linfáticos, hígado y bazo. Se cree que la angiogénesis juega un papel en las anomalías de la médula ósea que dan lugar a tumores leucémicos y enfermedades de mieloma múltiple.

50 Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la infancia es el hemangioma. Un hemangioma es un tumor compuesto por vasos sanguíneos formados de nuevas. En la mayor parte de los casos, los tumores son benignos y revierten sin intervención. En los casos más graves, los tumores progresan a formas cavernosas grandes e infiltrantes y crean complicaciones clínicas. Las formas sistémicas de hemangiomas, hemangiomatosis, tienen una alta proporción de mortalidad. Existen hemangiomas resistentes a terapia que no pueden tratarse con los agentes terapéuticos usados actualmente.

55 Otra enfermedad asociada con angiogénesis es la artritis reumatoide. Los vasos sanguíneos en el recubrimiento sinovial de las articulaciones experimentan angiogénesis. Además de la formación de nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies de oxígeno reactivo que dan lugar al crecimiento pannus y destrucción del cartílago. La angiogénesis también puede jugar un papel en la osteoartritis. La activación de los condrocitos por factores relacionados con la angiogénesis contribuye a la destrucción de la articulación. En un estadio tardío, los factores angiogénicos estimulan nuevo crecimiento de hueso. La intervención terapéutica que

previene la destrucción del cartílago podría parar el progreso de la enfermedad y proporcionar alivio para las personas que padecen artritis.

La inflamación crónica también puede implicar angiogénesis patológica. Enfermedades tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn muestran cambios histológicos con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en América del Sur, puede resultar en un estadio crónico que se caracteriza por la proliferación de células endoteliales vasculares. Otro papel patológico asociado con la angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Se ha mostrado que las placas formadas en el lumen de los vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora de la angiogénesis.

Como se ha mencionado anteriormente, varias líneas de evidencia indican que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y persistencia de tumores sólidos y sus metástasis. Una vez se estimula la angiogénesis, los tumores regulan al alza la producción de una variedad de factores angiogénicos, incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos (aFGF y bFGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular/factor permeabilidad vascular (VEGF/VPF) [2,3].

El papel de VEGF en la regulación de la angiogénesis ha sido objeto de investigación intensa [5-10]. Mientras VEGF representa una etapa crítica, limitante de la velocidad en la angiogénesis fisiológica, parece que también es importante en la angiogénesis patológica, tal como la asociada con el crecimiento tumoral [H]. También se sabe que VEGF es un factor de permeabilidad vascular, tomando como base su capacidad de inducir extravasación vascular [13]. Varios tumores sólidos producen grandes cantidades de VEGF, que estimula la proliferación y migración de células endoteliales, induciendo de esta manera la neovascularización [12,13]. Se ha mostrado que la expresión de VEGF afecta significativamente la prognosis de diferentes clases de cáncer humano. La tensión de oxígeno en el tumor tiene un papel clave en la regulación de la expresión del gen de VEGF. La expresión del ARNm de VEGF se induce por exposición a baja tensión de oxígeno bajo una variedad de circunstancias patofisiológicas [13]. Los tumores en crecimiento se caracterizan por hipoxia, que induce la expresión de VEGF y también puede ser un factor predictivo de la aparición de enfermedad metastásica.

Lo que se necesita, por lo tanto, es una composición sustancialmente no tóxica que pueda regular la tensión de oxígeno en el tejido, especialmente un tumor. Además, lo que se necesita es una composición simple y que se administre fácilmente, preferiblemente oralmente, que sea capaz de causar desplazamientos hacia la derecha significativos del valor  $P_{50}$  para los glóbulos rojos.

### Resumen de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la mezcla de la sal de sodio y de calcio de mio-inositol tripirofosfato y un adyuvante, diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento del cáncer.

Los cánceres que pueden tratarse por la presente invención incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de esófago, melanoma cutáneo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer testicular, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, linfoma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer rectal, cáncer del intestino delgado, cáncer de tiroides, cáncer uterino, linfoma de Hodgkin, cáncer de labios y oral, cáncer de piel, leucemia o mieloma múltiple.

Éstos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes después de una revisión de la descripción detallada siguiente de las realizaciones descritas.

### Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 representa la estructura química de la sal de calcio de inositol tripirofosfato (ITPP).

La Figura 2 muestra el curso de tiempo del desplazamiento hacia la derecha inducido de la curva de disociación  $O_2$ -hemoglobina (ODC) en los ratones que ingieren ITPP durante 4 días, así como la ausencia de desplazamientos significativos de  $P_{50}$  en los animales control.

La Figura 3 muestra que el nivel de iones, tales como sodio y potasio y calcio, eran normales después de la aplicación oral de ITPP en ratones.

La Figura 4 muestra la relación de desplazamiento de  $P_{50}$  [%] respecto al número de eritrocitos/ $mm^3$  en ratones que han recibido ITPP.

La Figura 5 demuestra la tolerancia de ITPP por los ratones, hasta una concentración de 150 mM. El nivel de iones, tales como sodio, potasio y calcio eran normales después de inyección intraperitoneal (ip).

La Figura 6 muestra un gel de agarosa que indica las concentraciones de ARNm de VEGF en tumores de animales control y que habían bebido ITPP.

La Figura 7 muestra el ensayo de transferencia Western del VEGF expresado en tumores de animales que portan tumor de carcinoma Pulmonar de Lewis (LLC) control y tratados con ITPP.

### Descripción detallada de la invención

5 La composición farmacéutica de esta invención también puede contener, o ser co-administrada (simultáneamente o secuencialmente) con, uno o más agentes farmacológicos valiosos en el tratamiento del cáncer.

Un experto en la técnica será capaz por referencia a textos estándar, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences 17<sup>a</sup> edición, de determinar cómo deben prepararse las formulaciones y cómo deben administrarse.

10 Por "una cantidad eficaz" tal y como se refiere en esta especificación, se quiere decir una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Dichas cantidades pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica apropiada, teniendo en cuenta la afección que se va a tratar, la ruta de administración y otros factores relevantes. Dicho experto será capaz fácilmente de determinar una dosis adecuada, modo y frecuencia de administración. "Individuo" tal y como se refiere en esta solicitud se refiere a cualquier animal que puede necesitar tratamiento para una afección dada. "Individuo" incluye seres humanos, otros primates, mascotas domésticas, ganado, roedores, otros mamíferos, y cualesquiera otros animales que pueden ser tratados típicamente por un veterinario.

15 Las composiciones descritas anteriormente pueden proporcionarse como formulaciones fisiológicamente aceptables usando técnicas conocidas, y estas formulaciones pueden administrarse por rutas estándar. En general, las combinaciones pueden administrarse por la ruta tópica, oral, rectal, intraperitoneal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, las combinaciones pueden incorporarse en polímeros que permiten una liberación sostenida, implantándose los polímeros en la cercanía del sitio donde se desea la  
20 administración, por ejemplo, en el sitio de un tumor, o en una cavidad o vaso sanguíneo que dará lugar a la administración fácil en el lugar que se va a tratar. La dosificación de la composición dependerá de la afección que se va a tratar, del derivado particular usado, y de otros factores clínicos tales como peso y condición del paciente y la ruta de administración del compuesto. Sin embargo, para la administración oral, una dosificación recomendada está en el intervalo de 0,1 a 5,0 g/kg/día. Una dosificación para administración oral está en el intervalo de 0,5 a 2,0  
25 g/kg/día o alternativamente, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 g/kg/día. En una realización alternativa, una dosificación para administración oral está en el intervalo de aproximadamente 0,80 a 1,0 g/kg/día o alternativamente, aproximadamente entre 0,9 a 1,1 g/kg/día.

30 Las formulaciones según la presente invención pueden administrarse en la forma de comprimido, una cápsula, una píldora, un sello, una disolución, una suspensión, una emulsión, un polvo, un aerosol, un supositorio, un pulverizador, una pastilla, una pomada, una crema, una pasta, una espuma, un gel, un tampón, un pesario, un gránulo, un bolo, un lavado bucal o un parche transdérmico.

35 Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, inhalación, tópica (incluyendo dérmica, transdérmica, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intraocular, intratraqueal, y epidural) o inhalación. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo y un o unos vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando uniformemente e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, dando forma al producto.

40 Las formulaciones de presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida aceite en agua o una emulsión agua en aceite, etc.

45 Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos comprimidos pueden prepararse por compresión, en una máquina adecuada, del ingrediente activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con una aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente activo en superficie o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse por moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse opcionalmente o ranurarse y pueden formularse de  
50 manera que se proporciona una liberación lenta o controlada del ingrediente activo de ésta.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen píldoras que comprenden los ingredientes en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y lavados bucales que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un vehículo líquido adecuado.

55 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la piel pueden presentarse como pomadas, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente que se va a administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un sistema de administración tópica preferido es un parche transdérmico que contiene el ingrediente que se va a administrar.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo manteca de cacao y/o un salicilato.

5 Las formulaciones adecuadas para administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo rugoso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la manera en la que se toma un rapé; es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un contenedor del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas, en las que el vehículo es un líquido, para administración, como por ejemplo, un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen disoluciones acuosas o grasas del ingrediente activo.

10 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador que contienen, además del ingrediente activo, ingredientes tales como vehículos que se sabe en la técnica que son apropiados.

15 La formulación adecuada para inhalación puede presentarse como vapores, residuos de polvo, polvos o formulaciones en pulverizador que contienen, además del ingrediente activo, ingredientes tales como vehículos que se sabe en la técnica que son apropiados.

20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilizado) que sólo requieren la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de las clases descritas previamente.

25 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, sub-dosis diaria, como se ha recitado anteriormente en la presente memoria, o una fracción apropiada de ésta, del ingrediente administrado.

30 Debe entenderse que además de los ingredientes, particularmente los mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellas adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saporíferos u otros agentes que hagan la formulación más apetitosa y más fácil de tragar.

### Experimental

35 Para los experimentos *in vitro*, ITPP se disolvió en agua desionizada, el pH se ajustó a pH 7 y, para la incubación con sangre completa, la osmolaridad de las disoluciones de ITPP se ajustó con glucosa hasta 270-297 mOsM. Las mezclas de hemoglobina e ITPP se midieron con un analizador HEMOX (PD Marketing, Londres) inmediatamente después del mezclado. Los glóbulos rojos se incubaron con ITPP durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron 3 veces con tampón Bis-Tris (pH= 7,0) y se usaron para medida de P<sub>50</sub>.

40 En los experimentos realizados *in vivo* en los que ITPP se administró oralmente, se observó un desplazamiento significativo del valor P<sub>50</sub> de RBC circulantes. ITPP se disolvió en agua de bebida a una concentración de 20 g/L (= 27 mM, pH ~ 7,0) y se ofreció para beber *ad libitum*.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

### Ejemplo de referencia 1

45 **Desplazamiento hacia la derecha inducido de la curva de disociación O<sub>2</sub>-hemoglobina (ODC) en ratones (con administración oral)**

50 Se alimentaron doce (12) ratones C57BL/6 con una disolución de ITPP (20 g/L- concentración= 27 mM, pH ~ 7,0) durante 4 días (hasta 25 ml cada 24 hrs). Tres (3) ratones control bebieron agua pura, y se alimentaron cuatro (4) ratones control con una disolución de *mio*-inositol hexafosfato (IHP) (misma concentración y pH que ITPP). Se recogió sangre de todos los ratones en el día 0 (antes de empezar el tratamiento) y en los días 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 (después de que el tratamiento hubiera empezado), con el fin de medir los valores P<sub>50</sub>.

**Resultados**

La aplicación oral de ITPP causó desplazamientos hacia la derecha significativos de P<sub>50</sub> (hasta el 31%) en los ratones.

5 ITPP, cuando se administra oralmente a una concentración de 27 mM, causa un desplazamiento hacia la derecha del valor P<sub>50</sub> en glóbulos rojos circulantes murinos (véase la Figura 2). Existe un tiempo de retraso de aproximadamente 48 hrs. antes de que se consiga el desplazamiento máximo. Los desplazamientos máximos de P<sub>50</sub> se alcanzan entre el día 2 y el día 4, después de empezar la administración oral de ITPP. Después de 12 días, los valores de P<sub>50</sub> vuelven a los valores control, cuando la ingestión se para en el día 4. Existe un efecto significativo de la ingestión de ITPP en el número de glóbulos rojos. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, se cree que el efecto de la ingestión de ITPP en el número de glóbulos rojos en el que se observa regulación a la baja de la eritropoyesis, se debe al P<sub>50</sub> incrementado. La hemolisis puede descartarse, ya que la lisis de los glóbulos rojos nunca ocurrió *in vitro*. El nivel de iones, tales como sodio y potasio y calcio eran normales después de la aplicación oral de ITPP en ratones (Figura 3). La Figura 3 contiene los valores medios y SD para la concentración sérica de sodio, potasio y calcio obtenida en el día 0, 7 y 11 después de la administración oral de ITPP (4 ratones), IHP (3 ratones) o agua (3 ratones).

20 Se midieron los recuentos sanguíneos de todos los ratones, en el día 0, 7 y 11. El número de glóbulos rojos en los ratones que habían ingerido ITPP estaba reducido. No existieron diferencias significativas en el número de glóbulos blancos (por ejemplo, granulocitos, macrófagos, etc.) en la sangre de los ratones en los diferentes grupos. La Figura 4 muestra los recuentos de RBC para ratones con ODC desplazada comparado con controles. La Figura 4 muestra además la relación del desplazamiento de P<sub>50</sub> [%] con el número de eritrocitos/mm<sup>3</sup> en ratones que habían recibido ITPP. Parece, tomando como base los datos preliminares, que existe una relación inversa entre el número de glóbulos rojos y el desplazamiento de su valor P<sub>50</sub>. El valor basal del recuento de glóbulos rojos se restaura, una vez ΔP<sub>50</sub> se vuelve 0%, 12 días después de la ingestión de ITPP.

**Ejemplo de referencia 2**

25 **Desplazamiento hacia la derecha inducido de la ODC en ratones (inyectados intraperitonealmente)**

30 Cuando ITPP (pH 7, 200 µl) se inyectó intraperitonealmente a los ratones, los valores P<sub>50</sub> de los glóbulos rojos circulantes se desplazaron hasta 23%. La Figura 5 demuestra que ITPP se toleró bien por los ratones, hasta una concentración de 150 mM. El nivel de iones, tales como sodio, potasio y calcio eran normales después de la inyección intraperitoneal. Se inyectó intraperitonealmente a cada uno de seis (6) ratones 45 - 150 mM (= 0,17-0,88 g/kg de peso corporal) de ITPP. Los valores medios del % de desplazamiento y desviación estándar se muestran en la Figura 5.

La dependencia de la concentración de los desplazamientos de P<sub>50</sub> inducidos por ITPP es una indicación adicional de que este compuesto cruza la membrana de los glóbulos rojos.

**Ejemplo de referencia 3**

35 **Desplazamiento hacia la derecha inducido de la ODC en lechones (inyectados intravenosamente)**

ITPP también se inyectó intravenosamente (IV) en lechones. Se observó un desplazamiento hacia la derecha de P<sub>50</sub> cuando el compuesto se inyectó a una dosis de 1 g/kg de peso corporal.

40 Con el fin de comprobar posibles efectos secundarios de ITPP, se determinó el nivel de calcio en el suero del lechón inyectado. Una fuerte caída de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la sangre del animal inmediatamente después de la infusión indicó la posibilidad de que ITPP, con 3 grupos fosfato disociados uniéndose a Ca<sup>2+</sup>, reduce su disponibilidad como ión libre en la sangre. Un día después de la infusión, la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la sangre de los lechones se restauró al valor normal. Estos resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración de Ca<sup>2+</sup> en la sangre circulante del lechón

Muestra tomada	Conc. Ca <sup>2+</sup> [mmol/L]
Antes de la inyección	2,38
<b>10 min después de finalizar la inyección</b>	1,73
<b>24 hrs después de la inyección</b>	2,36

Tomando como base esta observación, se inyectó una disolución de CaCl<sub>2</sub> (equimolar con ITPP) con la disolución de ITPP, de manera que los grupos fosfato disociados de ITPP estaban saturados. No ocurrió ninguno de los efectos secundarios observados previamente. El nivel de calcio permaneció constante y el desplazamiento de P<sub>50</sub> fue, de nuevo, aproximadamente 20% del valor basal. El nivel de los iones sodio y potasio no se alteró después de la inyección intravenosa de ITPP en lechones.

#### Ejemplo de referencia 4

##### Efecto *in vivo* de la disminución de la afinidad de la hemoglobina por O<sub>2</sub> por ITPP en PO<sub>2</sub> intratumoral, angiogénesis y expresión del ARNm de VEGF

ITPP, cuando se administra oralmente, intravenosamente, o intraperitonealmente, inhibe la angiogénesis en tumores en crecimiento mediante el aumento de PO<sub>2</sub> en los tumores en formación. Treinta (30) ratones C57BL/6 recibieron 20 g/L de ITPP oralmente hasta que el valor de P<sub>50</sub> mostró un desplazamiento de al menos 20% por encima del valor control. Posteriormente, todos los animales recibieron 1x10<sup>6</sup> células de carcinoma Pulmonar de Lewis (LLC), inyectadas en la cavidad dorsal. A diferentes puntos de tiempo, se ensayó el ARNm de VEGF por RT-PCR en los tumores en crecimiento en ambos grupos de ratones.

Se molieron muestras de tejido tumoral en un tampón de lisis RIPA (1% detergente Nonidet p-40, 50 mM Tris pH 8,0, 137 mM NaCl, 10% glicerol) suplementado con mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Reinach, Suiza). Después de centrifugar durante 10 minutos a 4<sup>o</sup>C y 12.000 g, se determinaron las concentraciones de proteínas de los extractos de tejido según el método de Bradford. Las muestras de proteína solubles en detergente (10 mg) se separaron por tamaño en una SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Protran BA 85, Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania). Las membranas se bloquearon durante 3 horas a temperatura ambiente en 10% leche desnatada en disolución salina tampón Tris que contiene 0,1% Tween, antes de una incubación toda la noche a 4<sup>o</sup>C con anticuerpos policlonales de conejo que reconocen el factor de crecimiento del endotelio vascular humano, de ratón y rata (VEGF A-20, sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) a una dilución de 1:200. Las membranas se ensayaron para anticuerpo primario con conjugados anti-conejo (1:16.000) peroxidasa (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, Francia) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los complejos resultantes se visualizaron por autorradiografía con quimioluminiscencia aumentada (Amersham Pharma Biotech, Orsay, Francia).

Hubo una diferencia en el nivel de ARNm del gen de VEGF en ambos grupos. La Figura 6 muestra un gel de agarosa que indica las concentraciones del ARNm de VEGF en tumores de los animales control y que bebieron ITPP. El ensayo de gel de agarosa RT-PCR de los ARNm de VEGF del tejido tumoral tomado de 2 ratones cada uno en el día 15 después de la inoculación de células LLC (carril 1: controles, carril 2: animales tratados con ITPP) y el día 30 después de la inoculación (carril 3: animales control, carril 4: animales tratados con ITPP). La Figura 7 muestra el ensayo de transferencia Western del VEGF expresado en tumores de animales que portan tumor LLC control y tratados con ITPP.

La cuantificación de los ensayos en gel indicó una reducción por un factor de 10.000 de la cantidad de los ARNm de VEGF detectados en los tumores de los animales que habían recibido ITPP, en el día 9 y después, aunque las diferencias permanecen entre los animales tratados y no tratados, tienden a disminuir. Esto indica que ITPP captado por los glóbulos rojos circulantes incrementa significativamente la PO<sub>2</sub> del tumor.

#### Ejemplo 5

##### 40 Eficacia de la sal de calcio de *mio*-inositol tripirofosfato

Cuando la sal de sodio de *mio*-inositol tripirofosfato (ITPP-Na) se mezcla con CaCl<sub>2</sub>, se obtiene una mezcla de ITPP-Na e ITPP-Ca (sal de calcio de *mio*-inositol tripirofosfato). Esta mezcla, cuando se añade a hemoglobina libre o a sangre completa induce un desplazamiento de P<sub>50</sub> del 170% y 25%, respectivamente como se muestra en las Tablas 2 y 3 más adelante. Por favor, véanse los resultados en las Tablas 2 y 3 para el compuesto 15. Los compuestos en las Tablas 2 y 3 son como sigue: 4 es la sal piridinio de ITPP, 5 es la sal de sodio de ITPP (es decir, ITPP-Na), 7 es la sal de N,N-dimetilciclohexil amonio de ITPP, 11 es la sal cicloheptil amonio de ITPP, 12 es la sal ciclooctil amonio de ITPP, 13 es la sal piperazinio de ITPP, 14 es la sal tripiperazinio de ITPP, y 15 es la sal de calcio de ITPP (es decir, ITPP-Ca).

En las Tablas 2 y 3, puede observarse la eficacia de todas las sales de ITPP respecto a su capacidad para actuar como efectores alostéricos de la hemoglobina. La sal de sodio y la sal de calcio de ITPP parecen ser los mejores efectores alostéricos tanto para hemoglobina libre (Tabla 2) como en sangre completa (Tabla 3). Sin embargo, los cerdos a los que se inyectó intravenosamente ITPP-Na a una proporción de 1 g/kg de peso resultaron en varios efectos secundarios adversos. La inyección intravenosa a cerdos de ITPP-Na resultó en enrojecimiento, un incremento en la frecuencia cardiaca, y una disminución en la concentración plasmática de Ca<sup>2+</sup> de 2,38 mmoles/L a 1,76 mmoles/L.

La administración de la mezcla de la sal de sodio y de calcio de ITPP, a la misma dosificación, no indujo ninguno de los efectos citados y la concentración plasmática de Ca<sup>2+</sup> permaneció inalterada a 2,38 mmoles/L.

Esta ausencia de toxicidad de la mezcla de las sales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de ITPP indujo la síntesis y purificación de la sal de  $\text{Ca}^{2+}$  de ITPP, que se describe más adelante. Aunque la sal de  $\text{Ca}^{2+}$  de ITPP no fue tan buen efector alostérico en hemoglobina pura o en los glóbulos rojos de lo que fue la sal de sodio (véanse las Tablas 2 y 3), la sal de calcio no tuvo ninguno de los efectos secundarios adversos que estaban asociados con la sal de sodio cuando se administró a uno o más individuos. De acuerdo con esto, se encontró que la sal de calcio de ITPP tenía un interés particular y se estudió adicionalmente.

### Ejemplo 6

#### Preparación de la sal de calcio de *mio*-inositol 1,6:2,3;4,5-tripirofosfato:

Las sales hexasodio y hexapiridinio de *mio*-inositol tripirofosfato (ITPP-Na e ITPP-py) se obtienen a partir de *mio*-inositol hexafosfato (IHP) como se describe en K.C. Fylaktakidou, J. M. Lehn, R. Greferath y C. Nicolau, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, *15*, 1605-1608. Otras sales de *mio*-inositol tripirofosfato también pueden prepararse según la referencia de Fylaktakidou et al. Véase también L. F. Johnson y M. E. Tate, *Can. J. Chem.*, **1969**, *47*, 63 para una descripción de fitinas.

Otros compuestos pueden prepararse a partir de los compuestos anteriores. Por ejemplo, el paso de una disolución acuosa de ITPP-py sobre una columna Dowex  $\text{H}^+$  de intercambio iónico proporciona una disolución de la forma perprotonada correspondiente de *mio*-inositol tripirofosfato (es decir, ITPP-H).

El tratamiento del ITPP-H con tres equivalentes de hidróxido de calcio (un equivalente por grupo pirofosfato) rinde la sal de tricalcio ITPP-Ca, que puede aislarse por evaporación de la disolución acuosa bajo presión reducida tal como por el uso de un evaporador giratorio (es decir, un rotavapor).

Alternativamente, ITPP-Ca puede producirse por la adición de cantidades equimolares de  $\text{CaCl}_2$  con una disolución acuosa de ITPP-Na. La mezcla resultante proporciona ITPP-Ca, que está contaminado con NaCl.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer que comprende la sal de calcio de *mio*-inositol tripirofosfato y un adyuvante, diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable de éste. En esta composición farmacéutica, el inositol tripirofosfato es opcionalmente mioinositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato. La composición de la presente invención también contiene la sal de sodio de *mio*-inositol tripirofosfato.

En una realización, las composiciones anteriores comprenden como el mioinositol tripirofosfato, mioinositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato. La composición se prepara a una dosificación para tratar cáncer. Los cánceres tratables incluyen, pero no están limitados a, rabdomiosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y/o osteosarcoma. Además, los cánceres que se van a tratar pueden incluir opcionalmente uno o más de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de esófago, melanoma cutáneo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer testicular, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, linfoma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer rectal, cáncer del intestino delgado, cáncer de tiroides, cáncer uterino, linfoma de Hodgkin, cáncer de labios y oral, cáncer de piel, leucemia, o mieloma múltiple.

En una realización, la composición de la presente invención se prepara de cualquiera de las formas enumeradas anteriormente de administrar una dosificación de mioinositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato (tal como la sal de calcio de este compuesto) de manera que se administra entre aproximadamente 0,5 y 1,5 g/kg, y opcionalmente entre aproximadamente 0,9 y 1,1 g/kg por día, en una cantidad eficaz.

Un método para preparar la sal de calcio de mioinositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato comprende añadir un compuesto orgánico que contiene sal de calcio a una forma perprotonada de mioinositol tripirofosfato. El compuesto orgánico que contiene sal de calcio puede ser uno o más de hidróxido de calcio, cloruro de calcio, bromuro de calcio, yoduro de calcio, y fluoruro de calcio. El método puede comprender añadir al menos una proporción de tres a uno del compuesto orgánico que contiene calcio respecto a la cantidad del compuesto mioinositol tripirofosfato perprotonado. El método puede comprender añadir al menos una proporción de tres a uno del hidróxido de calcio respecto a la cantidad del compuesto mioinositol tripirofosfato perprotonado.

En otra realización, la composición para uso en el tratamiento del cáncer es para administración a un individuo en una cantidad farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las composiciones enumeradas anteriormente, en el que el ingrediente activo en la composición (es decir, ITPP) se administra a un individuo a una dosificación de aproximadamente 0,5 y 1,5 g/kg o alternativamente, en una cantidad que está entre aproximadamente 0,9 y 1,1 g/kg al día.

Debe entenderse que cualquiera de los uno o más elementos descritos anteriormente de cualquier realización puede combinarse con uno cualquiera o más elementos en cualquier otra realización. Además, cuando se menciona un intervalo, debe entenderse que se contempla que cualquier número real que se encuentre en el intervalo es un punto final contemplado. Por ejemplo, si se proporciona un intervalo de 0,9 y 1,1 g/kg, se contempla que cualquier valor de número real que se encuentre en ese intervalo (por ejemplo, 0,954 a 1,052 g/kg) esté contemplado como un

intervalo subgénero de la invención, incluso si esos valores no se mencionan explícitamente. Finalmente, la invención se definirá preferentemente por las reivindicaciones siguientes.

**Tabla 2.** Valores de  $P_{50}$  de Hb libre después de incubación con los compuestos **4, 5, 7, 11-14** y **15**, *in vitro*

Compuesto	$P_{50}$ (Torr) Hb libre	$P_{50}$ (Torr) Hb + compuesto	Incremento de $P_{50}$ (%) + SD
<b>4</b>	(H) 15,3	31,6	107 ± 22
	(M) 25,0	50,0	100 ± 18
<b>5</b>	(H) 15,3	49,8	225 ± 19
	(M) 24,9	69,7	180 ± 25
	(P) 22,0	68,1	209 ± 39
<b>7</b>	(M) 24,9	45,1	81 ± 15
<b>11</b>	(M) 24,9	43,8	76 ± 13
<b>12</b>	(M) 24,9	30,6	23 ± 5
<b>13</b>	(M) 23,4	67,7	189 ± 43
<b>14</b>	(M) 23,4	82,9	254 ± 49
<b>15</b>	(H) 12,3	33,1	170 ± 32
	(M) 26,9	61,9	130 ± 30

5 Hb libre H= humana; M= murina; P= porcina. La concentración de la disolución de los compuestos fue 60 mM. Se muestran las medias de los desplazamientos de  $P_{50}$  en %. SD= desviación estándar. Compuestos **4, 7, 11, 12, 14** y **15**: se usaron tres valores de  $P_{50}$  de cada uno para el cálculo de las medias; compuesto **5**: con sangre humana: cinco valores, sangre murina: diez valores y sangre porcina: tres valores se usaron para los cálculos de las medias de los desplazamientos de  $P_{50}$  en %.

10 **Tabla 3.** Valores de  $P_{50}$  de sangre completa después de incubación con los compuestos **4, 5, 7, 11-14** y **15**, *in vitro*

Compuesto	$P_{50}$ (Torr) sangre completa	$P_{50}$ (Torr) compuesto + sangre completa	Incremento de $P_{50}$ (%) + SD
<b>4</b>	(H) 22,1	24,3	10 ± 4
	(M) 37,9	42,7	13 ± 2
<b>5</b>	(H) 22,1	30,8	39 <sup>a</sup> ± 5
	(P) 31,6	44,2	40 <sup>a</sup> ± 3
	(M) 36,7	47,4	29 <sup>b</sup> ± 3
	(M) 40,1	52,0	30 ± 3
<b>7</b>	(M) 37,9	45,5	20 ± 2
<b>11</b>	(M) 37,9	41,3	9 ± 1
<b>12</b>	(M) 37,9	41,7	10 ± 2
<b>13</b>	(M) 39,2	41,9	7 ± 1
<b>14</b>	(M) 39,2	42,3	8 ± 2
<b>15</b>	(H) 24,8	31,0	25 ± 3
	(M) 40,1	55,3	38 <sup>a</sup> ± 4

Sangre completa H= humana; M= murina; P= porcina. Concentraciones de los compuestos: 30 mM; se muestran las medias (cuatro valores únicos) de los desplazamientos  $P_{50}$  + SD.

<sup>a</sup> Concentración del compuesto: 60 mM.

15 <sup>b</sup> Concentración del compuesto: 4 mM.

## REFERENCIAS

1. Fylaktakidou, K., Lehn, J.-M., Greferath, R., y Nicolau, C. (2004) *Bioorg.Med.Chem. Lett* (submitted)
2. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993) *Nature* **362**, 841-844.
3. Kandel J, Bossy-Wetzell E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D (1991) *Cell* **66**, 1095-1104.
4. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) *Cell* **88**, 277-285.
5. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 6624-6628.
6. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) *Cell* **79**, 315-328.
7. Chen C, Parangi S, Tolentino MJ, Folkman J. (1995) *Cancer Res.* **55**, 4230-4233.
8. Ferrara N. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 795-803.
9. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) *Endocr Rev.* **18**, 4-25.
10. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003) *Nat Med.* **9**, 669-676.
11. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA, Bevilacqua G. (1997) *Clin Cancer Res.* **3**, 861-865.
12. Dor Y, Porat R, Keshet E. (2001) *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**, C1367-1374.
13. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996) *Cancer Res.* **56**, 941-943.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla de la sal de sodio y de calcio de mio-inositol tripirofosfato y un adyuvante, diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el mio-inositol tripirofosfato es mio-inositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y osteosarcoma.
- 10 4. La composición para uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el cáncer se selecciona de uno o más del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de esófago, melanoma cutáneo, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer testicular, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, linfoma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer rectal, cáncer del intestino delgado, cáncer de tiroides, cáncer uterino, linfoma de Hodgkin, cáncer de labios y oral, cáncer de piel, leucemia, y mieloma múltiple.
- 15 5. La composición para uso de la reivindicación 2, en la que la dosificación de mio-inositol 1,6:2,3:4,5 tripirofosfato es 0,5 a 1,5 g/kg.
6. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se formula para administración intravenosa.
- 20 7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la mezcla de la sal de sodio y de calcio de mio-inositol tripirofosfato se obtiene mezclando la sal de sodio de mio-inositol tripirofosfato con  $\text{CaCl}_2$ .

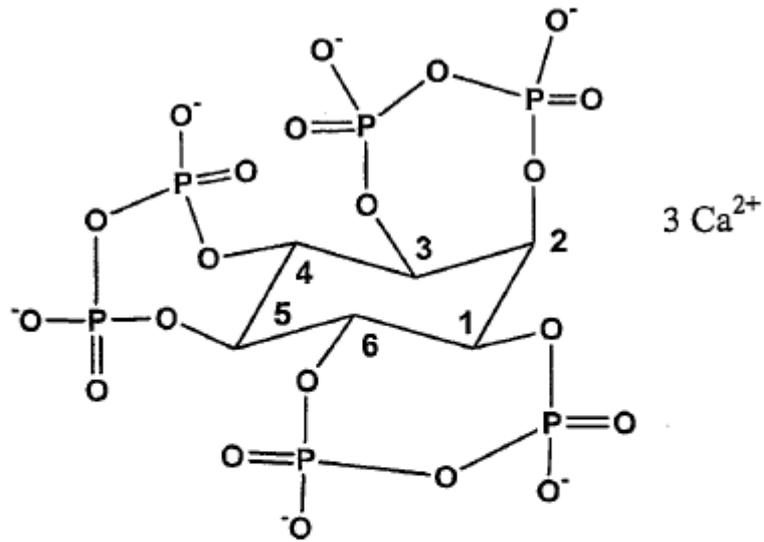


Figura 1

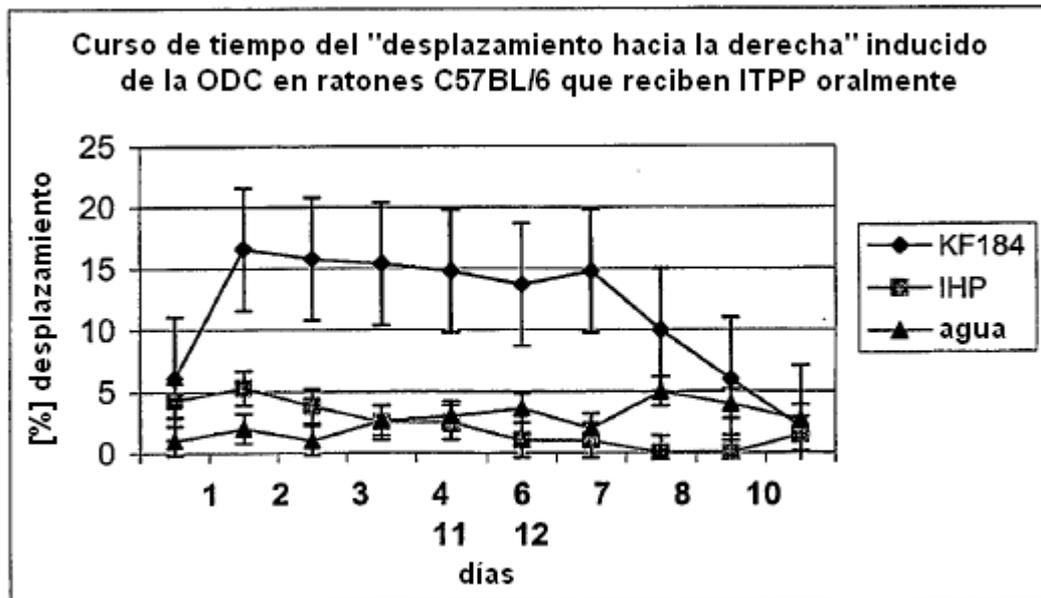


Figura 2

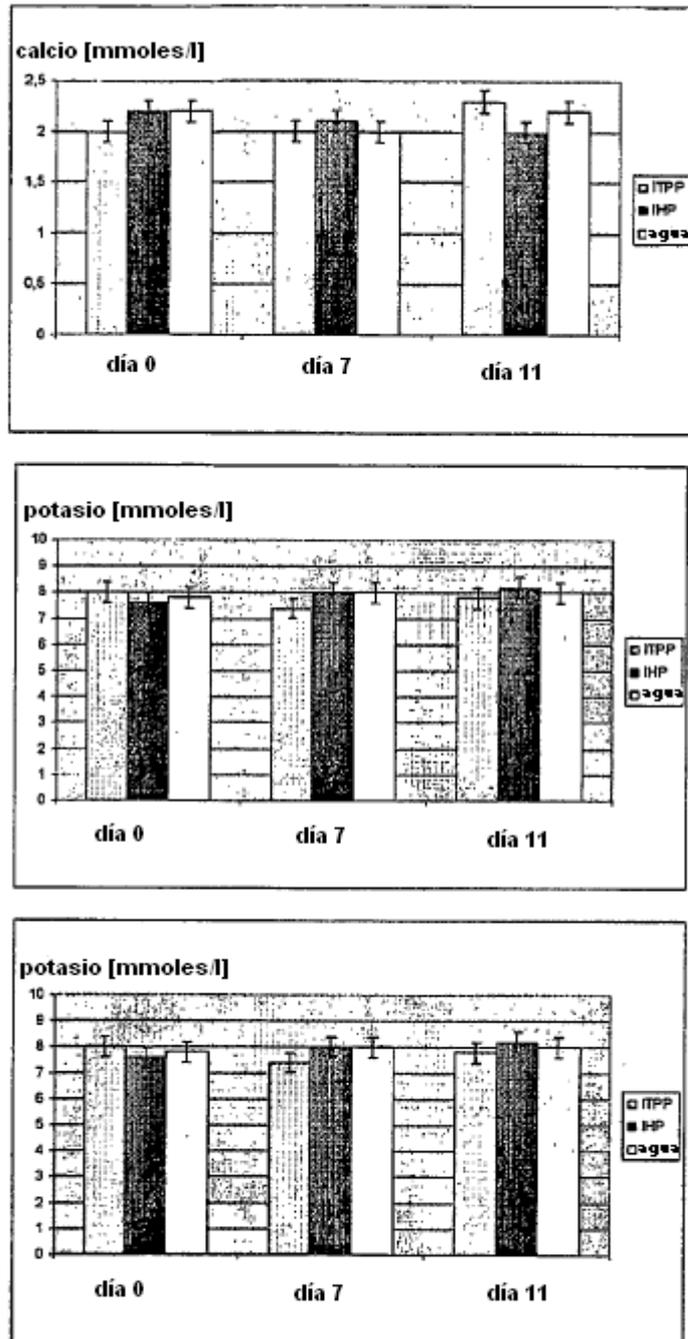


Figura 3

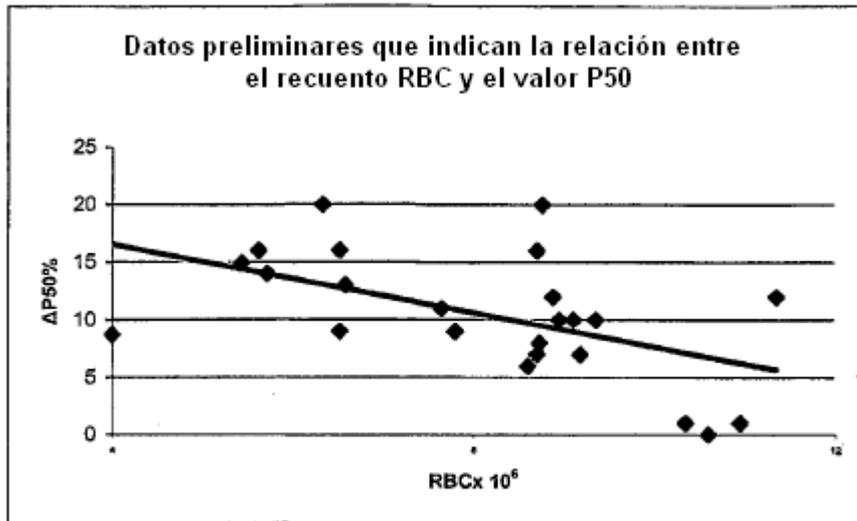


Figura 4

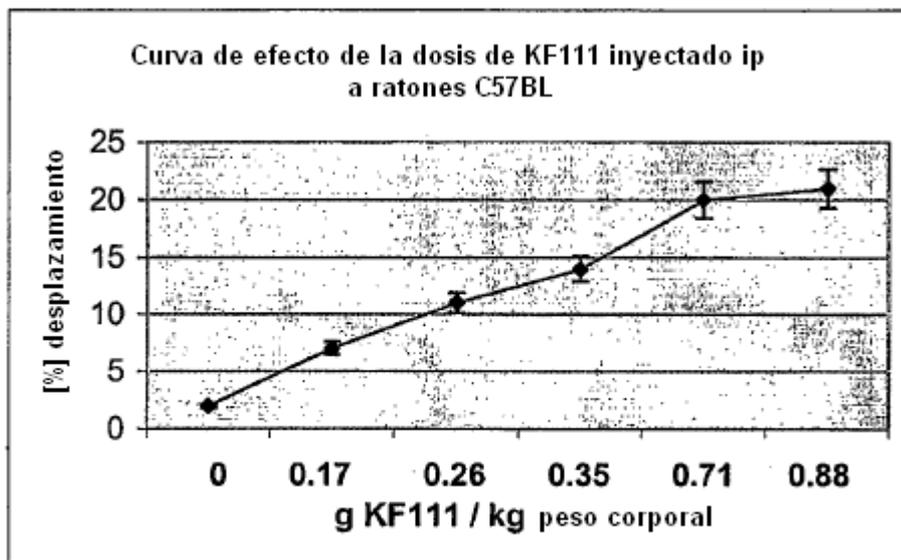
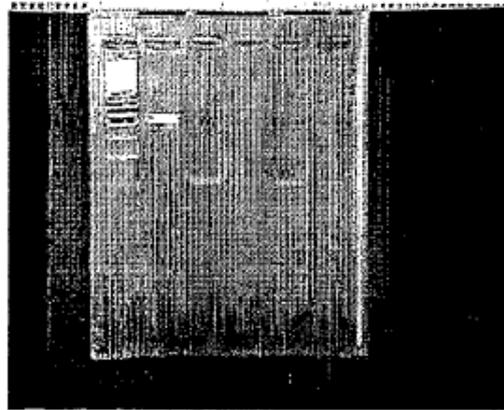


Figura 5



1 2 3 4

Figura 6

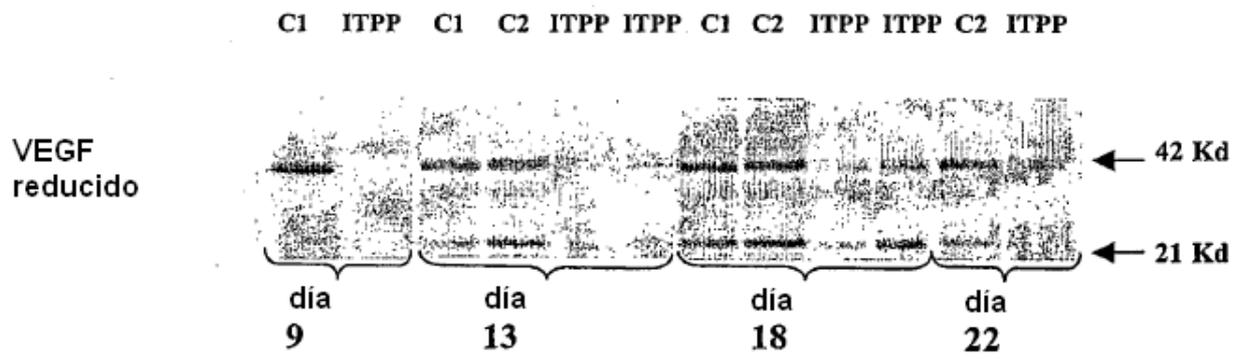


Figura 7