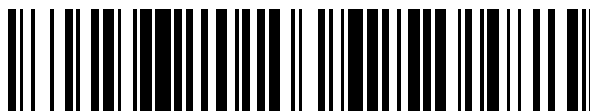


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 734**

51 Int. Cl.:

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08863324 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2224925**

54 Título: **Compuestos para usar en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

14.12.2007 US 6010

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

01.12.2015

73 Titular/es:

**PLEDPHARMA AB (100.0%)
GREV TUREGATAN 7
114 46 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON, JAN OLOF G.;
KURZ, TINO y
ANDERSSON, ROLF**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 552 734 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

Compuestos para usar en el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto para el uso en el tratamiento del cáncer. La invención también se refiere al uso del compuesto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. También se describe un método de tratamiento del cáncer en el cuerpo humano o no humano en donde dicho método comprende administrar a dicho cuerpo un compuesto como se menciona anteriormente. La invención además se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto mencionado anteriormente y un compuesto que tiene capacidad cito-protectora. La invención también se refiere al uso de la composición farmacéutica en la
10 fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

15 Los documentos EP0910360, US6147094, EP0936915, US6258828, EP1054670, US6310051, EP1060174, US6391895, describen el uso de agentes quelantes basados en dipiridoxilo y sus quelatos metálicos y el uso de ciertos compuestos que contienen manganeso, en particular quelatos de manganeso, en medicina. También se describe el uso de dichos compuestos como agentes protectores celulares en terapia de cáncer. Los documentos citados anteriormente describen que ciertos agentes quelantes, en particular agentes quelantes basados en dipiridoxilo y ácido aminopolicarboxílico, y sus quelatos metálicos son efectivos en el tratamiento o prevención de cardiotoxicidad inducida por antraciclina, lesiones inducidas por isquemia-reperfusión y aterosclerosis. Los agentes
20 quelantes basados en dipiridoxilo y sus quelatos con metales trivalentes se han descrito anteriormente por Taiferro (Inorg. Chem. 1984; 23:1183-1192).

25 DPDP (ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético), y el equivalente desfosforilado PLED (ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético) son compuestos de dipiridoxilo capaces de quelatar metales. Se ha descrito anteriormente que los quelatos de manganeso de estos compuestos, MnDPDP y su equivalente desfosforilado MnPLED, poseen actividad antioxidante catalítica, es decir, una actividad mimética superóxido dismutasa (SOD). Se ha mostrado que estos compuestos tienen un efecto protector en las células normales, por ejemplo, frente al fármaco citostático doxorubicina y la isquemia-reperfusión. Es la actividad mimética SOD, que es una propiedad inherente del manganeso con actividad redox (Mn^{2+}/Mn^{3+}) unido a DPDP/PLED (Brurok et al., Biochem Biophys Res Commun. 1999; 254:768-721), lo que explica los efectos protectores. Por consiguiente, Brurok y colaboradores (1999) han mostrado que el complejo metálico de PLED pierde su actividad catalítica después de
30 sustituir el manganeso con actividad redox con zinc sin actividad redox (Zn^{2+}).

35 Laurent et al. (Cancer Res. 2005; 6:948-56) y Alexandre et al., (J Natl Cancer Inst. 2006; 98:236-44) han descrito recientemente que MnDPDP (equivalente al agente de contraste MRI listo para usar Teslascan) no solo aumentó la supervivencia de células normales sino que también aumentó la muerte de células cancerígenas durante el tratamiento citostático, por ejemplo, con oxaliplatino. Los fármacos citostáticos pueden provocar muerte de células cancerígenas elevando el H_2O_2 intracelular e induciendo la apoptosis. La hipótesis de Laurent et al., fue que MnDPDP debido a su actividad mimética SOD elevó el H_2O_2 intracelular y por tanto actuó en sinergia con los fármacos citostáticos. Como el nivel basal de H_2O_2 es mucho menor en células normales comparado con las células cancerígenas, los autores sugirieron que la elevación de un nivel bajo de H_2O_2 indujo la supervivencia celular en células normales. Sugirieron además que la elevación desde un nivel basal mucho mayor de H_2O_2 en las células cancerígenas al mismo tiempo dio por resultado la señalización apoptótica y por tanto la muerte celular. Por consiguiente, estos autores sugirieron que ambos de estos efectos, es decir, el aumento en la muerte de células cancerígenas y la supervivencia de células normales, se provocaron por la actividad mimética SOD de MnDPDP, una actividad que es absolutamente dependiente del manganeso con actividad redox. Se ha mostrado también que la inyección intravenosa tanto del compuesto parental MnDPDP como de su metabolito MnPLED en ratones elevó la
40 protección frente a ciertos fármacos citostáticos (documentos EP0910360 y US6147094).

45 Cuando MnDPDP se inyecta de forma intravenosa en seres humanos aproximadamente el 70% del manganeso administrado se libera. Para el uso de formación de imágenes diagnósticas y para el uso terapéutico ocasional, la disociación de manganeso de MnDPDP no representa un problema grave. Sin embargo, para el uso más frecuente la toxicidad de manganeso acumulada puede representar un serio problema toxicológico, particularmente cuando llega a neurotoxicidad (Crossgrove & Zheng; NMR Biomed. 2004; 17:544-53). Así, para uso terapéutico frecuente, como en tratamiento de cáncer, los compuestos que disocian manganeso deberían evitarse.

50 Un número de agentes anti-tumorales se asocian con efectos secundarios adversos. Paclitaxel, por ejemplo, es uno de dichos fármacos citostáticos que ha mostrado actividad anti-neoplásica frente a una variedad de tejidos malignos, que incluyen los de mama. Sin embargo, a las dosis necesarias para tener un efecto anti-neoplásico, el paclitaxel tiene un número de efectos secundarios adversos que incluyen irregularidades cardiovasculares además de toxicidad hematológica y gastrointestinal. El oxaliplatino, en particular en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU), es otro ejemplo de un fármaco citostático que es efectivo en el tratamiento de cáncer colorrectal pero su uso está restringido por efectos secundarios adversos severos, en particular toxicidad hematológica y neurotoxicidad. Los
55

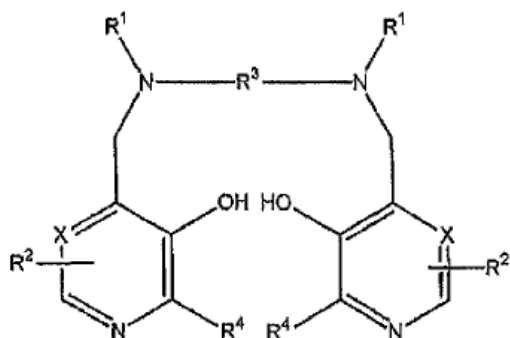
efectos secundarios severos también restringen el uso de terapia de radiación en cáncer. D1 (documento US 2007/148154 A1) describe el uso de un mimético de superóxido dismutasa y glutatión reductasa en la producción de un medicamento anti-cancerígeno, y en particular una mejora de la citotoxicidad anti-tumoral de oxaliplatino para Teslascan. Teslascan es la formulación lista para usar de mangafodipir (Dipiridoxil-difosfato de manganeso (MnDPDP)) que también contiene ácido ascórbico.

Hay por tanto una necesidad médica no satisfecha por encontrar nuevos fármacos quimioterapéuticos con menos efectos secundarios, además de encontrar métodos para proteger las células normales frente a lesiones provocadas por el tratamiento del cáncer.

Descripción de la invención

- La presente invención proporciona un compuesto con capacidad para matar células cancerígenas para el uso en el tratamiento del cáncer. La invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. También se describe una composición farmacéutica que comprende el compuesto mencionado anteriormente y un segundo compuesto que tiene una capacidad citoprotectora, es decir, la capacidad para proteger células normales durante el tratamiento del cáncer de los efectos secundarios provocados por los fármacos quimioterapéuticos y la radiación. También se proporciona el uso de una composición farmacéutica según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Un primer aspecto de la invención se dirige a un compuesto de Fórmula I



Fórmula I

para el uso en el tratamiento del cáncer, en donde

- X representa CH o N,
 cada R¹ representa independientemente hidrógeno o -CH₂COR⁵;
 R⁵ representa hidroxilo, opcionalmente alcoxi hidroxilado, amino o alquilamido;
 cada R² representa independientemente un grupo ZYR⁶, Z representa un enlace, o un grupo alquileo u oxoalquileo C₁₋₃ opcionalmente sustituido por un grupo R⁷;
 Y representa un enlace, un átomo de oxígeno o un grupo NR⁶;
 R⁶ es un átomo de hidrógeno, un grupo COOR⁸, un grupo alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de COOR⁸, CONR⁸₂, NR⁸₂, OR⁸, =NR⁸, =O, OP(O)(OR⁸)R⁷ y OSO₃M;
 R⁷ es hidroxilo, un grupo alquilo o aminoalquilo opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;
 R⁸ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;
 M es un átomo de hidrógeno;
 R³ representa un grupo alquileo C₁₋₈, preferiblemente un grupo alquileo C₁₋₆, por ejemplo uno C₂₋₄, un grupo 1,2-cicloalquileo, o un grupo 1,2-arileno, opcionalmente sustituido con R⁷; y cada R⁴ representa independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃.
 En una realización de la invención R⁵ es hidroxilo, alcoxi C₁₋₈, etilenglicol, glicerol, amino o alquil C₁₋₈ amido;
 Z es un enlace o un grupo seleccionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO o CH₂COCH₂; Y es un enlace;
 R⁸ es un grupo alquilo mono o poli(hidroxilo o alcoxilado) o un grupo de la fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷; y R⁷ es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido.

En otra realización de la invención R^3 es etileno y cada grupo R^1 representa $-CH_2COR^5$ en que R^5 es hidroxilo.

En aún otra realización de la invención el compuesto de Fórmula I es ácido N,N'-dipiridoxiletlenodiamina-N,N'-diacético (PLED).

5 En una realización adicional de la invención el compuesto de Fórmula I es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP).

En otra realización de la invención se describe el uso de un compuesto de Fórmula I, como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, por ejemplo, leucemia, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático y metástasis de los mismos. El medicamento puede comprender vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Un segundo aspecto de la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto de Fórmula I, como se define anteriormente, y un segundo compuesto que tiene una capacidad cito-protectora.

En otra realización de la invención el segundo compuesto comprendido en la composición farmacéutica es un quelato metálico que comprende un compuesto de Fórmula I como se define anteriormente.

15 En aún otra realización de la invención el quelato metálico comprendido en la composición farmacéutica tiene un valor K_a preferiblemente en el intervalo de 10^8 a 10^{24} , más preferiblemente en el intervalo de 10^{10} a 10^{22} y lo más preferiblemente en el intervalo de 10^{12} a 10^{20} .

En una realización aún adicional de la invención el quelato metálico comprendido en la composición farmacéutica tiene un valor K_a menor que el valor K_a de un quelato de hierro (Fe^{3+}) que comprende un compuesto de Fórmula I como se define anteriormente, mediante un factor de al menos 10^3 .

20 En aún otra realización de la invención el metal en el quelato metálico comprendido en la composición farmacéutica es manganeso (Mn^{2+} o Mn^{3+}) o cobre (Cu^+ o Cu^{2+}).

En otra realización de la invención el primer compuesto de la composición farmacéutica es ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético y el segundo compuesto es un quelato metálico que comprende ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético. El metal en el quelato metálico es preferiblemente manganeso o cobre.

25 En una realización preferida de la invención el primer compuesto de la composición farmacéutica es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético y el segundo compuesto es un quelato metálico que comprende ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético. El metal en el quelato metálico es preferiblemente manganeso o cobre.

30 En una realización adicional de la invención el segundo compuesto de la composición farmacéutica según la invención puede constituir preferiblemente el 1/100 a 99/100 del primer compuesto, en una base molar.

En aún una realización adicional de la invención se proporciona la composición farmacéutica según la invención para el uso en el tratamiento del cáncer.

35 En un cuarto aspecto de la invención se proporciona el uso de una composición farmacéutica según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, por ejemplo, leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer hepático y metástasis de los mismos.

En otra realización de la invención se proporciona el uso de una composición farmacéutica según la invención, en donde el medicamento comprende además vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención debería entenderse también que incluye el uso de la composición farmacéutica según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

40 Los compuestos de Fórmula I como se definen anteriormente para el uso en la invención debería entenderse que son compuestos terapéuticamente activos y fisiológicamente preferidos.

45 Como se usa en esta memoria, los términos "alquilo" y "alquileo" incluyen hidrocarburos saturados e insaturados, de cadena lineal y ramificada. El término "1,2-cicloalquileo" incluye los grupos cicloalquileo tanto cis como trans y grupos cicloalquileo sustituidos con alquilo que tienen de 5-8 átomos de carbono. El término "1,2-arileno" incluye grupos fenilo y naftilo y derivados sustituidos con alquilo de los mismos que tienen de 6 a 10 átomos de carbono.

A menos que se especifique otra cosa, cualquier resto alquilo, alquileo o alqueno puede contener de forma conveniente de 1 a 20, preferiblemente 1-8, más preferiblemente 1-6 y especialmente preferiblemente 1-4 átomos de carbono.

Los restos cicloalquilo, arilo y aralquilo pueden contener de forma conveniente 3-18, preferiblemente 5-12 y especialmente preferiblemente 5-8 átomos anulares. Se prefieren los restos arilo que comprenden grupos fenilo o naftilo. Como grupos aralquilo, se prefieren fenil alquilo C₁₋₈, especialmente bencilo.

5 Donde los grupos pueden estar opcionalmente sustituidos por grupos hidroxilo, esto puede ser monosustitución o polisustitución y, en el caso de polisustitución, los sustituyentes alcoxi y/o hidroxilo pueden transportarse por sustituyentes alcoxi.

En la Fórmula I, R⁵ es preferiblemente hidroxilo, alcoxi C₁₋₈, etilenglicol, glicerol, amino o alquil C₁₋₈ amido. Preferiblemente cada grupo R¹ representa -CH₂COR⁵ en que R⁵ es hidroxilo.

10 En el compuesto de Fórmula I, Z es preferiblemente un enlace o un grupo seleccionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO o CH₂COCH₂. Preferiblemente, Y representa un enlace.

15 El compuesto de Fórmula I puede tener los mismos o diferentes grupos R² en los dos anillos piridilo y estos pueden estar unidos a las mismas o diferentes posiciones anulares. Sin embargo, se prefiere especialmente que la sustitución sea en las posiciones 5 y 6, lo más especialmente la posición 6, es decir, para al grupo hidroxilo. El compuesto en que los grupos R² son idénticos e idénticamente localizados, por ejemplo, 6,6', se prefiere especialmente.

Se prefieren como grupo R⁶ grupos alquilo mono o poli(hidroxi o alcoxilados) o un grupo de la fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷.

R⁷ es preferiblemente hidroxilo o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido.

20 Identidades particularmente preferidas para el grupo R² incluyen grupo CHR⁷OCO(CH₂)_xPh y CHR⁷OCO(CH₂CO)_xPh (en donde x es 1 a 3), CHR⁷OCOBu^t, CH₂N(H)R⁶, CH₂N(H)R⁶, N(H)R⁶, N(R⁶)₂, CH₂OH, CH₂OR⁶, COOR⁶, CON(H)R⁶, CON(R⁶)₂ o OR⁶ (donde R⁶ es un grupo alquilo mono o polihidroxilado, preferiblemente C₁₋₄, especialmente preferiblemente C₁₋₃), (CH₂)_nCOOR^{7'} (en donde n es 1 a 6), COOR^{7'} (donde R^{7'} es un alquilo C₁₋₄, preferiblemente C₁₋₃, especialmente preferiblemente un grupo metilo), CH₂OSO₃M, CH₂CH₂COOH, CH₂OP(O)(OH)(CH₂)₃NH₂, CH₂OP(O)(OH)CH₃ o CH₂OP(O)(OH)₂. Aún más preferiblemente, R² representa un grupo de la fórmula CH₂OP(O)(OH)₂.

25 Se prefieren particularmente compuestos de Fórmula I en que R³ es etileno y R² tiene cualquiera de las identidades enumeradas anteriormente.

30 La composición farmacéutica de la presente invención y los preparados incluidos en el kit de la presente invención pueden formularse con auxiliares de formulación farmacéuticos o veterinarios convencionales, por ejemplo estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de osmolalidad, tampones, agentes de ajuste de pH, etc. y pueden estar en una forma adecuada para administración parenteral o enteral, por ejemplo inyección o infusión. Así la composición farmacéutica de la presente invención puede estar en una forma de administración farmacéutica convencional tal como un comprimido, cápsula, polvo, disolución, suspensión, dispersión, jarabe, supositorio, etc.

35 Los compuestos de Fórmula I y los quelatos metálicos que comprenden los compuestos de Fórmula I pueden formularse por tanto para la administración usando vehículos y/o excipientes fisiológicamente aceptables de una manera bien conocida por los expertos en la técnica. Los compuestos de Fórmula I y los quelatos metálicos que comprenden los compuestos de Fórmula I pueden suspenderse o disolverse por ejemplo en un medio acuoso, opcionalmente con la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 El medicamento y la composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse por diversas rutas, por ejemplo, de forma oral, transdérmica, rectal, intratecal, tópica o por medios de inhalación o inyección, en particular inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravascular. Otras rutas de administración pueden concebirse si aumentan la efectividad, la biodisponibilidad o la tolerancia de los productos. La ruta más apropiada puede elegirse por los expertos en la técnica según la formulación usada.

45 La cantidad de un medicamento que inhibe el cáncer administrado a un paciente es dependiente de varios factores diferentes tales como el tipo de cáncer, la edad y peso del paciente, etc, y el médico que atiende seguirá el tratamiento para ajustar las dosis si es necesario en base a los ensayos de laboratorio.

Generalmente las dosis de los compuestos activos, es decir, primer y segundo compuesto, en la composición farmacéutica según la invención comprenderá entre 0,01 μmoles de los compuestos por kilogramo del peso corporal del paciente a 100 μmoles del compuesto por kilogramo del peso corporal del paciente.

50 La composición farmacéutica de la invención puede comprender así un compuesto de Fórmula I, en particular DPDP o sus equivalentes desfosforilados DPMP y PLED, que representa un método para tratar diversas enfermedades de cáncer, solas o en combinación con otros fármacos citostáticos o radioterapia.

Donde el segundo compuesto transporta una carga total puede usarse de forma conveniente en forma de una sal con un contraión fisiológicamente aceptable, por ejemplo un catión amonio, amonio sustituido, metal alcalino o metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio) o un anión que deriva de un ácido orgánico o inorgánico. A este respecto, las sales de meglumina se prefieren particularmente.

- 5 Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden formularse con auxiliares de formulación farmacéutica o veterinaria convencionales, por ejemplo estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste de osmolalidad, agentes edulcorantes, etc.

10 Como se describe anteriormente la invención proporciona un compuesto de Fórmula I como se define anteriormente para el uso en el tratamiento del cáncer. Cuando los actuales inventores compararon MnDPDP y DPDP encontraron de forma sorprendente que DPDP era más eficaz que MnDPDP en su capacidad para matar células cancerígenas y concluyeron que la capacidad para matar células cancerígenas descrita anteriormente de MnDPDP es una propiedad inherente de DPDP. La invención proporciona así un nuevo compuesto para el uso en el tratamiento de cáncer mientras se evita el problema de toxicidad relacionada con la liberación de manganeso.

15 El compuesto puede usarse también, como se menciona anteriormente, en combinación con un segundo compuesto que tiene capacidad cito-protectora. En una realización de la invención se describe el uso de un quelato metálico que comprende el compuesto de Fórmula I como el compuesto que tiene la capacidad cito-protectora. Este quelato metálico se encuentra sorprendentemente que es mucho más estable que MnDPDP y el problema de la liberación de metal se evita por tanto. Una combinación de fármacos adecuada para el tratamiento del cáncer se presenta así.

20 La estabilidad de MnDPDP después de la administración en el hombre está gobernada según la técnica anterior principalmente por las constantes de estabilidad entre DPDP y Mn^{2+} y otros metales competidores, principalmente Zn^{2+} sin actividad redox que tiene mayor afinidad por DPDP que Mn^{2+} (Rocklage et al., Inorg Chem 1989; 28:477-485 y Toft et al., Acta Radiol 1997; 38:677-689). Después de inyección intravenosa en el hombre, además de la disociación de Mn^{2+} , los dos fosfatos se hidrolizan de DPDP, dando lugar a PLED. Poco después de la inyección intravenosa aproximadamente el 30% del MnDPDP inyectado se transforma en MnPLED, y según la técnica anterior (Toft et al., 1997) Mn^{2+} se disociará también de PLED, de hecho más fácilmente que de DPDP. Dicho comportamiento de MnPLED está altamente soportado por las constantes de estabilidad presentadas en la bibliografía (Rocklage et al., 1989).

25 Sin embargo, la reinterpretación de resultados publicados anteriormente puede sugerir de hecho que MnPLED es mucho más estable que MnDPDP (en relación con la estabilidad del metal) durante condiciones in vivo. Si los datos de concentración en plasma humano tomados a partir del estudio por Toft et al. 1997 se recalculan, se ve que la desaparición de MnDPDP y sus 5 metabolitos del plasma van aproximadamente paralelos a los de MnPLED entre 30 y 60 minutos (después de la fase de distribución inicial). Todos estos compuestos se eliminan del cuerpo a través de la excreción renal, y si el manganeso se disocia de MnPLED se esperaría que estos dos procedimientos divergieran durante ese periodo de tiempo. Este descubrimiento puede sugerir que MnPLED es estable durante las condiciones in vivo.

30 Tomando las constantes de estabilidad presentadas para Mn^{2+} y Fe^{3+} en consideración, los resultados en el Ejemplo 3 soportan adicionalmente bastante claramente la sugerencia paradójica de que MnPLED es mucho más estable que MnDPDP cuando sucede la disociación de Mn^{2+} . Además puede anticiparse a partir de los datos farmacocinéticos que las células y tejidos diana no estarán expuestos a concentraciones mayores que 5 μM de MnPLED, es decir, concentraciones donde MnPLED se espera que sea estable.

35 La presente invención muestra que MnPLED es mucho más estable que MnDPDP, y lo más importante, usando MnPLED en vez de su sustancia madre MnDPDP, puede ser posible eludir el serio problema toxicológico del manganeso evidente en el uso terapéutico frecuente en el hombre.

45 Debería enfatizarse además que el pretratamiento con MnPLED en ratones ha mostrado ser aproximadamente 100 veces más eficaz que MnDPDP (documentos EP0910360 y US6147094). Esto sugiere que la dosis de MnPLED podría disminuirse considerablemente en comparación con MnDPDP, lo que reduciría más el potencial toxicológico de la composición farmacéutica, y aumentaría por tanto más el índice terapéutico. Además, una dosis menor de MnPLED (3 $\mu moles/kg$) que el empleado en la formación de imágenes diagnósticas mejoradas por MnDPDP (5-10 $\mu moles/kg$) se ha mostrado que reduce el tamaño del infarto en cerdos (Karlsson et al., Acta Radiol 2001; 42:540-547), y dosis incluso mucho menores se ha demostrado que son efectivas en el mismo modelo animal (datos no publicados).

50 De forma interesante, MnDPDP no redujo el tamaño del infarto en cerdos. Esto es debido presumiblemente a una sustitución mucho más rápida de manganeso por zinc en cerdos en comparación con el hombre. Diez minutos después de la inyección de MnDPDP todo el manganeso se ha sustituido con zinc (Karlsson et al., 2001), lo que difiere del hombre (y alguna otra especie investigada) donde aproximadamente el 30% del manganeso inyectado permanece unido al quelador durante una considerable cantidad de tiempo. Como se menciona anteriormente, la protección de células normales, en este caso células de miocardio, es dependiente del manganeso con actividad redox. Según la técnica anterior (Rocklage et al., 1989), la constante de estabilidad entre Mn^{2+} y DPDP es 15,10

(logK), mientras que la constante de estabilidad entre Zn^{2+} y DPDP es 18,95, es decir, Mn^{2+} disocia aproximadamente 1000 veces más fácilmente que Zn^{2+} del DPDP. Las correspondientes constantes de estabilidad entre Mn^{2+} y PLED y Zn^{2+} y PLED son 12,56 y 16,68, respectivamente, es decir, Mn^{2+} una vez más disocia aproximadamente 1000 veces más fácilmente que Zn^{2+} . A partir de esto y el esquema metabólico publicado (Toft et al., 1997) no se esperaría ninguna gran diferencia en estabilidad entre MnDPDP y MnPLED, con respecto al intercambio de manganeso por zinc, después de la administración en cerdos. La reducción de infarto mencionado anteriormente vista después de la administración de MnPLED, aunque no después de MnDPDP, es por tanto un descubrimiento paradójico. Sin embargo, la presente invención como se ejemplifica en el Ejemplo de Patente 3 consigue una explicación razonable a la paradoja, a saber que MnPLED es un complejo más estable que MnDPDP, y lo más importante, resuelve los problemas toxicológicos de inestabilidad del manganeso.

Una ventaja de combinar la actividad anti-cancerígena de DPDP con la actividad cito-protectora de MnPLED con respecto a las células y tejidos normales puede ejemplificarse mediante el problema de usar dexrazoxano como un agente cardioprotector frente a la cardiotoxicidad inducida por antraciclina. Aunque dista de ser evidente, el dexrazoxano no está recomendado al principio de la terapia con antraciclina en pacientes con cáncer de mama metastático por la posibilidad de reducir el efecto anti-cancerígeno de las antraciclinas (Yeh et al., Circulation 2004; 109:3122-3132). Sin embargo, como se ha demostrado para MnDPDP por los actuales inventores y otros, los datos preclínicos muestran bastante claramente que no es un problema cuando llega a nuestra aproximación. Una explicación concebible a esto es las dos actividades distintas e inherentes de MnDPDP, a saber su actividad anti-cancerígena y su actividad citoprotectora, y que en nuestra invención se ha separado adicionalmente en dos entidades químicas distintas, a saber DPDP, que posee la actividad anti-cancerígena, y MnPLED, que posee la actividad citoprotectora en células y tejidos normales.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. Ensayo MTT en células SW480 de cáncer de colon humano en ausencia (control) y presencia de MnDPDP, DPDP, oxaliplatino o DPDP + oxaliplatino (media±DE; n=3).
- Figura 2. Ensayo MTT en células J774 de linfoma de murina en ausencia (control) y presencia de MnDPDP, DPDP, oxaliplatino o DPDP + oxaliplatino (media±DE; n=3).
- Figura 3. El efecto citostático de concentración creciente de oxaliplatino en células SW620, HCT-8 y hTERT-RPE1 (A). El efecto citostático de una baja concentración de oxaliplatino solo o en combinación con MnDPDP o DPDP en células SW620 (B), HCT-8 (C), hTERT-RPE1 (D) (media±DE; n=3).
- Figura 4. El ensayo de Fenton en presencia de diversas concentraciones de DPDP, MnDPDP y MnPLED (media±DE; n=3).
- (A) Los controles se hicieron marchar en paralelo y al final de los experimentos (media±DE; n=3).
- (B) Los controles también incluyeron ausencia de hierro (-Fe), presencia del quelador de hierro desferrioxamina (DFO 15 μ M) o el barredor de radical hidroxilo DMSO (10% de DMSO) (media±DE; n=3).

Ejemplos

La invención se demostrará ahora adicionalmente y se describirá mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos deberían entenderse solo para ejemplificar la invención y la invención no debería estar limitada por ellos.

Ejemplo 1

La actividad citostática de DPDP y MnDPDP se comparó co-incubando células de cáncer de colon humanas (SW480) y células de linfoma de murina (J774) con MnDPDP, DPDP y/u oxaliplatino.

Método

La viabilidad de las células se midió usando el ensayo MTT. Brevemente, 20.000 células SW480 o J774 se sembraron por pocillo en un plato de 96 pocillos y se cultivaron toda la noche en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin a 37°C en aire humidificado con CO₂ al 5%. Las células se expusieron entonces durante 24 h a MnDPDP 50 μ M, DPDP 50 μ M u oxaliplatino 10 μ M a 37°C. El efecto de combinar DPDP 50 μ M con oxaliplatino 10 μ M en la viabilidad también se ensayó. La viabilidad de células se evaluó entonces añadiendo 5 mg/ml de metiltiazolotetrazolio (MTT) a una concentración final de 0,5 mg/ml e incubando las células durante unas 4 h más a 37°C. El formazano azul que se forma por deshidrogenasas mitocondriales de células viables se disolvió entonces durante la noche a 37°C añadiendo SDS al 10% y HCl 10 mM a una concentración final de SDS al 5% y HCl 5 mM. Finalmente, la absorbancia de la disolución se leyó a 570 nm con una referencia a 670 nm en un lector de microplato Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) conectado a un ordenador Apple Macintosh que ejecuta el programa Softmax Pro V1.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Resultados

La actividad citostática de DPDP 50 μM fue significativamente más eficaz estadísticamente que la de MnDPDP 50 μM en células SW480 de colon humano (ensayo t no pareado) (Figura 1). Hubo una tendencia, aunque no significativa estadísticamente ($p < 0,07$), que DPDP en combinación con oxaliplatino era más potente que el oxaliplatino solo en las células SW480. La actividad citostática correspondiente de MnDPDP 50 μM y DPDP 50 μM en células J774 de linfoma de murina se presenta en la Figura 2, y como es obvio a partir de esta figura, DPDP fue significativamente más eficaz para matar las células de linfoma que MnDPDP. Además, DPDP en combinación con oxaliplatino fue significativamente más eficaz que oxaliplatino solo.

Conclusión

Cuando MnDPDP y DPDP se compararon se encontró sorprendentemente que DPDP era más eficaz que MnDPDP en su capacidad para matar células cancerígenas, y se concluye que la capacidad para matar células cancerígenas descrita anteriormente de MnDPDP es una propiedad inherente del DPDP.

Ejemplo 2

La actividad citostática de MnDPDP o DPDP en ausencia y presencia de oxaliplatino se ensayó en células de adenocarcinoma humano (SW620), células de adenocarcinoma colorrectal ileocecal humano y células inmortales de telomerasa de epitelio de retina normales (hTERT-RPE1).

Método

Se cultivaron células HCT-8 en medio RPMI 1640 con piruvato sódico (1 mM) y suero de caballo al 10%. Se cultivaron SW620 en medio L-15 de Leibovitz formulado con ATCC con suero bovino fetal al 10%. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía dióxido de carbono al 5%. Las células se cosecharon en la fase log para uso experimental. El ensayo de citotoxicidad por microcultivo fluorométrico (FMCA) se usó para investigar la actividad citostática del oxaliplatino, MnDPDP o DPDP y combinaciones de los mismos. FMCA se basa en la medida de la fluorescencia generada a partir de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) a fluoresceína por células con membranas plasmáticas intactas. Brevemente, se prepararon recientemente platos de microvaloración de 96 pocillos con disoluciones de fármaco por triplicado a 10 veces las concentraciones de fármaco deseadas. Las suspensiones celulares se sembraron en los platos preparados con fármaco con 20.000 células por pocillo y los platos se incubaron después durante 72 h. Después de la incubación, los platos se lavaron, se añadió FDA, y después de 50 min de incubación se midió la fluorescencia generada (excitación 480 nm) a 538 nm en un fluorímetro (Fluorostar Optima, BMG Technologies). La fluorescencia es proporcional al número de células con membrana plasmática intacta presentes en el pocillo.

Resultados

La actividad citostática de concentraciones crecientes de oxaliplatino en células cancerígenas (SW620 y HCT-8) y células normales (hTERT-RPE1) se presenta en la Figura 3A. El oxaliplatino demostró un efecto citostático dependiente de las concentraciones en ambas líneas de células cancerígenas pero solo un ligero efecto a su máxima concentración en células normales. Ni MnDPDP ni DPDP demostraron ningún efecto citostático en ninguna de estas células (no se muestra). Sin embargo, DPDP 100 μM pero no MnDPDP potenció significativamente (ensayo t no pareado) los efectos citostáticos de una baja concentración (8 μM) de oxaliplatino en ambas líneas de células cancerígenas aunque no en las células normales (Figura 3B-D).

Conclusión

Cuando MnDPDP y DPDP se compararon se encontró sorprendentemente que DPDP era mucho más eficaz que MnDPDP en su capacidad para aumentar la capacidad para matar el cáncer de oxaliplatino, y se concluye que la capacidad para matar células cancerígenas descrita anteriormente de MnDPDP es una propiedad inherente del DPDP.

Ejemplo 3

Permitiendo que el quelador DPDP, los complejos metálicos MnDPDP y MnPLED compitan con el hierro en el ensayo de Fenton, se comparó la estabilidad de MnDPDP y MnPLED.

Método

El hierro férrico (10 μM) se redujo parcialmente a su forma ferrosa mediante cisteína (100 μM) en tampón de acetato 150 mM. Se añadió H_2O_2 (100 μM) para iniciar la producción de radicales hidroxilo (HO^\bullet). El último oxida H_2DCF (2',7'-diclorodihidrofluoresceína no fluorescente; 5 μM) a DCF fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína). H_2DCF se obtuvo hidrolizando su éster de acetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$). Se usaron DMSO (10%) y DFO (10 μM) para demostrar la formación de HO^\bullet y la implicación de hierro respectivamente. Se ensayaron DPDP, MnDPDP y MnPLED a diversas

concentraciones por su capacidad quelante del hierro. La fluorescencia se midió en un lector de Fluorescencia de Microplato FL600 (Bio-Tek, Winooski, VT, U.S.A.) a ex 485 nm y em 530 nm.

Resultados

- 5 La Figura 4 demuestra que DPDP inhibió la reacción de Fenton de una manera dependiente de la dosis; la inhibición comenzó a 0,1 μM y se completó a 10 μM . El patrón inhibitor está de acuerdo con la alta afinidad presentada de DPDP para hierro férrico ($\log K=33,52$). Sin embargo, en el caso de MnPLED no fue evidente la inhibición hasta e incluyendo una concentración de 5 μM aunque a 10 μM la inhibición se completó. La capacidad quelante del hierro de MnDPDP fue significativamente mayor que la del MnPLED.

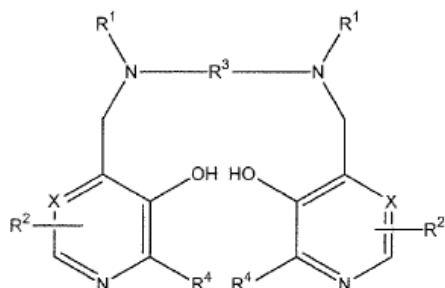
Conclusión

- 10 Los presentes resultados están en contra de y altamente sorprendente con lo que se esperaría de la capacidad quelante tanto del hierro como del manganeso presentada de MnDPDP y MnPLED. Las constantes de estabilidad presentadas entre Fe^{3+} y DPDP y entre Fe^{3+} y PLED son 33,52 y 36,88 ($\log K$), respectivamente, mientras las constantes de estabilidad presentadas entre Mn^{2+} y DPDP y Mn^{2+} y PLED son 15,10 y 12,56, respectivamente (Rocklage et al., 1989). Se esperaría por tanto que MnPLED fuera un inhibidor mucho mejor de la reacción de Fenton que MnDPDP.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I,

I:



5 para usar como un compuesto con capacidad para matar células cancerígenas en el tratamiento de cáncer, en donde

X representa CH o N,

cada R¹ representa independientemente hidrógeno o $-\text{CH}_2\text{COR}^5$;

R⁵ representa hidroxilo, opcionalmente alcoxi hidroxilado, amino o alquilamido;

10 cada R² representa independientemente un grupo ZYR⁶; Z representa un enlace, o un grupo alquileo u oxoalquileo C₁₋₃ opcionalmente sustituido por un grupo R⁷;

Y representa un enlace, un átomo de oxígeno o un grupo NR⁶;

15 R⁶ es un átomo de hidrógeno, un grupo COOR⁸, un grupo alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo o aralquilo opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de COOR⁸, CONR⁸₂, NR⁸₂, OR⁸, =NR⁸, =O, OP(O)(OR⁸)R⁷ y OSO₃M;

R⁷ es hidroxilo, un grupo alquilo o aminoalquilo opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;

R⁸ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;

M es un átomo de hidrógeno;

20 R³ representa un grupo alquileo C₁₋₈, un grupo 1,2-cicloalquileo, o un grupo 1,2-arileno, opcionalmente sustituido con R⁷; y

cada R⁴ representa independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 para usar según la reivindicación 1, en donde R⁵ es hidroxilo, alcoxi C₁₋₈, etilenglicol, glicerol, amino o alquil C₁₋₈ amido;

Z es un enlace o un grupo seleccionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO y CH₂COCH₂;

25 Y es un enlace;

R⁶ es un grupo alquilo mono o poli(hidroxilo o alcoxilado) o un grupo de la fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷; y R⁷ es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2 para usar según la reivindicación 1 o 2, en donde R³ es etileno y cada grupo R¹ representa $-\text{CH}_2\text{COR}^5$ en que R⁵ es hidroxilo.

30 4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto es ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético.

35 6. Una composición farmacéutica que comprende un primer compuesto de Fórmula I como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un segundo compuesto que tiene una capacidad cito-protectora.

7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde el segundo compuesto es un quelato metálico o una sal de dicho quelato metálico que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 5 8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, en donde dicho quelato metálico tiene un valor K_a en el intervalo de 10^8 a 10^{24} .
9. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en donde dicho quelato metálico tiene un valor K_a inferior que el valor K_a de un quelato de hierro (Fe^{3+}) que comprende un compuesto de Fórmula I como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, por un factor de al menos 10^3 .
- 10 10. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el metal es manganeso (Mn^{2+} o Mn^{3+}) o cobre (Cu^+ o Cu^{2+}).
11. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde el primer compuesto es ácido N,N'-dipiridoxiletildiamina-N,N'-diacético y el segundo compuesto es un quelato metálico que comprende ácido N,N'-dipiridoxiletildiamina-N,N'-diacético.
- 15 12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde el primer compuesto es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético y el segundo compuesto es un quelato metálico que comprende ácido N,N'-dipiridoxil-etildiamina-N,N'-diacético.
13. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde el metal es manganeso (Mn^{2+} o Mn^{3+}).
- 20 14. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-13, para usar como un medicamento para el tratamiento del cáncer.
15. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-14, para usar como un medicamento en el tratamiento de cáncer en donde la composición farmacéutica se administra junto con uno o más fármacos anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, epirubicina, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, gemcitabina, irinotecano y metotrexato.

FIG 1

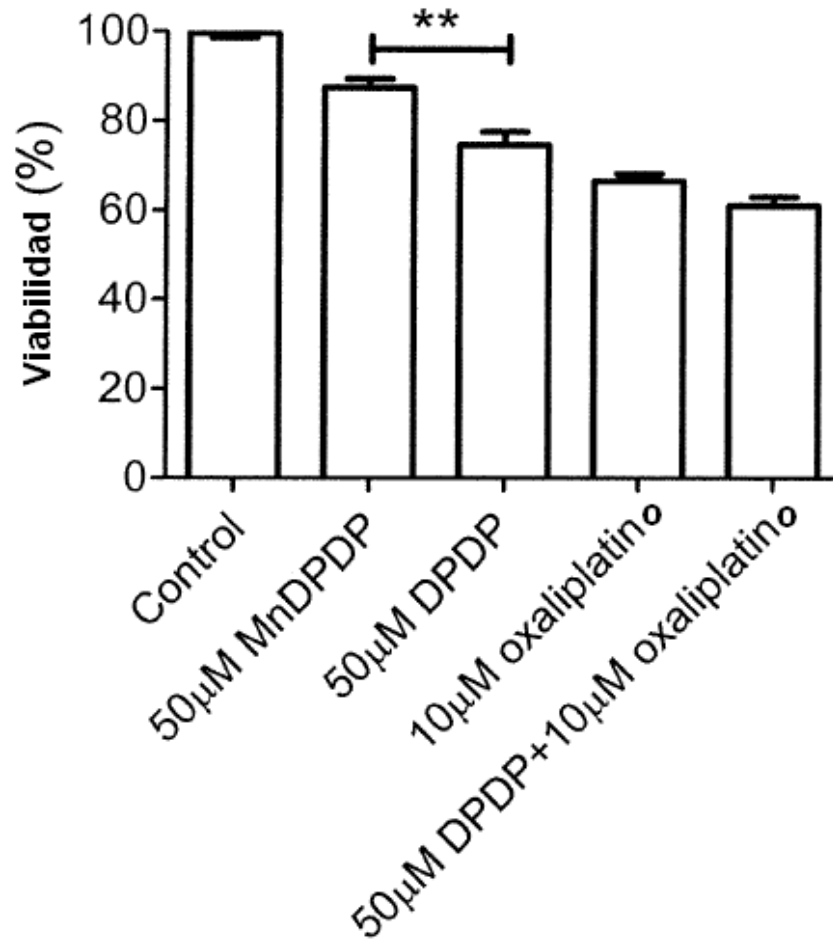


FIG 2

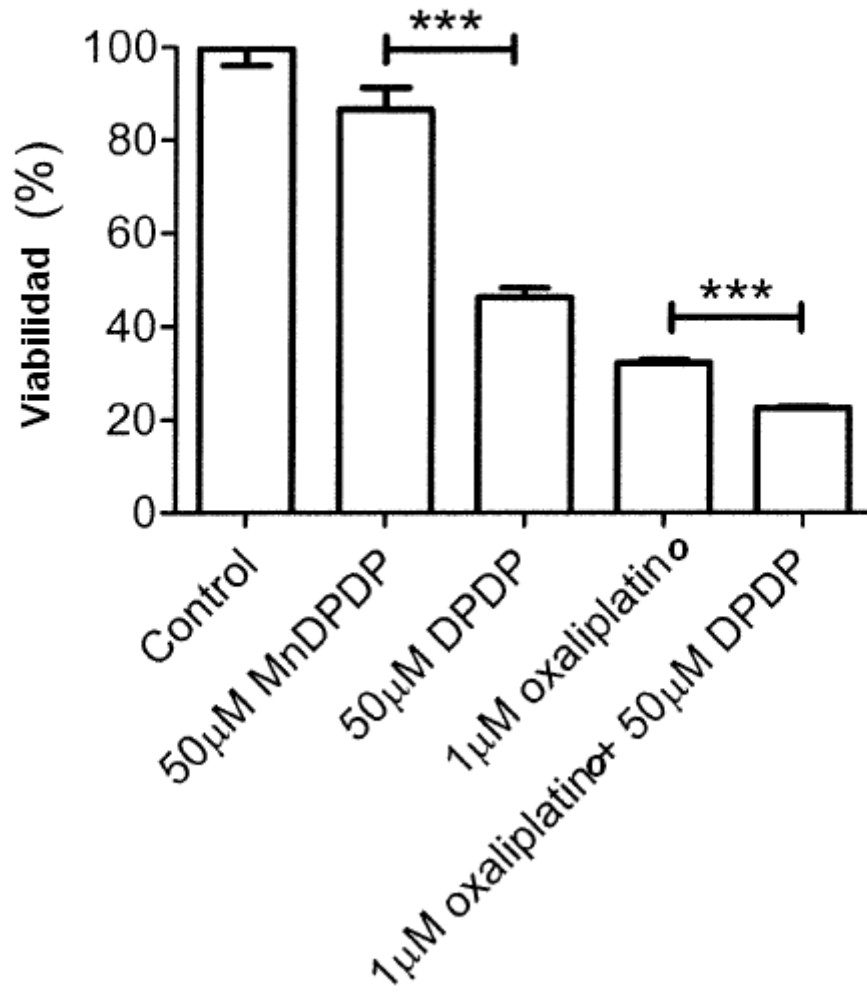


FIG 3

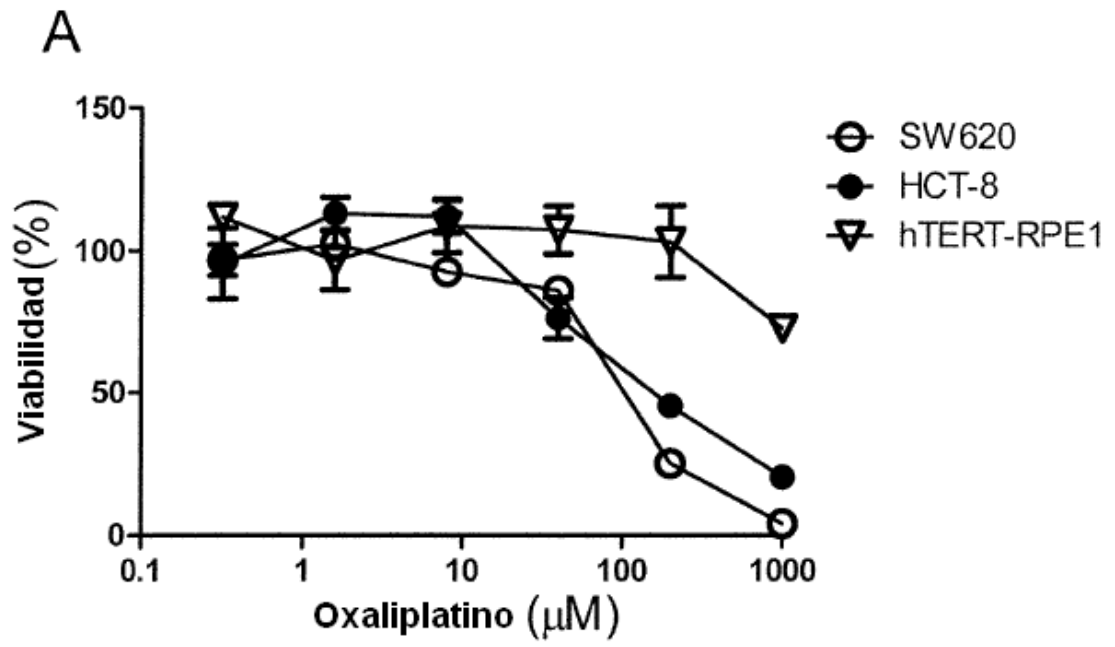


FIG 3

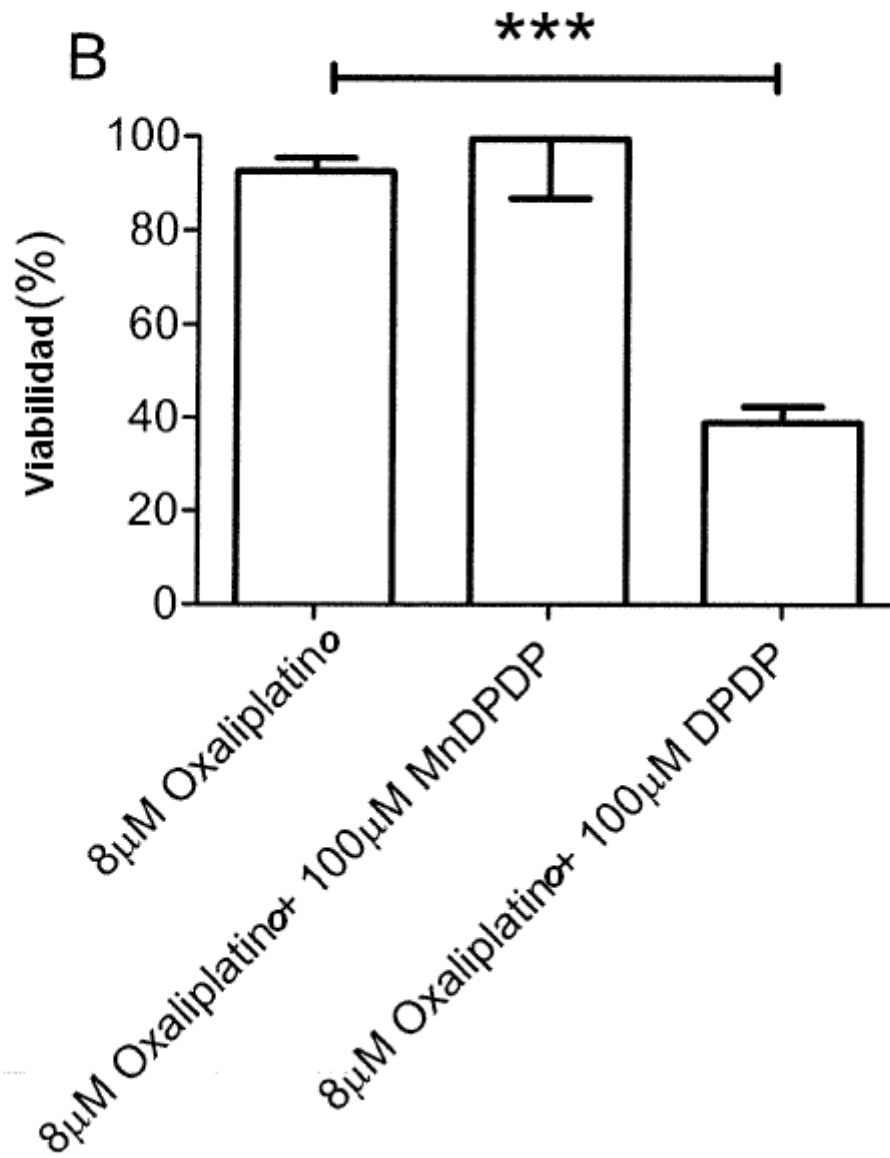


FIG 3

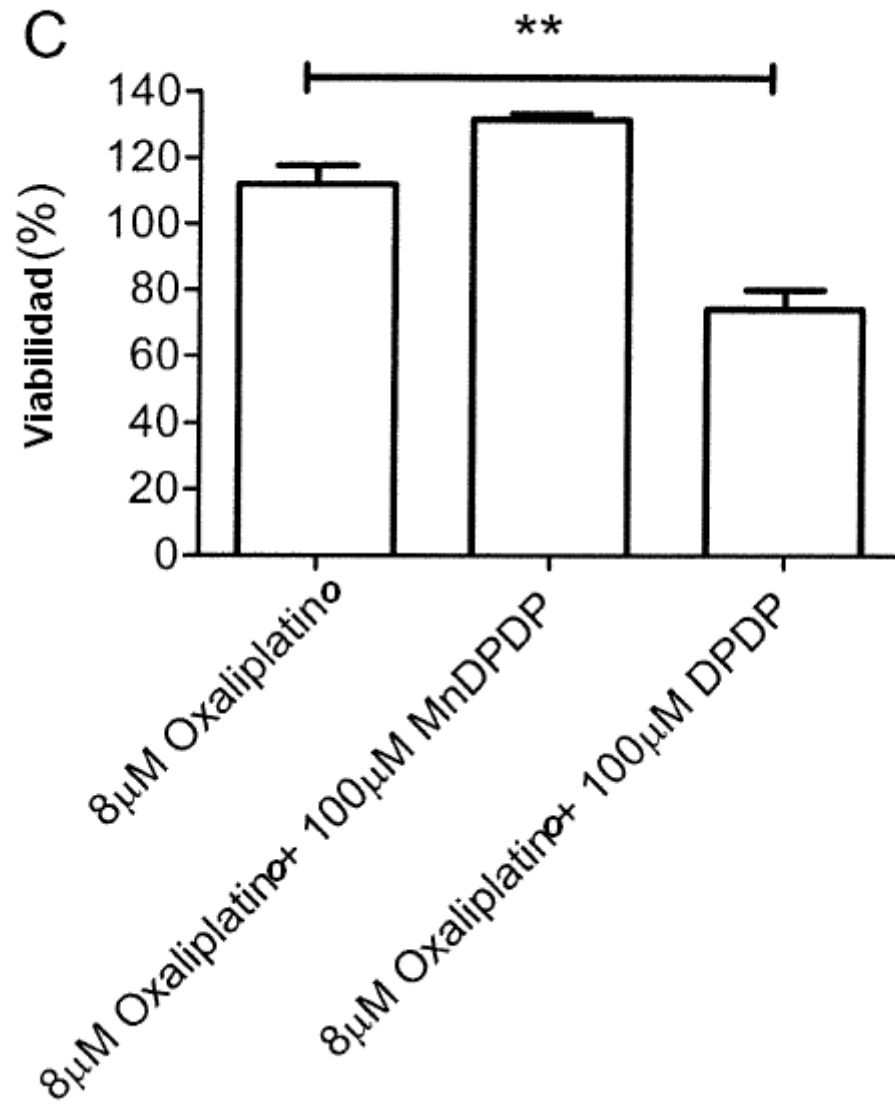


FIG 3

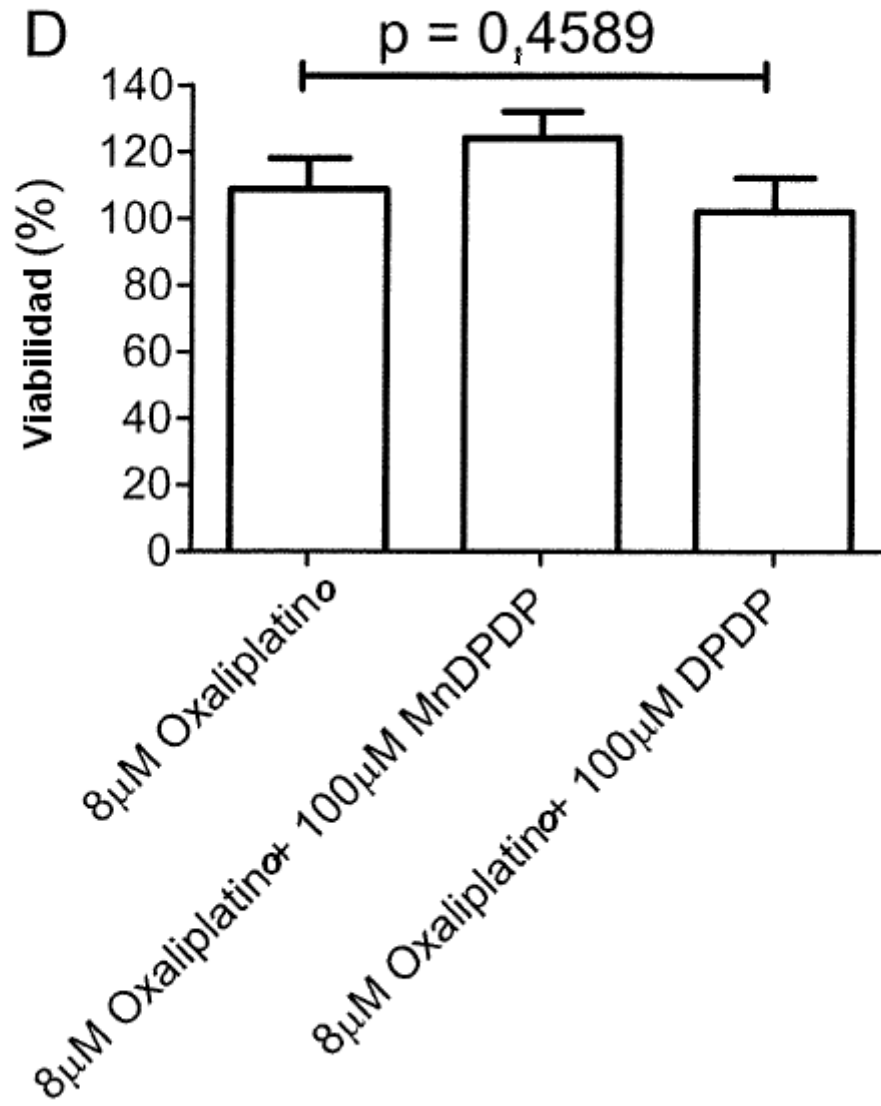


FIG. 4

