

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 855**

51 Int. Cl.:

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2011 PCT/US2011/038948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO2011153365**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2011 E 11726567 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2575802**

54 Título: **Fosfaplatinos y su uso para el tratamiento de cánceres**

30 Prioridad:

04.06.2010 US 351514 P

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

28.03.2017

73 Titular/es:

**OHIO UNIVERSITY (100.0%)
340 West State Street Unit 14
Athens, OH 45701, US**

72 Inventor/es:

BOSE, RATHINDRA, N.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fosfaplatinos y su uso para el tratamiento de cánceres

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere en general a complejos de pirofosfato de platino; a métodos de síntesis de los complejos proporcionados; a composiciones que comprenden los complejos proporcionados; y a métodos de tratamiento de enfermedades proliferativas usando los complejos proporcionados, comprendiendo las composiciones los complejos proporcionados o combinaciones de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 En el año 2008, alrededor de 12 millones de personas en el mundo fueron diagnosticadas de cáncer y alrededor de 7 millones de personas murieron de cáncer. De hecho, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo desarrollado y la segunda causa principal de muerte en países en desarrollo (solo después del VIH/SIDA). Una vez que se ha diagnosticado el cáncer, el pronóstico del paciente depende en gran medida de factores tales como si el cáncer se diagnosticó en una etapa temprana, si el cáncer se extendió por el cuerpo, y si el cáncer es o se ha hecho resistente a regímenes quimioterapéuticos conocidos.

15 Los fármacos antineoplásicos basados en platino, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, se usan ampliamente para el tratamiento de una variedad de cánceres tales como cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de pulmón microcítico y cáncer colorrectal. Estos compuestos se pueden usar en combinación con otros regímenes terapéuticos, que incluyen terapia con radiación, para tratar una serie extensa de cánceres. Actualmente, alrededor de 600 ensayos clínicos de modos terapéuticos adyuvantes que usan compuestos de platino acentúan el potencial
20 de los compuestos de platino para tratar de forma eficaz una amplia variedad de cánceres. Por ejemplo, el reciente avance de la investigación sugiere que un fármaco diabético, la rosiglitazona, se puede usar eficazmente en combinación con carboplatino para tratar múltiples formas de cáncer. Esto ha añadido ahora una nueva dimensión a las aplicaciones cada vez mayores de los fármacos antineoplásicos basados en platino, porque la mayoría de las terapias adyuvantes se han limitado principalmente a combinaciones de fármacos para el cáncer o radiación con
25 otros fármacos para el cáncer. Por lo tanto, hay una necesidad continua de nuevos fármacos antineoplásicos basados en platino, así como de nuevas aplicaciones para los fármacos antineoplásicos basados en platino.

Los compuestos quimioterapéuticos de platino convencionales tales como el cisplatino inician la apoptosis en la fase G2 del ciclo celular, predominantemente por procesos de inhibición de la transcripción e inhibición de la replicación, en especial con dosis altas. Se cree que la unión covalente al ADN a través de sitios N7 de las bases guanina y
30 adenina, tanto por modos intracadena como intercadena, es el suceso molecular clave que produce la cascada de respuestas celulares que conducen a la apoptosis (muerte celular programada). Se han identificado numerosos retos en la comprensión de la complejidad de la metalobioquímica celular y molecular del cisplatino y los mecanismos moleculares de la citotoxicidad. Brevemente, se ha observado que el ADN "platinado" está en el centro del inicio de la citotoxicidad. El ADN unido a platino es secuestrado por proteínas de alta movilidad (HMG) de someterse a
35 reparaciones por las enzimas de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Además, estos aductos de platino-ADN se cree que activan el factor de transcripción p53, para inducir la fosforilación de histona y producir la condensación de cromatina.

Aunque los compuestos quimioterapéuticos basados en platino se usan ampliamente para tratar cánceres, su aplicación en un gran número de pacientes se ha limitado debido a graves efectos secundarios tales como
40 nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, mielosupresión y resistencia adquirida a fármacos de metal platino. Por ejemplo, un porcentaje significativo de pacientes se vuelven resistentes al tratamiento con cisplatino. Aunque el carboplatino reduce algo la toxicidad frente al cisplatino, no alivia la resistencia. Actualmente, el oxaliplatino está aprobado para tratar el cáncer colorrectal, pero su resistencia está muy inexplorada.

No se entiende en la técnica a nivel molecular el desarrollo de la resistencia a compuestos quimioterapéuticos basados en platino convencionales y las formas de superar dicha resistencia. Aunque la comprensión es incompleta, se cree que la capacidad para reparar el daño del ADN por escisión del platino unido del ADN, contribuye principalmente a mecanismos de resistencia. Otros mecanismos implicados en la contribución a la resistencia incluyen, menores acumulaciones intracelulares de cisplatino debido a la menor captación ligada con la regulación por disminución de la expresión de la proteína de transporte de cobre, CTR1; mayor flujo externo debido al exceso de expresión de cMOAT, ATP7A y ATP7B; regulación por disminución alterada de los genes proapoptóticos y
50 regulación por aumento de genes antiapoptóticos. Por otra parte, la regulación por aumento de la proteína CTR1 se ha conectado con la mayor toxicidad. La alteración de las MAPK y la desactivación del platino por el glutatión y otras moléculas pequeñas y proteínas, en especial la metalotioneína, también se han postulado como factores que contribuyen a la resistencia a los fármacos de platino. A la luz de lo anteriormente mencionado, son necesarias
55 formas de superar la resistencia a los fármacos de platino, incluyendo el desarrollo de fármacos que no sean susceptibles a los mecanismos de reparación del ADN.

En varias realizaciones, la patente de EE.UU. n° 7.700.649 (Bose) y de EE.UU. n° de serie 12/722.189 (Bose) cubren algunas de las necesidades de la técnica describiendo rutas sintéticas y métodos de tratamiento del cáncer

que implican una nueva clase de complejos de platino, en concreto complejos de pirofosfato que tienen centros de metal de platino (II) o platino (IV). Los compuestos y métodos descritos son parte de una estrategia de desarrollo de fármacos basada en la creación de una clase de agentes antitumorales de platino que no se unen de forma covalente al ADN, anulando, por lo tanto, la resistencia basada en la reparación del ADN. Esta estrategia es un cambio de paradigma de los enfoques de desarrollo de fármacos de platino convencionales, en los que la unión del ADN es el tema central en el desarrollo de agentes antineoplásicos de platino más eficaces.

Entre los complejos de pirofosfato de platino descritos en la patente de EE.UU. nº 7.700.649 (Bose) y de EE.UU. nº de serie 12/722.189 (Bose) están el trans-(±)-1,2-ciclohexanodiamina(pirofosfato)platino(II) racémico y el trans-(±)-1,2-ciclohexanodiamina-trans-dihidroxo(pirofosfato)platino(IV) racémico. Aunque se ha encontrado que estos complejos racémicos son eficaces para tratamientos de algunos cánceres, todavía son necesarios estrategias mejoradas de desarrollo de fármacos, incluyendo, pero no limitado a que mejoren la eficacia de los productos terapéuticos de pirofosfato de platino, reduzcan las toxicidades de dichos productos terapéuticos, e inhiban el crecimiento de células de cáncer mejorando el direccionamiento de genes implicados en matar células de cáncer.

Compendio de la invención

En diferentes realizaciones, la presente solicitud satisface las necesidades anteriores describiendo una estrategia de desarrollo de fármaco basada en complejos de pirofosfato de platino monomérico enantioméricamente puro y enantioméricamente enriquecido. Por lo tanto, la presente invención proporciona las formas más eficaces de complejos de pirofosfato de platino. La presente descripción también identifica genes diana implicados en matar células y en inhibir el crecimiento de células de cáncer. Los complejos proporcionados son estables, muestran citotoxicidad potenciada y mayor eficacia que los agentes antineoplásicos convencionales. Esta estrategia de desarrollo de fármacos también es un cambio de paradigma de las estrategias de desarrollo de fármacos de platino convencionales, en donde la unión de ADN sigue siendo el tema central.

La presente invención proporciona complejos de fosfaplatino, complejos de fosfaplatino para usar y composiciones para usar, todos como se definen en las reivindicaciones.

Entre las diferentes realizaciones, la presente solicitud proporciona complejos de ((*cis* o *trans*)-1,2-ciclohexanodiamina)(dihidrogenopirofosfato)platino (II) y ((*cis* o *trans*)-1,2-ciclohexanodiamina)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) monoméricos, aislados, en donde los complejos son enantioméricamente puros o comprenden un exceso enantiomérico del complejo basado en la *cis*-1,2-ciclohexanodiamina o uno de los dos complejos basados en *trans*-1,2-ciclohexanodiamina distinguibles. Por lo tanto, la presente invención como se define en las reivindicaciones proporciona complejos de platino (II) y platino (IV) seleccionados de (i) ((1*R*,2*R*)-1,2-ciclohexanodiamina)(dihidrogenopirofosfato)platino (II) (denominado en la presente memoria "(1*R*,2*R*)-pyrodach-2"); (ii) ((1*S*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina)(dihidrogenopirofosfato)platino (II) (denominado en la presente memoria "(1*S*,2*S*)-pyrodach-2"); (iii) ((1*R*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina)(dihidrogenopirofosfato)platino (II) o ((1*S*,2*R*)-1,2-ciclohexanodiamina)(dihidrogenopirofosfato)platino (II) (que son compuestos imágenes especulares superponibles y se denominan colectivamente en la presente memoria "*cis*-pyrodach-2"); (iv) ((1*R*,2*R*)-1,2-ciclohexanodiamina)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) (denominado en la presente memoria "(1*R*,2*R*)-pyrodach-4"); (v) ((1*S*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) (denominado en la presente memoria "(1*S*,2*S*)-pyrodach-4"); y (vi) ((1*R*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) o ((1*S*,2*R*)-1,2-ciclohexanodiamina)-*trans*-dihidroxo(dihidrogenopirofosfato)platino (IV) (que son compuestos imágenes especulares superponibles y se denominan colectivamente en la presente memoria "*cis*-pyrodach-4"); así como las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de (i)-(vi). En relación con los grupos amino en el ligando 1,2-ciclohexanodiamina, en los compuestos (i), (ii), (iv), y (v), las estereoquímicas (1*R*,2*R*) y (1*S*,2*S*) representan grupos amino en configuraciones *trans*, mientras que en los compuestos (iii) y (vi) las estereoquímicas (1*R*,2*S*) y (1*S*,2*R*) representan grupos amino en configuraciones *cis*.

La presente invención proporciona además, en algunas realizaciones, como se define en las reivindicaciones, composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los complejos proporcionados y al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable tal como un excipiente, diluyente, adyuvante o vehículo.

En otras realizaciones más, la presente invención proporciona medios, como se define en las reivindicaciones, para tratar una o más enfermedades proliferativas, administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno o más de los complejos proporcionados.

Breve descripción de las figuras

Aunque la memoria descriptiva concluye con las reivindicaciones que indican en particular y reivindican claramente la invención, se cree que la presente invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos que acompañan, en los que:

La figura 1 muestra los espectros de dicroísmo circular de los estereoisómeros (I) (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, (II) (1*S*,2*S*)-pyrodach-2, (III) *cis*-pyrodach-2, (IV) (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, (V) (1*S*,2*S*)-pyrodach-4, (VI) *cis*-pyrodach-4, y *trans*-(±)-

pyrodach-2;

La figura 2 representa actividades de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, (1*S*,2*S*)-pyrodach-2, y *trans*-(±)-pyrodach-2 determinadas a partir de ensayos clonogénicos exponiendo células de cáncer de ovario humano (A2780) a diferentes concentraciones de compuestos durante 24 horas;

- 5 La figura 3 representa actividades de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, (1*S*,2*S*)-pyrodach-2, y *trans*-(±)-pyrodach-2 determinadas a partir de ensayos clonogénicos exponiendo células de cáncer de ovario humano resistentes a cisplatino (OVCAR-10) a diferentes concentraciones de compuestos durante 24 horas;

10 La figura 4 es una gráfica del tamaño tumoral medio a lo largo de un periodo de seis semanas durante la administración de fosfaplatinos de acuerdo con realizaciones descritas en la presente memoria, en células de cáncer de ovario humano en ratones;

La figura 5 muestra eficacias de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, descrito en detalle más adelante, contra células de cáncer de ovario humano resistentes a cisplatino (OVCAR-10);

15 La figura 6 muestra gráficas del tamaño tumoral a lo largo del tiempo, comparando un control (PBS/Bic) administrado en días alternos durante tres días ("días alternosx3"), carboplatino con una dosis de 60 mg/kg (administrado días alternosx3) y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 con una dosis de 40 mg/kg [administrado una vez al día durante tres días consecutivos ("diariox3")]; y

La figura 7 muestra eficacias de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 [administrado días alternosx3 y una vez al día durante cuatro días consecutivos ("diariox4")] y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 (administrado diariox4), descrito con detalle más adelante, frente a cáncer de cabeza y cuello humano (UMSCC10b).

20 Descripción detallada de la invención

Ahora se describirán realizaciones específicas de la presente descripción. Sin embargo, la invención se puede llevar a cabo de diferentes formas y no debe considerarse limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción será minuciosa y completa, y transmitirá el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

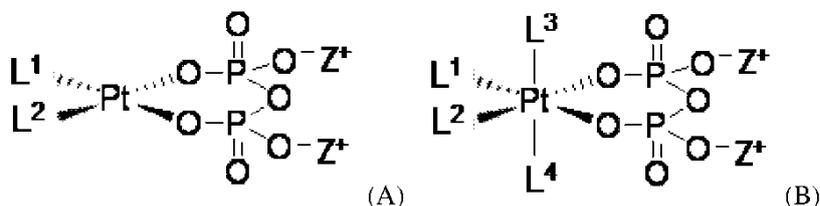
25 Salvo que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología usada en la descripción de la invención de la presente memoria es solo para describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante de la invención. Como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el", "la", se pretende que incluyan las formas plurales también, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

30 Hay que indicar que términos como "preferiblemente", "habitualmente" y "típicamente" no se usan en la presente memoria para limitar el alcance de la invención reivindicada o implicar que algunas características son críticas, esenciales o incluso importantes para la estructura o función de la invención reivindicada. Más bien, se pretende que estos términos destaquen características alternativas o adicionales que se pueden usar o no en una realización particular de la presente invención.

35 El término "sustancialmente" se usa en la presente memoria para representar el grado inherente de incertidumbre que se puede atribuir a cualquier comparación, valor, medición u otra representación cuantitativa. El término "sustancialmente" se usa en la presente memoria también para representar el grado con el que una representación cuantitativa puede variar desde una referencia establecida sin que produzca un cambio en la función básica de la materia objeto en cuestión. Como tal, se usa para representar el grado inherente de incertidumbre que se puede atribuir a cualquier comparación, valor, medición u otra representación cuantitativa, que se refiere a una disposición de los elementos o características que, aunque en teoría se esperaría que presentaran correspondencia o comportamiento exacto, en la práctica pueden representar algo menos del exacto.

45 Salvo que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., como se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse que están modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente" que se pretende que signifique hasta ±10% de un valor indicado. Además, la descripción de cualesquiera intervalos en la memoria descriptiva y reivindicaciones, debe entenderse que incluye el propio intervalo y también cualquiera incluido en el mismo, así como los extremos. Salvo que se indique otra cosa, las propiedades numéricas expuestas en la memoria descriptiva y reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener en realizaciones de la presente invención. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se dan de la forma tan precisa como es posible. Sin embargo, cualesquiera valores numéricos contienen de forma inherente algunos errores que resultan necesariamente del error encontrado en las respectivas mediciones.

Como se usa en la presente memoria, el término "fosfaplatino" se refiere en general a complejos de platino coordinados con un solo ligando pirofosfato bidentado. Los fosfaplatinos de acuerdo con realizaciones descritas en la presente memoria, pueden tener las siguientes estructuras generales (A) y (B):



- 5 en las que L^1 y L^2 representan ligandos neutros (independientemente seleccionados de NH_3 ; aminas alifáticas sustituidas o no sustituidas; y aminas aromáticas sustituidas y no sustituidas) o un solo ligando neutro bidentado (seleccionado de diaminas alifáticas o aromáticas sustituidas o no sustituidas) con grupos finales L^1 y L^2 , coordinados al centro metálico de platino; L^3 y L^4 son ligandos (seleccionados de hidróxido, ácido acético, ácido butírico y alfa-hidroxiácidos, aminas o especies cargadas de las mismas) coordinados al centro metálico de platino. El ligando pirofosfato puede ser neutro (no se muestra) o cargado (mostrado). Cuando está cargado, el ligando pirofosfato está presente con contraiones, representados por Z^+ . Los ejemplos de Z^+ incluyen, sin limitación, hidrógeno; metales alcalinos tales como sodio y potasio; y restos orgánicos monovalentes. Preferiblemente, Z^+ es un contraión que da como resultado una sal farmacéuticamente aceptable. Se cargada o neutra, la estructura general de los complejos de platino (II) representados por (A) es plana cuadrada, y la estructura de los complejos de platino (IV) representada por (B) es octaédrica.

En general, los fosfaplatinos no sufren fácilmente hidrólisis, son solubles en solución acuosa a pH neutro, y son estables en solución acuosa a pH neutro. Además, los fosfaplatinos muestran citotoxicidad general en líneas celulares de cáncer, y son eficaces en líneas celulares que son resistentes a uno de o tanto al cisplatino como al carboplatino. Por consiguiente, los fosfaplatinos son eficaces, y en algunos casos más eficaces, en la inducción de la muerte de células de cáncer, comparados con fármacos de platino para el cáncer conocidos, y presentan estabilidad y solubilidad deseables en soluciones que son adecuadas para la administración a pacientes. Como se usa en la presente memoria, en referencia a los fosfaplatinos de la invención, "estable" se refiere a la resistencia de los complejos a la hidrólisis cuando se mantienen en solución acuosa a un pH en el intervalo de 6-8, durante un periodo de tiempo entre 2 y 6 días.

A diferencia del cisplatino, carboplatino y agentes antineoplásicos basados en platino relacionados, los fosfaplatinos no se unen de forma covalente al ADN. Se cree que la resistencia al cisplatino, carboplatino y agentes antineoplásicos de platino relacionados, se origina de la reparación eficaz del daño al ADN por una variedad de enzimas que incluyen enzimas de reparación por escisión nuclear. Sin embargo, debido a que los fosfaplatinos no se unen de forma covalente al ADN, no es probable la resistencia hacia los fosfaplatinos debido al mecanismo de reparación del ADN. Los datos sugieren que los fosfaplatinos producen exceso de expresión de fas y factores de transcripción relacionados con fas, algunos genes proapoptóticos tales como Bak y Bax, y genes de supresión tumoral tales como PUMA y PTEN. Además, los fosfaplatinos regulan por disminución BCL2, un gen antiapoptótico. Los experimentos de transferencia Western que se ocupan de las expresiones de proteínas transcritas por estos genes, muestran la tendencia paralela. Además, la unión celular de los fosfaplatinos es menor que la del cisplatino, aunque los fosfaplatinos presentan citotoxicidad alta. Por lo tanto, la presente invención proporciona agentes antineoplásicos de platino eficaces que tienen un objetivo molecular diferente de los de la técnica.

La expresión "exceso enantiomérico" se usa en la presente memoria de acuerdo con su definición entendida habitualmente. Es decir, para dos enantiómeros A y B que pueden estar presentes en una mezcla en cantidades molares M_A y M_B , respectivamente, el exceso enantiomérico E del enantiómero presente en una cantidad molar mayor en la mezcla se puede expresar por la relación $\%E = |M_A - M_B| / (M_A + M_B) \times 100$, donde $E > 0\%$. Una "mezcla racémica" de los enantiómeros A y B, que se puede designar por las abreviaturas "rac" y/o "(±)" (o simplemente carece de cualquier referencia a enantiómeros) tiene $E = 0\%$ porque $M_A = M_B$. Como ilustración adicional, una mezcla que consta de A y B, en la que $M_A = 60\%$ y $M_B = 40\%$, tiene un exceso enantiomérico de A igual a 20%. La misma mezcla se puede considerar de forma alternativa como una mezcla que consiste en 80% de mezcla racémica de A y B en combinación con 10% de enantiómero puro A, ya que cada molécula de B (40% de la mezcla) se puede emparejar con una molécula de A en la mezcla (40% de la mezcla) para dejar desemparejado un exceso de moléculas de A (20% de la mezcla).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enantioméricamente puro" con respecto a una molécula que tiene dos enantiómeros, A y B, se refiere a un compuesto o composición que contiene sustancialmente uno de los enantiómeros A o B, pero no tanto A como B. Para un complejo de "enantiómero puro", $97\% \leq E \leq 100\%$.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enantioméricamente enriquecido" se refiere, en su sentido más amplio, a un compuesto o composición que contiene una molécula que tiene dos enantiómeros, A y B, de modo que el compuesto o composición tiene un exceso enantiomérico de uno de los enantiómeros, sea A o B. Por lo tanto, una "mezcla de A y B enantioméricamente enriquecida" puede referirse a una mezcla con un exceso enantiomérico de A

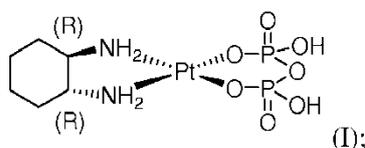
o a una mezcla con un exceso enantiomérico de B, en donde $0\% < E \leq 100\%$ bien para A o B. Como ejemplos ilustrativos, el exceso enantiomérico de cualquiera de A o B puede ser mayor que 0,01 %, mayor que 1%, mayor que 10%, mayor que 25%, mayor que 50%, mayor que 75%, mayor que 90%, mayor que 98%, mayor que 99%, mayor que 99,9%, o incluso igual a 100%.

5 En diferentes realizaciones, se proporcionan en la presente memoria complejos de fosfaplatino monomérico estables (y composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de dichos complejos). En algunas realizaciones, dichos complejos y composiciones se pueden usar en métodos de tratamiento de cánceres, que incluyen, pero no se limitan a cánceres resistentes al tratamiento con uno o más de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

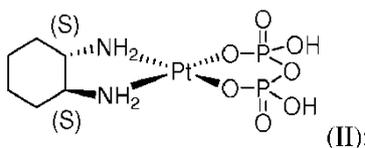
10 Complejos

En las diferentes realizaciones, se proporcionan complejos de fosfaplatino seleccionados del grupo que consiste en:

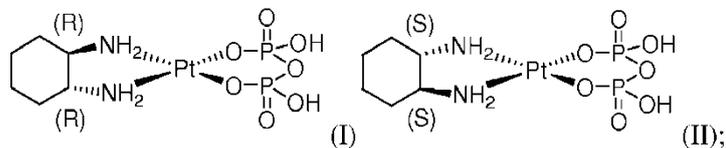
(i) (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (I);



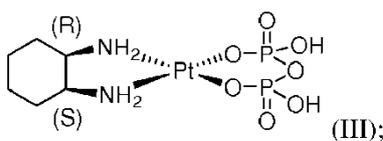
(ii) (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (II);



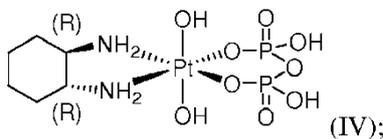
15 (iii) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (I) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-2, que tiene la fórmula (II);



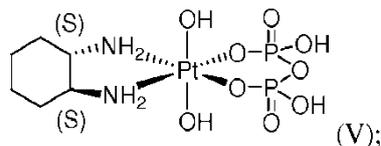
(iv) *cis*-pyrodach-2 que tiene la fórmula (III);



20 (v) (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (IV);

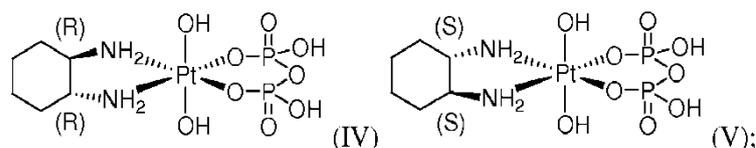


(vi) (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (V);

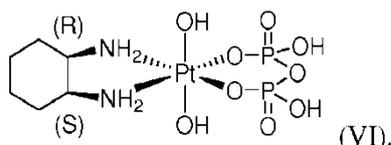


25

(vii) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (IV) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (V); y



(viii) *cis*-pyrodach-4 que tiene la fórmula (VI)



5

En los complejos de acuerdo con las fórmulas (I)-(VI), la notación abreviada "pyrodach" se refiere a un complejo de 1,2-ciclohexanodiamina(pirofosfato)platino (donde "pyro" se refiere al ligando bidentado pirofosfato y "dach" se refiere al ligando bidentado 1,2-ciclohexanodiamina (nombrado según convenio de la IUPAC), conocido también como 1,2-diaminociclohexano. La notación (1*R*,2*R*), (1*S*,2*S*), o *cis* delante del término "pyrodach" se refiere a la configuración estereoquímica de los centros quirales en la posición 1 y la posición 2 del ligando 1,2-ciclohexanodiamina. El número (es decir, 2 o 4) después de la notación "pyrodach" se refiere al estado de oxidación del centro de platino. Es decir, "pyrodach-2" se refiere a un complejo de platino (II), y "pyrodach-4" se refiere a un complejo de platino (IV).

10

Los fosfaplatinatos de fórmula (I)-(VI), con el platino coordinado a los ligandos pirofosfato y 1,2-ciclohexanodiamina, pueden existir como cuatro estereoisómeros debido a la posible geometría *cis* y *trans* de los dos grupos amino (-NH₂) de los centros de carbono quirales 1 y 2 del ligando diamina. Estos estereoisómeros presentan las configuraciones (1*R*,2*R*), (1*S*,2*S*), (1*R*,2*S*) y (1*S*,2*R*). El ligando *trans*, *trans*-1,2-ciclohexanodiamina, da dos enantiómeros, que tienen las configuraciones (1*R*,2*R*) y (1*S*,2*S*), respectivamente. El isómero *cis* en principio abarca los enantiómeros (1*R*,2*S*) y (1*S*,2*R*), pero estos dos isómeros *cis* son imágenes especulares superponibles, equivalentes, indistinguibles entre sí estructural y químicamente. Por lo tanto, los dos enantiómeros del isómero *cis* se denominarán simplemente en lo sucesivo "isómero *cis*" y se representan con una sola fórmula.

15

20

La mezcla de pyrodach-2 enantioméricamente enriquecida (iii) y la mezcla de pyrodach-4 enantioméricamente enriquecida (vii) se caracterizan ambas por un exceso enantiomérico mayor que cero bien del enantiómero (1*R*,2*R*) o del enantiómero (1*S*,2*S*). El exceso enantiomérico puede variar y en realizaciones de ejemplo puede ser mayor de 0,01%, mayor de 1%, mayor de 10%, mayor de 25%, mayor de 50%, mayor de 75%, mayor de 90%, mayor de 98%, mayor de 99%, mayor de 99,9%, o incluso igual a 100%. En realizaciones de ejemplo, el exceso enantiomérico es del enantiómero (1*R*,2*R*), por ejemplo, un exceso enantiomérico del enantiómero (1*R*,2*R*) mayor de 90%. En realizaciones adicionales de ejemplo, el exceso enantiomérico es del enantiómero (1*S*,2*S*), por ejemplo, un exceso enantiomérico del enantiómero (1*R*,2*R*) mayor de 90%. En otras realizaciones adicionales más de ejemplo, la mezcla de pyrodach-2 enantioméricamente enriquecida (i) y/o la mezcla de pyrodach-4 enantioméricamente enriquecida (ii) son enantioméricamente puras bien en el enantiómero (1*R*,2*R*) o el enantiómero (1*S*,2*S*).

25

30

En datos comparativos presentados en la presente memoria entre los complejos enantioméricamente puros de acuerdo con las fórmulas (I), (II), (IV) y (V) y las mezclas racémicas correspondientes descritas en la patente de EE.UU. n° 7.700.649, en lo sucesivo una mezcla racémica de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 se designará con la notación abreviada "*trans*-(±)-pyrodach-2." Igualmente, una mezcla racémica de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 y (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 se designará "*trans*-(±)-pyrodach-4."

35

Como un ejemplo no limitante, los compuestos de fórmulas (I)-(VI) se pueden sintetizar a partir de un material de partida tal como *cis*-(1,2-ciclohexanodiamina)dichloroplatino(II), que se puede preparar por conversión del K₂PtCl₄ en K₂PtI₄ por la adición de yoduro potásico. Después el K₂PtI₄ se puede hacer reaccionar con una 1,2-ciclohexanodiamina que tiene una estereoquímica deseada, tal como *cis*-1,2-ciclohexanodiamina, *trans*-(1*R*,2*R*)-1,2-ciclohexanodiamina, *trans*-(1*S*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina, o mezclas de los mismos. Los complejos de (1,2-ciclohexanodiamina)diiodoplatino(II) resultantes, después se pueden transformar en los correspondientes complejos de (1,2-ciclohexanodiamina)diacuaplatino(II) in situ por adición de dos equivalentes de nitrato de plata. Después las especies de diacua [Pt(1,2-ciclohexanodiamina)(H₂O)₂] se pueden convertir en los complejos de *cis*-dichloro[Pt(1,2-ciclohexanodiamina)Cl₂] por adición de cloruro potásico.

45

Se entenderá que se pueden usar otras condiciones de reacción adecuadas. En ejemplos no limitantes, los complejos de 1,2-ciclohexanodiamina-platino(II) iniciales se hicieron reaccionar con pirofosfato en exceso y la temperatura puede ser de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C, o cualquier intervalo más estrecho preferido entre 35°C y 45°C. Se han obtenido buenos resultados a 40°C. En algunos ejemplos, la reacción se puede dejar que avance de aproximadamente 13 horas a aproximadamente 16 horas, o cualquier intervalo más estrecho

50

preferido entre 13 horas y 16 horas. Se han obtenido buenos resultados con tiempos de reacción de 15 horas. En algunos ejemplos, el pH puede ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, y de aproximadamente 8 a aproximadamente 9. Se han obtenido buenos resultados a pH de aproximadamente 8.

- 5 La mezcla de reacción acuosa se puede concentrar de manera que no se formen precipitados de pirofosfato. Se entenderá que la mezcla de reacción acuosa se puede concentrar de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la mezcla de reacción acuosa se puede concentrar por evaporación en rotavapor.

10 Inmediatamente después, el pH de la mezcla de reacción se puede disminuir rápidamente a un pH de menos de 2 por adición de un ácido adecuado. En algunos ejemplos, se puede usar ácido nítrico para disminuir el pH. En algunas realizaciones, el pH está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2. Se han obtenido buenos resultados a pH de 1.

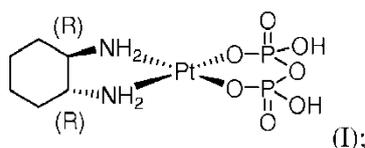
15 En algunos ejemplos, la mezcla de reacción se puede enfriar a una temperatura de entre 5°C y temperatura ambiente (25°C ± 2°C) después de concentrar la mezcla de reacción. En otros ejemplos, el método también incluye enfriar la mezcla de reacción a una temperatura de entre 5°C y temperatura ambiente después de disminuir el pH de la mezcla de reacción.

20 Para preparar los complejos de platino (IV) de acuerdo con las fórmulas (II) y (V), son necesarias etapas adicionales para unir los ligando hidroxilo. Por lo tanto, además de las etapas descritas antes, se puede añadir a la mezcla de reacción peróxido de hidrógeno, y opcionalmente un reactivo seleccionado del grupo de sales de acetato, sales de butirato y sales de alfa-hidroxi-ácidos, después de mantener la mezcla de reacción a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C, durante un periodo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas, a una pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. El reactivo opcional que se puede añadir junto con peróxido de hidrógeno antes de concentrar la mezcla de reacción, se puede seleccionar de acetato sódico, butirato sódico, aminas y sales de sodio de alfa-hidroxi-ácidos. En otros ejemplos, el reactivo opcional añadido junto con peróxido de hidrógeno antes de concentrar la mezcla de reacción, se puede seleccionar de acetato potásico, butirato potásico, cualquier amina monodentada tal como amoniaco, isopropilamina, y otras, y sales de potasio de los alfa-hidroxi-ácidos.

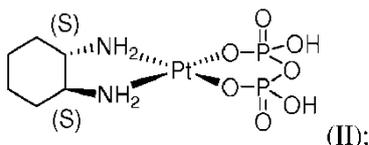
Composiciones

30 En algunas de las diferentes realizaciones, se proporcionan adicionalmente composiciones que comprende uno o más de: (a) un complejo de fosfaplatino proporcionado; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de (a); y (c) un solvato farmacéuticamente aceptable de (a). Dichas composiciones pueden comprender además al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable seleccionado de excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos, que se refiere en general a cargas sólidas o líquidas, diluyentes o materiales de encapsulación inertes, no tóxicos, que no son reactivos con los fosfaplatinos. Estos tipos de aditivos son bien conocidos en la técnica y se describen además más adelante en relación con los métodos de tratamiento. De acuerdo con las diferentes realizaciones, una composición proporcionada comprende uno o más de:

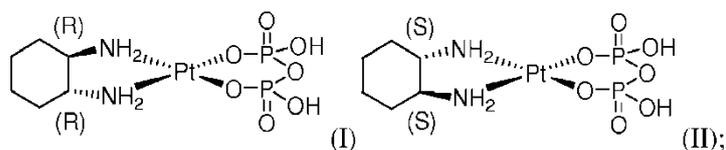
- (i) (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (I), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;



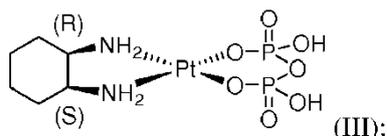
- 40 (ii) (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (II), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;



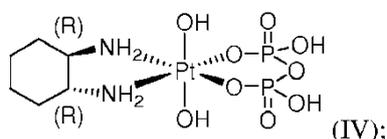
(iii) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido que tiene un exceso enantiomérico bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (I) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (II), o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;



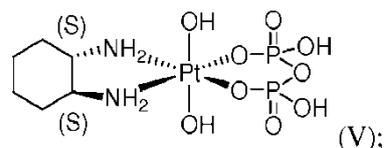
5 (iv) *cis*-pyrodach-2 que tiene la fórmula (III), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;



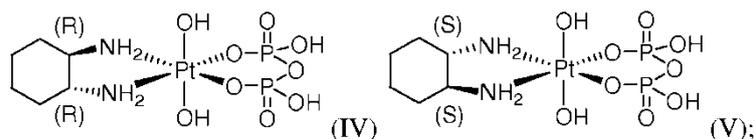
(v) (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (IV), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;



10 (vi) (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (V), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;

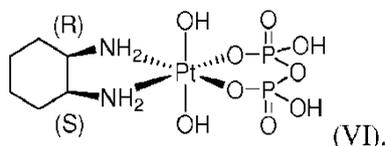


15 (vii) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido que tiene un exceso enantiomérico bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (IV) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (V), o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;



y

(viii) *cis*-pyrodach-4 que tiene la fórmula (VI), o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable;



20 En algunas realizaciones, una composición proporcionada comprende un complejo (o su sal o solvato farmacéuticamente aceptable) que tiene una fórmula de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (I)-(VI). En algunas realizaciones, una composición proporcionada es una mezcla de múltiples complejos de al menos dos complejos (o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables) que tienen las fórmulas de acuerdo con cualquiera de las fórmulas (I)-(VI). La mezcla de múltiples complejos puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis
 25 compuestos de acuerdo con las formulas (I)-(VI), con la condición de que la mezcla de múltiples complejos no sea una mezcla racémica pura de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 o una mezcla racémica pura de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 y (1*S*,2*S*)-pyrodach-4.

Métodos contemplados

En otras realizaciones más, los complejos, composiciones, o ambos, descritos anteriormente se pueden usar solos, o con otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, en métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos proliferativos (de forma colectiva "enfermedades"). Los métodos proporcionados comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo o composición descritos anteriormente. El sujeto puede ser un animal, tal como, por ejemplo, un mamífero, incluyendo un ser humano. Las enfermedades proliferativas contempladas que se pueden tratar en seres humanos incluyen cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico y cánceres de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer glioblastoma. En algunas realizaciones, está contemplado que los complejos y/o composiciones se pueden usar en terapias de combinación que implican el tratamiento simultáneo o secuencial con fármacos de metal platino, tales como cisplatino, carboplatino y/o oxaliplatino. Está contemplado además que los complejos y/o composiciones se pueden usar para tratar cánceres resistentes al tratamiento con uno o más de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y/o se pueden usar en combinación con otras clases de tratamiento, que incluyen antimicóticos tales como taxanos, análogos de nucleósidos tales como gemcitabina, antibióticos de antraciclina tales como doxorubicina, o terapias dirigidas tales como anticuerpos monoclonales.

Como se describe en la presente memoria, los complejos de fórmula (I)-(VI) han mostrado ser tan eficaces como, o más eficaces que el cisplatino y carboplatino, proporcionando así un método de tratamiento del cáncer para pacientes que previamente carecían de alternativas al tratamiento con cisplatino y carboplatino. Sin embargo, no es necesario que un paciente haya sido tratado previamente con cisplatino o carboplatino para ser tratado con los complejos proporcionados, composiciones y métodos descritos en la presente memoria. La administración del tratamiento se puede llevar a cabo en un hospital u otra instalación médica por personal médico.

Los complejos de fórmulas (I)-(VI) se pueden administrar y dosificar de acuerdo con una buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección clínica del paciente individual, el sitio y método de administración, el régimen de administración, edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad terapéutica farmacéuticamente eficaz" para los fines de la presente memoria está determinada, por lo tanto, por dichas consideraciones como se conoce en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para lograr mejora que incluye, pero no se limita, a mejora tasa de supervivencia o recuperación más rápida, o mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores seleccionados como medidas adecuadas por los expertos en la técnica. Está contemplado que los complejos de la presente invención se pueden administrar a animales, que incluyen mamíferos y seres humanos, solos o como composiciones. Además, está contemplado que los complejos de fórmulas (I)-(VI) se pueden administrar a lo largo de una ventana terapéutica especialmente amplia. Como un ejemplo ilustrativo, está contemplado que se pueden administrar uno o más complejos proporcionados, en una o más dosis de 5 mg/kg a 50 mg/kg; alternativamente de 10 mg/kg a 50 mg/kg; alternativamente de 20 mg/kg a 50 mg/kg; alternativamente de 30 mg/kg a 50 mg/kg; alternativamente de 40 mg/kg a 50 mg/kg; alternativamente de 45 mg/kg a 50 mg/kg. Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que las dosis terapéuticas pueden variar para el complejo administrado, composición administrada y sujeto que recibe el complejo o composición administrados. Por lo tanto, también están contempladas dosis terapéuticas mayores de 50 mg/kg, así como dosis terapéuticas menores de 5 mg/kg. Las dosis pueden ser dosis individuales o múltiples dosis a lo largo de un periodo de varios días. Como un ejemplo ilustrativo, está contemplado que los complejos de fórmulas (I)-(VI) se pueden administrar en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis en uno o más días. Está contemplado que los complejos se puede administrar de forma continua a lo largo de uno o más días, tal como mediante una bomba o goteo. Como otro ejemplo ilustrativo está contemplado que los complejos se pueden administrar durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días.

En un método de tratamiento, los complejos de fórmulas (I)-(VI) se pueden administrar de varias formas. Debe indicarse que se pueden administrar como el complejo y se pueden administrar solos en solución acuosa aprovechando la excelente solubilidad de estos complejos, o como un principio activo en combinación con excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Está contemplado que los complejos se pueden administrar por vía oral, subcutánea o parenteral que incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intramigdalina, e intranasal, así como técnicas intratecales y de infusión. También pueden ser útiles los implantes de los complejos.

Cuando los complejos de fórmula (I)-(VI) se administran por vía parenteral, en general se formularán en una forma inyectable de dosis unitaria (p. ej., solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales.

Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. También se pueden usar vehículos no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas de disolventes para las composiciones. Además, se pueden añadir diferentes

aditivos que potencial la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelación y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede llevar a cabo mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado debería ser compatible con los complejos de fosfaplatino.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por incorporación de complejos de fosfaplatino en la cantidad requerida del disolvente adecuado, con uno o más de los otros ingredientes, según se desee.

Una formulación farmacológica que comprende los fosfaplatinos se puede administrar a un paciente en una formulación inyectable que contenga cualquier excipiente compatible, tal como diferentes vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o los complejos de fosfaplatino se pueden administrar por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o de sistemas de suministro dirigido tales como anticuerpos monoclonales, suministro con vectores, iontoforético, matrices polímeras, liposomas y microesferas. Muchos de dichos implantes, sistemas de suministro y módulos son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Ejemplos

Las realizaciones descritas se entenderán mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y que un experto en la técnica reconocerá que no significa que sean limitantes.

Ejemplo 1

Síntesis de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 [fórmula (I)]

Como material de partida para formar un complejo de platino (II), se formó el *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) haciendo reaccionar K₂PtI₄ o, más preferiblemente K₂PtCl₄, respectivamente con (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina. El *cis*-diyodo-((1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) o, preferiblemente, el *cis*-dicloro-((1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) después se disolvió con pirofosfato sódico decahidrato en agua destilada, pH 8, y la mezcla resultante se incubó a 40°C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, la solución se concentró por evaporación en rotavapor, y se filtró para separar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápidamente a pH de aproximadamente 1,0 por adición de ácido nítrico 1 N, dio el producto precipitado. La precipitación se completó por enfriamiento a aproximadamente 0°C y el producto se aisló por filtración con vacío y se lavó con agua fría y acetona. La síntesis dio el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro.

Ejemplo 2

Síntesis de (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 [fórmula (II)]

El (1*S*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina(pirofosfato)platino(II) enantioméricamente puro, se preparó de una forma análoga al método descrito en el ejemplo de síntesis 1, excepto que se usó *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*S*,2*S*)-(+)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) como material de partida, en lugar del *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II), respectivamente. La síntesis dio el (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro.

Ejemplo 3

Síntesis de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 [fórmula (IV)]

El material de partida del ejemplo de síntesis 1, es decir, el *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) y pirofosfato sódico decahidrato, se disolvieron en agua destilada, pH 8, y la mezcla resultante se incubó a 40°C durante 15 horas. Después del periodo de incubación, se añadió una parte alícuota de H₂O₂ al 30% a la mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 3 horas adicionales. Después la solución se concentró por evaporación en rotavapor, y se filtró para separar cualquier material de partida sin reaccionar. La disminución rápidamente a pH de aproximadamente 1,0 por adición de ácido nítrico 1 N, dio el producto precipitado. La precipitación se completó por enfriamiento a aproximadamente 0°C y el producto se aisló por filtración con vacío y se lavó con agua fría y acetona. La síntesis dio el (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro.

Ejemplo 4

Síntesis de (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 [fórmula (V)]

El (1*S*,2*S*)-1,2-ciclohexanodiamina-*trans*-dihidroxo(pirofosfato)platino(IV) enantioméricamente puro, se preparó de una forma análoga al método descrito en el ejemplo de síntesis 3, excepto que se usó el material de partida del ejemplo de síntesis 2, es decir, el *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*S*,2*S*)-(+)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) en

lugar del *cis*-diyodo- o *cis*-dicloro-(*trans*-(1*R*,2*R*)-(-)-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II), respectivamente. La síntesis dio el (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro.

Ejemplo 5

Síntesis de *cis*-pyrodach-2 [fórmula (III)]

- 5 En un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de una barra agitadora, se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,400 g) en agua destilada (250 ml). El pH de la disolución después se ajustó después a 8,0 usando ácido nítrico 2 M. Después, la disolución se puso en un baño de agua a 40°C y se agitó con la barra agitadora. Después, se añadió a la disolución con agitación, *cis*-dicloro-(*cis*-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) (0,100 g, 0,26 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 15 horas, y después se evaporó el disolvente a 48°C con vacío hasta un volumen de 5 ml.
- 10 Después la mezcla se pasó por papel de filtro y la solución se recogió en un vial de 10 ml provisto de una barra agitadora. El vial se puso en un baño de hielo sobre una placa agitadora y con agitación suave se ajustó el pH desde uno inicial de 6,5 a 2,0 usando ácido nítrico 2 N. Una vez que se alcanzó el pH más bajo, se desarrolló lentamente un precipitado. La agitación se continuó durante 5 minutos adicionales, después de lo cual la suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media que se había mantenido en hielo antes de su uso.
- 15 Después, el sólido se lavó con agua fría (2 porciones de 5 ml) y acetona fría (2 porciones de 5 ml), y el filtro se dejó en un desecador durante la noche. Esto produjo un polvo amarillo claro (0,077 g, 0,16 mmol, 60% de rendimiento).

Ejemplo 6

Síntesis de *cis*-pyrodach-4 [fórmula (VI)]

- 20 En un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de una barra agitadora, se disolvió pirofosfato sódico decahidrato (0,400 g) en agua destilada (250 ml). El pH de la disolución se ajustó después a 8,0 usando ácido nítrico 2 M. Después, la disolución se puso en un baño de agua a 40°C y se agitó con la barra agitadora. Se añadió a la disolución con agitación, *cis*-dicloro-(*cis*-1,2-ciclohexanodiamina)platino(II) (0,100 g, 0,26 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 15 horas, se añadieron 3 ml de H₂O₂ al 30% (p/p), y se dieron tres horas adicionales de tiempo de reacción. Después, el disolvente se evaporó a 48°C con vacío hasta un volumen de 5 ml. Después la mezcla se
- 25 pasó a través de papel de filtro y la disolución se recogió en un vial de 10 ml provisto de una barra agitadora. El vial se puso en un baño de hielo sobre una placa agitadora y se agitó suavemente mientras se ajustaba el pH desde uno inicial de 6,5 a 2,5 usando ácido nítrico 2 N. Poco después de alcanzar el pH menor, se desarrolló lentamente un precipitado. La agitación se continuó durante 5 minutos adicionales, y después la suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media que se había mantenido en hielo antes de su uso. El sólido se lavó con
- 30 agua fría (2 porciones de 5 ml) y acetona fría (2 porciones de 5 ml), y el filtro se dejó en un desecador durante la noche. Esto produjo un polvo blanco (0,120 g, 0,23 mmol, 88% de rendimiento).

Ejemplo 7

Caracterizaciones de los fosfaplatinos

- 35 Todos los fosfaplatinos sintetizados de acuerdo con los ejemplos de síntesis anteriores, presentan una solubilidad mayor de 40 mmol/l en disolución acuosa a pH neutro, en PBS y tampón de bicarbonato. El (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, en particular, muestran una estabilidad notable a pH neutro en disolución acuosa. Típicamente, no se observa descomposición en el plazo de siete días después de disolver los compuestos de fosfaplatino en agua y observarlos por espectroscopía de RMN de ³¹P.

- 40 Los compuestos preparados de acuerdo con los ejemplos de síntesis anteriores se caracterizaron por espectroscopía de dicroísmo circular (CD) para verificar la configuración isomérica, y por RMN de ³¹P y espectrometría de masas para verificar la composición. Se llevó a cabo un espectro de CD adicional en una mezcla racémica de *trans*-(±)-pyrodach-2 preparada de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE.UU. n° 7.700.649.

- 45 Los espectros de CD se registraron en tampón de fosfato (50 mM) a pH 6,8. Las formas (1*R*,2*R*) y (1*S*,2*S*) tanto del pyrodach-2 como del pyrodach-4 mostraron actividades ópticas atribuibles a la quiralidad, pero la mezcla racémica (*trans*-(±)-pyrodach-2) y los isómeros *cis* tanto del pyrodach-2 como del pyrodach-4 no presentaron picos en CD.

Los espectros de CD se representan en la figura 1, en la que los números entre paréntesis se refieren al compuesto de la fórmula que corresponde al número en el paréntesis. Las concentraciones de los compuestos analizados eran: (I), 2,7 mM; (II), 2,5 mM; (III), 1,3 mM; (IV), 3,5 mM; (V), 2,9 mM; (VI), 2,7 mM; y *trans*-(±)-pyrodach-2, 3,5 mM.

50 Ejemplo 8

Ensayo de supervivencia celular y eficacia in vitro (ensayo clonogénico)

Para determinar las actividades relativas de los fosfaplatinos de fórmulas (I)-(VI), cada estereoisómero se ensayó por ensayos clonogénicos in vitro usando células de cáncer de ovario humano, células de cáncer de colon humano, y células de cáncer de cabeza y cuello humano. Las células de cáncer de ovario humano, A2780 y A2780/C30

(resistencia cruzada a cisplatino 30 μM y carboplatino 100 μM), se obtuvieron del Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). Las células se cultivaron en monocapa usando RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, insulina 0,25 unidades/ml, y penicilina/estreptomicina (100 unidades/ml) en un incubador a 37°C gasificado continuamente con CO₂ al 5%. Las células se subcultivaron usando tripsina al 0,0625% en HBSS para mantener las células en crecimiento celular exponencial.

Los valores de concentración inhibidora semimáxima (CI₅₀) se determinaron usando un ensayo clonogénico o un ensayo de proliferación celular CyQUANT®. En el ensayo clonogénico, por ejemplo, 500-700 células A2780 de una sola suspensión se pusieron en placas, en placas petri de 60 mm 24 horas antes del tratamiento con los compuestos de platino para permitir la unión. El día del tratamiento con los compuestos de platino descritos en los ejemplos de síntesis anteriores, el medio se decantó y se substituyó por la concentración adecuada de compuestos de fosfaplatino (de 50 nM a 75 μM) en tres puntos de tiempo diferentes, y las células tratadas se volvieron a poner en el incubador a 37°C durante 24 horas. Se asignaron placas por triplicado para cada concentración de compuesto de platino. Después de 24 horas de tratamiento, el medio que contenía los compuestos de platino se decantó y se substituyó por medio de nueva aportación. Estas placas se devolvieron al incubador a 37°C durante 7 días para la formación de colonias.

En el ensayo de proliferación celular de CyQUANT, los valores de CI₅₀ se determinaron midiendo el contenido de ADN usando un kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® (Invitrogen), que contiene un colorante fluorescente verde que presenta una fuerte intensidad de fluorescencia cuando se une a ADN celular. En estos experimentos, el número deseado de células se expuso a fosfaplatinos en diferentes concentraciones durante 72 h, antes de medir el contenido de ADN. Debido a que el contenido de ADN es proporcional al número de células que sobreviven, el ensayo proporciona una medida cuantitativa de las células que proliferan. La técnica se describe en detalle en Jones et al., "Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay," *J. Immunol. Methods*, vol. 254, pág. 85-98 (2001).

Los datos de CI₅₀ de ensayos clonogénicos y/o de ensayos de proliferación celular CyQUANT se resumen en las tablas 1-5. En las tablas 1-5, excepto cuando se dan los valores de error reales, cada valor dado se supone que tiene un error no mayor de $\pm 15\%$ del valor dado; y salvo que se especifique de otra forma, los datos se obtuvieron de ensayos clonogénicos.

Tabla 1: Valores de CI₅₀ para los compuestos de fosfaplatino en líneas celulares de cáncer de ovario humano: A2780, cáncer epitelial de ovario humano; y A2780/C30, cáncer epitelial de ovario humano resistente a cisplatino 30 μM y carboplatino 100 μM

Compuesto	CI ₅₀ (μM) para diferentes líneas celulares en diferentes tiempos de tratamiento					
	A2780			A2780/C30		
	1 hora	24 horas	7 días	1 hora	24 horas	7 días
(1R,2R)-pyrodach-2 (I)		1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1		6,3	1,1 \pm 0,1
(1S,2S)-pyrodach-2 (II)		1,1 \pm 0,1				
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-2 (comparativo)	22 \pm 4	2,4 \pm 0,2		48 \pm 5		
(1R,2R)-pyrodach-4 (IV)	45 \pm 5	13	4,9		11 \pm 2	11,7
(1S,2S)-pyrodach-4 (V)		5,2				
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-4 (comparativo)	170 \pm 20			155 \pm 20		
<i>cis</i> -pyrodach-2 (III)		0,3 \pm 0,05				
<i>cis</i> -pyrodach-4 (VI)		3,8				
cisplatino (comparativo)	7			100		
carboplatino (comparativo)	90			>200		

Tabla 2: Valores de CI_{50} para los compuestos de fosfaplatino en líneas celulares de cáncer de ovario humano: OVCAR-10, cáncer de ovario humano resistente a tratamiento con cisplatino; y OVCAR-5, células de cáncer de ovario humano avanzado

Compuesto	CI_{50} (μM) para diferentes líneas celulares de cáncer de ovario humano en diferentes tiempos de tratamiento			
	OVCAR-10		OVCAR-5	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-2 (I)	0,42			15,4
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-pyrodach-2 (II)		6,9		4,5
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-2 (comparativo)	4,6		12,2	
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-4 (IV)	10,2		19,8	
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-pyrodach-4 (V)				5,6
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-4 (comparativo)	14,4			
cisplatino (comparativo)	4,1			
carboplatino (comparativo)	26,7			

5 Tabla 3: Valores de CI_{50} para compuestos de fosfaplatino en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello humano: USMCC10b, línea celular de cáncer de cabeza y cuello humano; y UMSCC-10b/15s, línea celular de cáncer de cabeza y cuello humano resistente a cisplatino

Compuesto	CI_{50} (μM) tratamiento de 7 días	
	UMSCC10b	UMSCC10b/15s
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-2 (I)	0,73	2,1 \pm 0,2
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-pyrodach-2 (II)	1,1	
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-2 (comparativo)		5,0
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-4 (IV)	1,7	3,9

Tabla 4: Valores de CI_{50} para compuestos de fosfaplatino en líneas celulares de cáncer de colon humano (HT-29)

Compuesto	CI_{50} (μM) en diferentes tiempos de tratamiento		CI_{50} (μM) (CyQUANT)
	24 horas	7 días	72 horas
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-pyrodach-2 (II)			10
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-2 (I)	9,6	2,1	2,7
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-4 (IV)	23		
cisplatino (comparativo)			6,5

Tabla 5: Valores de CI_{50} para los compuestos de fosfaplatino en líneas celulares de cáncer humano: A459, células de cáncer de adenocarcinoma pulmonar humano; U251, células de cáncer de glioblastoma humano; PC-3, células de cáncer de colon metastásico humano; SKMEL-2, células de cáncer de melanoma de piel humano; MCF-7, células de cáncer de mama humano; OVCAR-8, células de cáncer de ovario humano con p53 disfuncional; y OVCAR-10, cáncer de ovario humano resistente al tratamiento con cisplatino, todos determinados por tecnología CyQUANT, descrita anteriormente, que mide directamente el contenido de ADN midiendo señales de fluorescencia de intercalaciones

Compuesto	CI_{50} (μM) para diferentes líneas celulares de cáncer humano (tiempo de tratamiento de 72 horas)						
	A549	U251	PC-3	SKMEL-2	MCF-7	OVCAR-8	OVCAR-10
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-2 (I)	0,9	4,6	1,7	19,7	2,3	1,2	0,8
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-pyrodach-2 (II)	11,9	24	10,7	10	11,2	13,5	5,9
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-2 (comparativo)	11,1	10,1	24,5	8,3		9,4	11,8
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-pyrodach-4 (IV)	6,3	3,9	20,5	34		11,4	17,8
(1 <i>S</i> ,2 <i>iS</i>)-pyrodach-4 (V)	21	10	19,1	4,7		15,1	35,8
<i>trans</i> -(\pm)-pyrodach-4	12,2	14,6	20	14,6		12,3	23,2
(comparativo)							
cisplatino (comparativo)	2,8	0,75	1,08	5,34	5,1	6,3	3,1

Adicionalmente, estos compuestos isómeros también se ensayaron exponiendo a los mismos durante 144 horas las siguientes líneas celulares: UMSCC10b, Panc-1, UMSCC15s, A2780/C30 y HCC1806. El isómero (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba actividad sorprendentemente superior cuando se comparaba con el racémico *trans*-(\pm)-pyrodach-2. Por ejemplo, el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba un valor de CI_{50} de 1,7 (μM) comparado con un valor de CI_{50} de 18,5 (μM) para el racémico *trans*-(\pm)-pyrodach-2 en la línea de células pancreáticas Panc-1; el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba un valor de CI_{50} de 0,3 (μM) comparado con un valor de CI_{50} de 8,9 (μM) para el racémico *trans*-(\pm)-pyrodach-2 en la línea celular de cáncer de cabeza y cuello UMSCC10b; y el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba un valor de CI_{50} de 9,7 (μM) comparado con un valor de CI_{50} >30 (μM) para el racémico *trans*-(\pm)-pyrodach-2 en la línea celular de cáncer de mama HCC1806.

Entre los isómeros *trans*, los ensayos clonogénicos indicaban una actividad muy superior de los isómeros (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 frente a las mezclas racémicas *trans*-(\pm)-pyrodach-2 y *trans*-(\pm)-pyrodach-4, respectivamente. Por ejemplo, se encontró que el valor de CI_{50} era $180 \pm 15 \mu M$ cuando células de cáncer de ovario humano (A2780) se exponían al *trans*-(\pm)-pyrodach-4 durante una hora; mientras que se encontró que el valor de CI_{50} para la misma línea celular era $40 \pm 10 \mu M$ para (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 en condiciones experimentales por lo demás idénticas (tabla 1). Las exposiciones prolongadas a los isómeros (1*R*,2*R*) de una variedad de líneas celulares de cáncer humano dieron valores de CI_{50} mucho menores, indicando el potencial de estos compuestos como fármacos antineoplásicos eficaces. Por ejemplo, el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 tiene un valor de CI_{50} de 500 nM (0,5 μM) a partir del ensayo clonogénico para células de ovario humano y 2 μM para el cáncer de cabeza y cuello humano resistente.

Los compuestos enantioméricamente puros tanto (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 como (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 muestran igual actividad dentro del error experimental, cuando se exponían a estas las células A2780 durante al menos 24 horas. Pero cuando las células se exponen durante periodos de tiempo más cortos, p. ej., 1 hora, se observaron actividades diferenciales entre las formas (1*R*,2*R*) y (1*S*,2*S*). Las formas (1*R*,2*R*) muestran actividad superior comparadas con el isómero (1*S*,2*S*) en una exposición de tiempo más corto, indicando la captación más rápida del isómero (1*R*,2*R*) por las células. Valores de CI_{50} más altos para las formas racémicas comparadas con la forma (1*R*,2*R*) o la (1*S*,2*S*) puede indicar la autoasociación de las dos formas que quizás son captadas por las células a una velocidad menor.

De nuevo para el cáncer de ovario humano resistente a cisplatino (OVCAR-10), el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba mejor eficacia in vitro que el (1*S*,2*S*)-pyrodach-2. Hay que destacar que el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba una actividad notablemente superior frente al cisplatino en las líneas celulares de cáncer de ovario humano OVCAR-10 (tablas 2 y 5) y OVCAR-8 (tabla 5).

El isómero *cis* presentaba actividad superior frente al cáncer de ovario humano (A2780) comparado con los otros compuestos. Por ejemplo, el *cis*-pyrodach-2 y *cis*-pyrodach-4 mostraban valores de CI_{50} de 300 nM y 4 μM ,

respectivamente, después de exponer las células A2780 durante 24 horas, comparado con 1,0 μM y 18 μM , respectivamente, para las correspondientes formas (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 o (1*R*,2*R*)-pyrodach-4. Obsérvese que el cisplatino y carboplatino daban valores de CI_{50} mucho mayores, es decir 5,0 μM y >60 μM respectivamente en condiciones idénticas.

- 5 Si querer estar ligado o limitado por la teoría, el principio químico previsto enseña que el valor de CI_{50} de las formas racémicas debería ser igual a la media aritmética de los respectivos valores de CI_{50} del isómero (1*R*,2*R*) y el isómero (1*S*,2*S*). Sin embargo, como se muestra en las tablas anteriores, el valor de CI_{50} de la forma racémica (por ejemplo, de pyrodach-2 en A2780) es mucho mayor de lo esperado basado en una mezcla 50/50 del enantiómero (1*R*,2*R*) y el enantiómero (1*S*,2*S*). Estos datos sugieren que las formas racémicas son menos potentes de lo esperado, basado
10 en la distribución de enantiómeros, por razones desconocidas. Una posible explicación podría ser que las formas racémicas se autoasocian y, por lo tanto, no son captadas eficazmente por las células.

En ensayos adicionales, las células se trataron con compuestos de platino de forma continua durante 7 días. Las colonias se fijaron y se tiñeron usando violeta cristal al 2% en formaldehído al 4%. Las colonias que contenían más de 50 células se puntuaron. Se hizo la media del número de colonias puntuadas de las placas por triplicado, y este número se dividió entre el número de células cultivadas en placa para obtener un valor para la fracción de células que forman colonia. Estos valores de la fracción de células que forman colonias, después se corrigieron según la eficacia del cultivo en placa, dividiendo la fracción entre el número de células que forman colonias en las placas que no se trataron con compuestos de platino. Los datos para la formación de colonias con A2780 se muestran en la figura 2. Obsérvese que tanto el enantiómero (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 como el (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 dieron valores de CI_{50}
15 casi iguales de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para el (1*R*,2*R*) y de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para el (1*S*,2*S*), mientras que la mezcla racémica dio un valor de CI_{50} mucho mayor de $2,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ indicativo de la menor eficacia de la mezcla racémica. Se muestran datos similares para OVCAR-10 en la figura 3, que compara (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 (RD2), (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 (RD4), *trans*-(±)-pyrodach-2 (T-D2), y *trans*-(±)-pyrodach-4 (T-D4).

Estudios clínicos han mostrado que el enantiómero (1*R*,2*R*) de oxaliplatino, con referencia al mismo ligando portador 1,2-diaminociclohexano en el oxaliplatino que el que está presente en los fofaplatinos descritos en la presente memoria, presenta eficacia superior frente a los otros estereoisómeros del oxaliplatino. A diferencia del oxaliplatino, los tres isómeros de pirofosfato (es decir, (1*R*,2*R*), (1*S*,2*S*), y *cis*) tanto del pyrodach-2 como del pyrodach-4 son muy activos contra una variedad de cánceres. Sin embargo, parece que no hay una tendencia universal. Por ejemplo, como se ha detallado antes, el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y el (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 mostraban valores de CI_{50} casi iguales
25 en células de cáncer A2780 cuando las células se exponían a estos compuestos durante 24 horas, mientras que de nuevo para el cáncer de ovario humano resistente a cisplatino (OVCAR 10), el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 presentaba mejor eficacia in vitro. Por otra parte, el (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 mostraba actividad superior frente al (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 en todas las células de cáncer de ovario humano. Los isómeros *cis* de pyrodach-2 y pyrodach-4 presentaban actividad superior frente al cáncer de ovario humano (A2780) comparado con los isómeros *trans*. Por lo tanto, los datos ponen
30 de manifiesto en conjunto, que algunos cánceres específicos pueden ser tratados con isómeros específicos con dosis menores comparado con las formas racémicas, evitando la toxicidad de otros isómeros que estarían presentes en las formas racémicas.

Ejemplo 9

Seguimiento del exceso de expresión de Fas por inmunofluorescencia

- 40 Una placa de seis pocillos con cubreobjetos pretratados, sueltos, se sembraron con células de cáncer de ovario humano, A2780 y A2780/C30 (resistencia cruzada a cisplatino 30 μM y a carboplatino 100 μM), obtenidas del Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) en 2,5 ml de medio. Las células se cultivaron como monocapa usando RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, insulina 0,25 unidades/ml y penicilina/estreptomomicina (100 unidades/ml) (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) en un incubador a 37°C
45 gasificado continuamente con 5% de CO_2 .

Las células al 70% de confluencia se trataron con uno de los compuestos de fosfaplatino de los ejemplos de síntesis anteriores durante 1 hora. Después, las placas se lavaron con cuidado dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) helada, se sustituyeron por medio normal, y se incubaron durante 1 hora adicional a 37°C con 5% de CO_2 . Los cubreobjetos se lavaron con PBS dos veces, y las células se trataron con formaldehído al 1% recién
50 preparado y después se incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 7 minutos. Las células fijadas se lavaron con PBS tres veces y después se bloquearon con FBS/PBS al 2% a 4°C durante 30 minutos, seguido de lavado de las células con PBS tres veces durante 5 minutos cada lavado.

Los cubreobjetos individuales se retiraron y se les dio la vuelta sobre 100 μl de una dilución 1:100 de anticuerpo primario contra FAS (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA) en BSA al 5%/leche al 1%/PBS sobre una superficie de Parafilm[®] durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los cubreobjetos se volvieron a transferir a una placa de seis pocillos limpia para el posterior lavado, en concreto tres lavados con PBS, cada 5 minutos. Se dio la vuelta a los cubreobjetos una segunda vez sobre otra superficie de Parafilm[®] limpia, y se incubaron con 100 μl de anticuerpo secundario-FITC con una dilución 1:500 en BSA al 5% BSA/leche al 1%/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después los cubreobjetos se lavaron con PBS tres veces, 5 minutos cada vez. Los
55

objetos mojados se montaron sobre un portaobjetos de microscopio con medio de montaje Ultracruz® con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para la identificación de los núcleos celulares. La microscopía se llevó a cabo usando un microscopio de fluorescencia con 10X, 40X, y 100X aumentos.

Ejemplo 10

5 Transferencia Western/inmunodecoración para la expresión de proteínas

Después de electroforesis en SDS-PAGE al 12%, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando 100 V, durante 1,5 horas a 4°C. Las membranas se lavaron con TWEEN-20 al 0,05% y solución salina tamponada con Tris (TBST) y se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% y BSA al 1%. La membrana se incubó con una dilución 1:25.000 de anticuerpo primario de la proteína de interés durante la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con TBST al 0,05% seguido de incubación en el correspondiente anticuerpo conjugado con HRP (dilución 1:40.000). Las proteínas se visualizaron usando el sistema quimioluminiscente ECL-Advance (Amersham-GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA).

Los fosfaplatinos activan una serie de genes proapoptóticos y de supresión tumoral tales como FAS, PTEN, PUMA, BAX y otros. Los experimentos por transferencias Western confirmaron niveles altos de expresión de proteínas transcritas por estos genes. Por ejemplo, los ratones tratados con *trans*(±)-pyrodach-4 presentan regulación por aumento de FAS (hasta 25 veces), BAX (hasta 4 veces), PUMA (hasta 5 veces), y regulación por disminución de VEGFR (hasta 50%) tras exposición a *trans*(±)-pyrodach-4 durante de 1 a 12 horas. Igualmente, BCL2 era regulado por disminución tanto como 70% por RR-pyrodach-2 y RR-pyrodach-4. Además, FAS, FADD, y el compuesto de platino eran colocalizados en acumulaciones lipídicas. Estas activaciones también están asociadas con la mayor expresión de esfingomielinasa (SMase), verificado por la mayor expresión de proteína de SMase.

La SMase hidroliza la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina. En un experimento típico, se exponen células de cáncer (1×10^6) a (1R,2R)-pyrodach-2 o (1R,2R)-pyrodach-4 (10 μ M) con diferentes intervalos de tiempo (de 5 min a 2 h). Las células se centrifugan y el lisato celular se recoge y se lava con PBS frío. Se usa el kit reactivo de rojo Amplex (Invitrogen) para el seguimiento de la actividad de Smase. Los ensayos se llevan a cabo basándose en los protocolos recomendados incluidos con el kit. Típicamente, se suspenden 11 μ l de lisato celular en tampón de citrato sódico 50 mM (pH 5,0) en una placa de 96 pocillos, y se añade esfingomielina (5,0 mM) a cada pocillo. Las muestras se incuban durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se añaden a cada pocillo 100 μ l de solución de reacción de rojo Amplex que contiene Tris-HCl 100 mM (100 μ M), rojo Amplex (2 unidades/ml) peroxidasa de rábano picante, colina oxidasa 0,2 unidades/ml y fosfatasa alcalina 8 unidades/ml (pH 8,0). Después las muestras se incuban durante 30 minutos a 37°C. La intensidad de fluorescencia se mide a 590 nm usando una longitud de onda de excitación de 530 nm a 560 nm. Los valores de fluorescencia de los pocillos que contienen muestras de control (no tratadas) se restan de cada medición de muestra.

Ejemplo 11

Determinación de platino en la acumulación lipídica

El contenido de platino se midió cuantitativamente en un espectrómetro de absorción atómica de horno de grafito (Perkin Elmer AA-600) a partir de curvas de calibración establecidas usando un patrón de platino (Perkin Elmer, Waltham, MA) en HNO₃ al 0,1%. Las células tratadas con fosfaplatino se lavaron con 1 ml de PBS helado e inhibidor de proteasa de detención, PI (Pierce, Rockford, IL) 4 veces y el sedimento se recogió por centrifugación a 4°C a 1000xg entre cada lavado. Los sedimentos celulares se suspendieron en 250 μ l de PBS/PI, y el contenido de proteína se midió usando el método de micro BSA (Pierce, Rockford, IL). Se usó albúmina de suero bovino (BSA) preparada en diferentes concentraciones para representar la curva patrón. Las muestras de proteína cuantificadas se digirieron en HNO₃ concentrado durante 4 horas, seguido de tratamiento con H₂O₂ al 30% durante 1 hora antes del análisis.

Ejemplo 12

45 Estudios de toxicidad en ratones SCID

Ratones SCID hembra de 4 a 5 semanas de edad (c.b-17/LCR-Prkdc(SCID)/CrI, Código de cepa 236^r, Charles River Labs, Wilmington, MA) se aclimataron durante una semana antes de iniciar los ensayos de toxicidad. Mediante agujas de calibre 26 y jeringas, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i/p) 100 μ l de uno de los compuestos de fosfaplatino descritos en los ejemplos de síntesis anteriores en PBS esterilizado por filtración. Las inyecciones tenían dosis en el intervalo de 5 mg/kg a 60 mg/kg y se administraron una vez el día 1, una vez el día 3 y una vez el día 5.

Para evaluar la toxicidad de los compuestos de fosfaplatino, se registraron todos los días los acontecimientos adversos (es decir, >20% de pérdida de peso y/o cambio en el consumo de alimento, desviación del comportamiento normal, otros problemas de salud o la muerte). La frecuencia y gravedad de la aparición de los acontecimientos adversos en los ratones a los que se inyectó compuestos de fosfaplatino se compararon con los mismos en grupos de control de ratones. A los grupos de control se les dio una inyección simulada (como un control para la respuesta

al estrés) o una inyección que consistía en PBS (vehículo).

Dos grupos de ratones se trataron con compuestos de platino disponibles en el comercio para la comparación, con la dosis basada en datos previamente publicados (es decir, cisplatino 12 mg/kg y carboplatino 60 mg/kg) como comparación con los compuestos de fosfaplatino. Al final del estudio, todos los ratones se anestesiaron con avertina 5 358 mg/kg y se recogió sangre por punción cardiaca usando una aguja de calibre 26 y jeringa de tuberculina. Después los ratones se sacrificaron por desangrado con anestesia. Después de sacrificarlos, se recogieron los órganos, que incluían el hígado, bazo, corazón, pulmón, ovario y riñón, se conservaron en formalina al 10% y se bloquearon con parafina para el examen histopatológico. Los cambios de características de los tejidos fueron examinados por un patólogo experto.

10 Ratones SCID a los que se les produjo tumor de ovario, se trataron con *trans*-(±)-pyrodach-2 y *trans*-(±)-pyrodach-4 con diferentes dosis de hasta 40 mg/kg, y se siguió el crecimiento tumoral durante hasta seis semanas o hasta que el tamaño del tumor se hizo tan grande que se sacrificaron los animales. El crecimiento o la remisión del tumor en los ratones tratados con fosfaplatino se comparó con los ratones tratados con cisplatino (7 mg/kg) y los ratones tratados con carboplatino (60 mg/kg). Se administraron tres dosis de compuestos de platino en días alternos cuando el tumor creció a un tamaño de al menos 100 mm³. Los valores de log de muerte celular brutos y netos se calcularon después usando las fórmulas:

$$\text{Log de muerte celular bruto} = (T - C) / (3,32 Td)$$

$$\text{Log de muerte celular neto} = \frac{(T - C - \text{duración del tratamiento})}{3,32 Td}$$

20 donde T y C son la mediana de los tiempos en días para que el tumor crezca a un tamaño especificado, y Td es la mediana del tiempo en días para que se duplique el tamaño del tumor en animales de control.

Se encontró que los valores de log de muerte celular brutos registrados para el régimen de tres dosis era mayor que 3 y el valor del log de muerte celular neto era mayor que 2 con dosis de 40 mg/kg. En cambio, los ratones tratados con cisplatino (7 mg/kg), aunque mostraron remisión tumoral, murieron en el plazo de 7 días. Los ratones tratados con carboplatino (dosis de 60 mg/kg) presentaron valores de log de muerte celular mucho menor (menor que 2) comparado con *trans*-(±)-pyrodach-4. Otro aumento de la dosis de carboplatino no fue posible, porque más de 50% de la población había muerto con la dosis de 60 mg/kg. Basándose en estos datos, se cree que el *cis*-pyrodach-2, *cis*-pyrodach-4, (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 en particular, presentarían mejor eficacia que el racémico *trans*-(±)-pyrodach-4.

Ejemplo 13

30 Eficacia in vivo en la línea celular de cáncer de ovario A2780

Líneas celulares de cáncer de ovario clonales estables A2780 se desarrollaron en cultivo celular hasta que se alcanzó 80-90% de confluencia. Se usó tripsina (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) para desprender las células adherentes. Las células tripsinizadas se lavaron exhaustivamente con PBS (solución salina tamponada con fosfato) para separar la tripsina. La eficacia de los compuestos de fosfaplatino se evaluó usando cáncer de ovario humano A2780, por xenoinjerto subcutáneo en ratones *SCID Hairless OutBred*, *SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}*, (Charles River Labs, Wilmington, MA). Ratones SCID hembra de 4 a 5 semanas de edad se aclimataron durante una semana antes de inicio de los ensayos de eficacia.

40 Las células de cáncer se volvieron a suspender en PBS, y se inyectó a todos los ratones, excepto los ratones de control negativo, por vía subcutánea de 1×10⁶ células/0,10 ml a 5×10⁶ células/0,10 ml en PBS y se evaluaron los tumores en función del tiempo usando agujas de calibre 26 y jeringas estériles. Se examinó diariamente en los ratones el crecimiento tumoral. Los tumores se midieron usando calibres digitales. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula (W² × L)/2, donde W es la medida del tumor en el punto más ancho, y L es la dimensión del tumor en el punto más largo, donde el volumen del tumor en mm³ es equivalente al peso en mg.

45 Después de aproximadamente 2 semanas de la inyección subcutánea de las células de cáncer, en los tumores que habían alcanzado un tamaño tumoral distinguible (aproximadamente 100-200 mm³), se inició la administración de compuesto de fosfaplatino o inyecciones de control. Se administró a los ratones compuestos de fosfaplatino por vía intraperitoneal una vez el día 1, de nuevo una vez el día 3 y de nuevo una vez el día 5. Cada grupo de ratones con xenoinjerto se trató con compuestos de fosfaplatino, y un conjunto correspondiente se trató con vehículo/placebo (solución de PBS) e inyección simulada (como un control de respuesta al estrés). Además, dos grupos de ratones se trataron con compuestos de platino disponibles en el comercio para la comparación con los compuestos de fosfaplatino, basándose las dosis de compuestos de platino disponibles en el comercio en datos previamente publicados (es decir, cisplatino 12 mg/kg y carboplatino 60 mg/kg).

Se hizo el seguimiento diario en los ratones SCID con xenoinjertos de cualquier acontecimiento adverso en su salud, midiendo la pérdida/ganancia de peso y el consumo de alimento. Las mediciones se detuvieron y el estudio se

finalizó cuando el tamaño tumoral superó 3000 mm³. Al final del estudio, los ratones se anestesiaron con avertina 358 mg/kg y se recogió sangre por punción cardiaca usando una aguja de calibre 26 y jeringa de tuberculina. Después los ratones se sacrificaron por desangrado bajo anestesia. Después de sacrificarlos, se recogieron los órganos, que incluían el hígado, bazo, corazón, pulmón, ovario y riñón, se conservaron en formalina al 10% y se bloquearon con parafina para el examen histopatológico. Los cambios de características de los tejidos fueron examinados por un patólogo experto.

Los datos de eficacia de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 contra el cáncer de ovario humano A2780 en el modelo de ratón de xenoinjerto (ratones NIH III inmunocomprometidos) se resumen en la figura 4. Durante el ensayo, los ratones se trataron en días alternos durante tres días ("días alternosx3")--una vez el día 1, una vez el día 3 y una vez el día 5. En particular, los ratones se trataron con 40 mg/kg de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, 10 mg/kg de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, o 5 mg/kg de cisplatino. Los números N en la leyenda de la figura 4 indican el número de ensayos de los cuales se obtuvieron los datos mostrados como medias. Los datos en la figura 4 de los diez primeros días de tratamiento con (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 muestran claramente una remisión tumoral durante las etapas iniciales del tratamiento.

Ejemplo 14

Eficacia in vivo en cáncer de ovario humano y cáncer de cabeza y cuello humano

Se sabe que el cáncer de ovario humano (OVCAR-10) presenta resistencia tanto frente al cisplatino como al carboplatino. Líneas celulares de cáncer de ovario humano clonales estables OVCAR-10 y de cáncer de cabeza y cuello UMSCC10b se desarrollaron por separado en cultivo celular hasta que se alcanzó 80-90% de confluencia. Se usó tripsina (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) para desprender las células adherentes. Las células tripsinizadas se lavaron exhaustivamente con PBS (solución salina tamponada con fosfato) para separar la tripsina. La eficacia de los compuestos de fosfaplatino se evaluó por implante subcutáneo de xenoinjertos de OVCAR-10 y UMSCC-10b humanos en ratones *SCID Hairless OutBred*, *SHO-Prkdc^{scid}Hr^{tr}*, (Charles River Labs, Wilmington, MA), NIH (NIH III: NIHBNX-F; NIH-Slystbg Foxnlnu Btkxid, hembras de 4 semanas de edad, Taconic, Rensselaer, NY).

Ratones SCID/NIH hembra de 4-5 semanas de edad se aclimataron durante una semana antes de inicio de los ensayos de eficacia. Las células de cáncer se volvieron a suspender en PBS y se inyectó a todos los ratones, excepto a los ratones de control negativo, por vía subcutánea de 1×10^6 células/0,10 ml a 5×10^6 células/0,10 ml en PBS. El tamaño tumoral se evaluó en función del tiempo. Se examinó diariamente en los ratones el crecimiento tumoral. Los tumores se midieron usando calibres digitales. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula $(W^2 \times L)/2$, donde W es la medida del tumor en el punto más ancho, y L es la dimensión del tumor en el punto más largo, donde el volumen del tumor en mm³ es equivalente al peso en mg.

Después de aproximadamente 2 semanas de la inyección subcutánea de células de cáncer, en los tumores que habían alcanzado tamaños tumorales distinguibles (aproximadamente de 100 mm³ a 200 mm³), se administraron por vía intraperitoneal compuestos de fosfaplatino de las dosis deseadas. Estas administraciones se hicieron una vez el día 1, una vez el día 3 y una vez el día 5.

Cada grupo de ratones con xenoinjerto se trató con compuestos de fosfaplatino, y un conjunto correspondiente se trató con vehículo/placebo (solución de PBS) e inyección simulada (como un control de respuesta al estrés). Además, dos grupos de ratones se trataron con compuestos de platino disponibles en el comercio para la comparación con los compuestos de fosfaplatino, basándose las dosis de compuestos de platino disponibles en el comercio en datos previamente publicados (es decir, cisplatino 12 mg/kg y carboplatino 60 mg/kg). Se hizo el seguimiento diario en los ratones SCID/NIH con xenoinjertos de cualquier acontecimiento adverso en su salud, midiendo la pérdida/ganancia de peso y el consumo de alimento. Las mediciones se detuvieron y el estudio se finalizó cuando el tamaño tumoral superó 3000 mm³.

Al final del estudio, los ratones se anestesiaron con avertina 358 mg/kg y se recogió sangre por punción cardiaca usando una aguja de calibre 26 y jeringa de tuberculina. Los ratones se sacrificaron por desangrado con anestesia. Después de sacrificarlos, se recogieron los órganos, que incluían el hígado, bazo, corazón, pulmón, ovario y riñón, se conservaron en formalina al 10% y se bloquearon con parafina para el examen histopatológico. Los cambios de características de los tejidos fueron examinados por un patólogo experto.

Los datos de eficacia del (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 contra las células de cáncer de ovario humano OVCAR-10 se resumen en la figura 5 con un control de PBS/Bicarb. Las dosis se administraron (40 mg/kg de peso corporal) cuando el tumor alcanzó 100-200 mm³ de tamaño. Los ratones tratados mostraron remisión tumoral durante el tiempo de tratamiento. Las mediciones de los tamaños tumorales a lo largo del tiempo se resumen en la figura 6, para un control (PBS/Bicarbonato) administrado en días alternosx3, carboplatino 60 mg/kg administrado en días alternosx3, y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 40 mg/kg administrado en días alternosx3. Las flechas punteadas destacan el tiempo (en días, interpolado según sea necesario) al que el tamaño tumoral medio alcanzaba 1000 mm³. Comparado con el control, mientras que el carboplatino presenta un porcentaje de aumento de la duración de vida (% ILS) de solo aproximadamente 125%, el (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 presentaba un % de ILS de aproximadamente 209%.

Los datos de eficacia de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 contra el cáncer de cabeza y cuello humano

UMSCC10b se resumen en la figura 7. Las dosis se administraron en días alternosx3 y/o diariasx4, en el intervalo de 10 mg/kg de peso corporal a 40 mg/kg de peso corporal. Estas eficacias se compararon con la forma racémica *trans*-(±)-pyrodach-4. Las dosis se administraron cuando el tumor alcanzó 100-200 mm³ de tamaño.

Ejemplo 15

5 Dosis máximas toleradas de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 y (1*R*,2*R*)-pyrodach-4

Para determinar las dosis máximas toleradas, se llevaron a cabo experimentos de toxicidad para el (1*R*,2*R*)-pyrodach-2, (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, *trans*-(±)-pyrodach-4, *trans*-(±)-pyrodach-4, cisplatino y carboplatino. Se administraron dosis crecientes de 10 mg/kg a 100 mg/kg en ratones ICR (CD-1) hembra de 4-5 semanas de edad, Taconic (Rensselaer, NY). Los ratones tenían pesos corporales entre 15 g y 24 g. Se inyectó a los ratones uno de los fosfaplatinos en días alternos en un régimen de tres dosis. La pérdida de peso corporal de 20% o más, aspecto no saludable, fracaso en la ganancia de peso, otros problemas de salud observables, desviaciones de los comportamientos normales, o muerte, se consideraron un acontecimiento adverso.

Con dosis menores de 10 mg/kg, no se observó pérdida de peso. No se observó muerte o pérdida de más de 20% del peso corporal hasta la dosis más alta de 40 mg/kg para todos los compuestos de fosfaplatino. Estos resultados se pueden comparar con el cisplatino, para el que el 100% de los ratones murieron con una dosis de 12 mg/kg, y con el carboplatino, para los que se observó 33% de las muertes con una dosis de 60 mg/kg. Con dosis mayores de 100 mg/kg, todos los ratones o perdieron más de 20% de peso o murieron en el plazo de quince días de administración.

Ejemplo 16

20 Expresión de genes cuantitativa por experimentos de PCR en tiempo real

Se llevaron a cabo experimentos de PCR en tiempo real para calcular la expresión de algunos genes objetivo. Células de cáncer epitelial de ovario humano (A2780) y células resistentes a cisplatino (A2780/C30) se cultivaron en RPMI 1640 con o sin cisplatino, (1*R*,2*R*)-pyrodach-4, y *trans*-(±)-pyrodach-4, durante 0, 3, 12 y 24 horas. Tanto las células tratadas como no tratadas se mantuvieron en medio RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 μmol, penicilina-estreptomina 100 unidades/ml y solución de insulina 0,25 unidades/ml, a 37°C y 5% de CO₂. Se aisló el ARN de las células, tanto de las tratadas como las no tratadas. Las células tratadas son las células recogidas después de exposición de las células a un fosfaplatino a la concentración de su valor de CI₅₀ en diferentes intervalos de tiempo, desde 3 horas a 24 horas.

Las muestras de ARN se trataron con RNasa exenta de DNasa (QIAGEN Sciences) para separar el ADN. Después, se sintetizó el ADNc usando el kit de alta capacidad de RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza del ARN se determinaron por espectroscopía UV (NanoDrop 2000 Thermo Scientific, Wilmington, DE). Se usó un índice de relación de absorbancias mínimo (relación de la absorbancia medida a 260 nm frente a la absorbancia medida a 280 nm) de 1,9 como una pureza aceptable.

Las muestras de ARN aisladas se almacenaron a -80°C y se sometieron a ciclos de congelación-descongelación mínimos para mantener la integridad del ARN. Las PCR en tiempo real dúplex se llevaron a cabo usando ensayos de expresión de genes Taqman[®] para el gen objetivo y control endógeno (β-actina) en el mismo pocillo de reacción. El control endógeno es la referencia usada para normalizar el ARNm diana. Estas reacciones en cadena se llevaron a cabo inicialmente usando diferentes concentraciones de ADNc para determinar las concentraciones óptimas de ADNc requeridas para detectar el gen de interés. El gen diana se marcó con un colorante azul (FAM, absorbancia: 494 nm, emisión: 518 nm) mientras que el gen de referencia se marcó con un colorante verde (VIC, absorbancia: 538 nm, emisión: 554 nm). Las concentraciones de ADNc se seleccionaron de forma que los valores del ciclo umbral (Ct) para los genes objetivo estaban entre 17 y 32, los más sensibles para la detección de fluorescencia por el instrumento ABI StepOnePlus[™] usado para las mediciones.

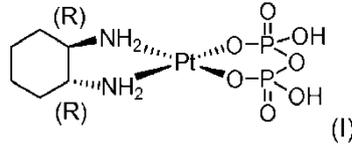
Se determinó el número del ciclo umbral (Ct), el punto en el que la fluorescencia de la reacción de qPCR supera justo la fluorescencia umbral del sistema de detección. Estos valores de Ct se usaron para comparar los niveles de los genes diana y los controles endógenos. Las expresiones de genes cuantitativas se dan en términos de número de veces de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que se calcularon a partir de los valores ΔCt y $\Delta\Delta Ct$ de acuerdo con las relaciones: $\Delta Ct = (Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{referencia}})$ y $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct)_{\text{tiempo}} - (\Delta Ct)_{\text{tiempo cero (control)}}$. El número de veces de expresión para las muestras de control (no tratadas) permanece igual a 1, porque el valor de $\Delta\Delta Ct = 0$, y por lo tanto, $2^0 = 1$.

Esta solicitud no debe considerarse limitada a los ejemplos y realizaciones específicos descritos en la presente memoria, sino más bien debe entenderse que cubren todos los aspectos de la invención. Diferentes modificaciones, procedimientos equivalentes, así como numerosas estructuras y dispositivos a los que se puede aplicar la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diferentes cambios sin salirse del alcance de la invención, que no debe considerarse limitada a los que se describe en la memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

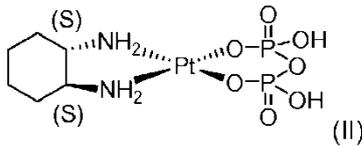
1. Un complejo de fosfaplatino seleccionado del grupo que consiste en:

(i) (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (I),



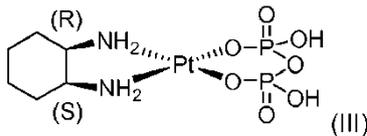
5 o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(ii) (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (II),



o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

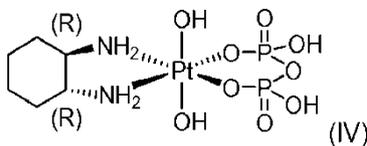
(iii) *cis*-pyrodach-2 que tiene la fórmula (III),



10

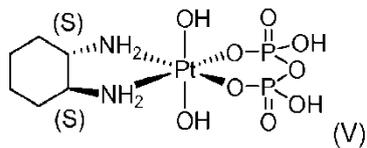
o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(iv) (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (IV),



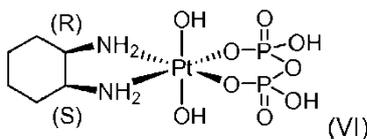
o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

15 (v) (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro que tiene la fórmula (V),



o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; y

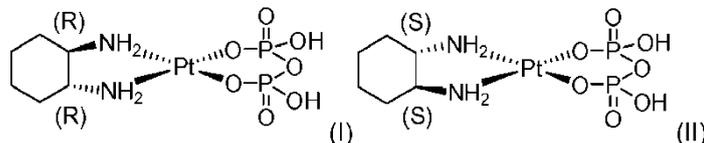
(vi) *cis*-pyrodach-4 que tiene la fórmula (VI),



20 o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

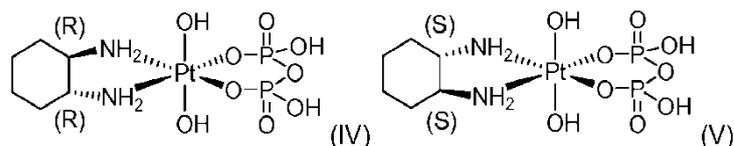
2. Un complejo de fosfaplatino seleccionado del grupo que consiste en:

(i) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (I) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (II):



5 o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; y

(ii) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico bien de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (IV) o (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (V):



o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

10 3. El complejo de fosfaplatino de la reivindicación 2, seleccionado del grupo que consiste en:

(i) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de 0,1 % a 99% de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (I) o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(ii) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de 0,1 % a 99% de (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (II) o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

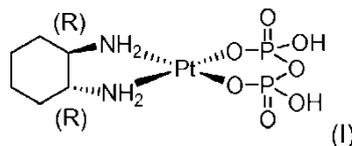
15 (iii) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de 0,1 % a 99% de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (IV) o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(iv) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de 0,1 % a 99% de (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (V) o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

20 4. El complejo de fosfaplatino de cualquier reivindicación precedente, para usar en un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa en un mamífero.

5. Una composición para usar en un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa en un mamífero, comprendiendo dicha composición uno o más complejos de fosfaplatino seleccionados de:

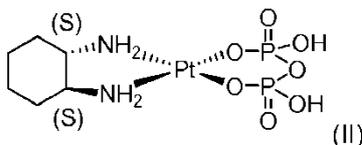
(i) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (I):



25

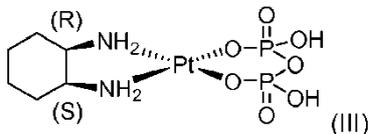
o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(ii) pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 que tiene la fórmula (II):



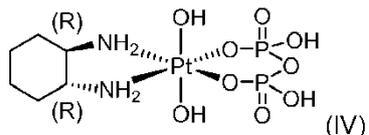
30 o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(iii) *cis*-pyrodach-2 que tiene la fórmula (III):



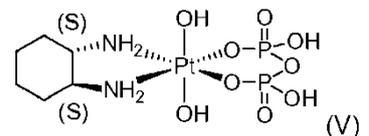
o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

5 (iv) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (IV):



o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

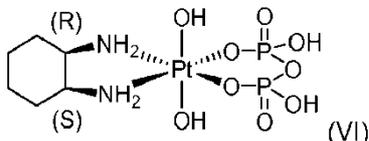
(v) pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, que tiene un exceso enantiomérico de (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 que tiene la fórmula (V):



10

o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

(vi) *cis*-pyrodach-4 que tiene la fórmula (VI):



o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; y

15 (vii) una mezcla de múltiples complejos de al menos dos de dichos complejos de fosfaplatino (i)-(vi).

6. La composición para usar de la reivindicación 5, en donde la composición comprende además al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos.

20 7. El complejo para usar de la reivindicación 4, o la composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, que comprende el pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido que tiene un exceso enantiomérico de 10% a 100% de (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 o de (1*S*,2*S*)-pyrodach-2.

8. El complejo para usar de la reivindicación 4, o la composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, que comprende el pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido que tiene un exceso enantiomérico de 10% a 100% de (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 o de (1*S*,2*S*)-pyrodach-4.

25 9. El complejo para usar de la reivindicación 4, o la composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, que comprende *cis*-pyrodach-2.

10. El complejo para usar de la reivindicación 4, o la composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, que comprende *cis*-pyrodach-4.

30 11. El complejo para usar de la reivindicación 4, o la composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde dicha enfermedad proliferativa es un cáncer.

12. El complejo para usar o composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en donde dicha enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer glioblastoma y cáncer de colon.

13. El complejo para usar o composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, en donde dicha enfermedad proliferativa es un cáncer resistente al tratamiento con al menos uno de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

5 14. La composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde dicha composición comprende al menos un complejo de fosfaplatino seleccionado del grupo que consiste en:

(i) (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro;

(ii) (1*S*,2*S*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro;

(iii) (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro;

(iv) (1*S*,2*S*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro;

10 (v) *cis*-pyrodach-2; y

(vi) *cis*-pyrodach-4,

en donde:

dicha composición no contiene tanto (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 como (1*S*,2*S*)-pyrodach-2; y

dicha composición no contiene tanto (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 como (1*S*,2*S*)-pyrodach-4;

15 15. La composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde el uno o más complejos de fosfaplatino de dicha composición consisten en pyrodach-2 enantioméricamente enriquecido, pyrodach-4 enantioméricamente enriquecido, o ambos.

20 16. La composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde el uno o más complejos de fosfaplatino de dicha composición consisten en (1*R*,2*R*)-pyrodach-2 enantioméricamente puro, (1*R*,2*R*)-pyrodach-4 enantioméricamente puro, o ambos.

17.- La composición para usar de la reivindicación 5 o reivindicación 6, que además comprende cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, o combinaciones de los mismos.

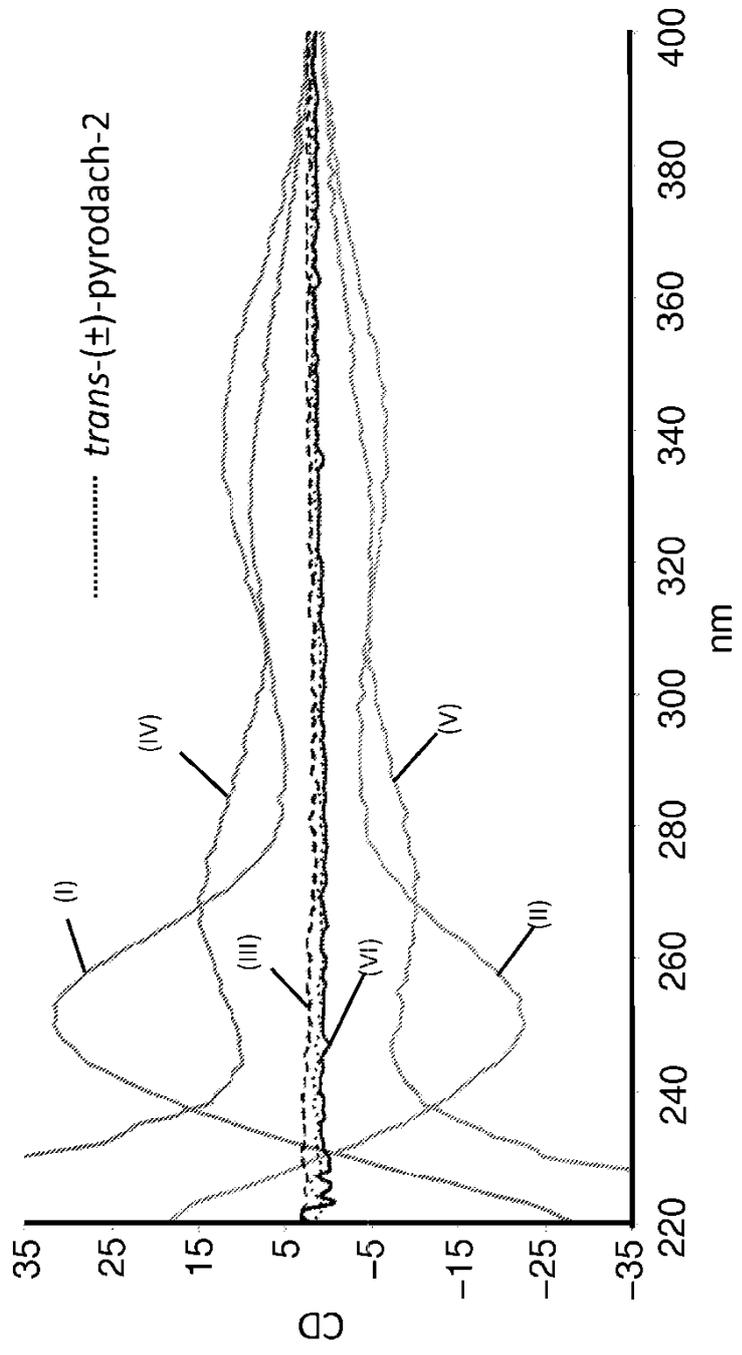


FIG. 1

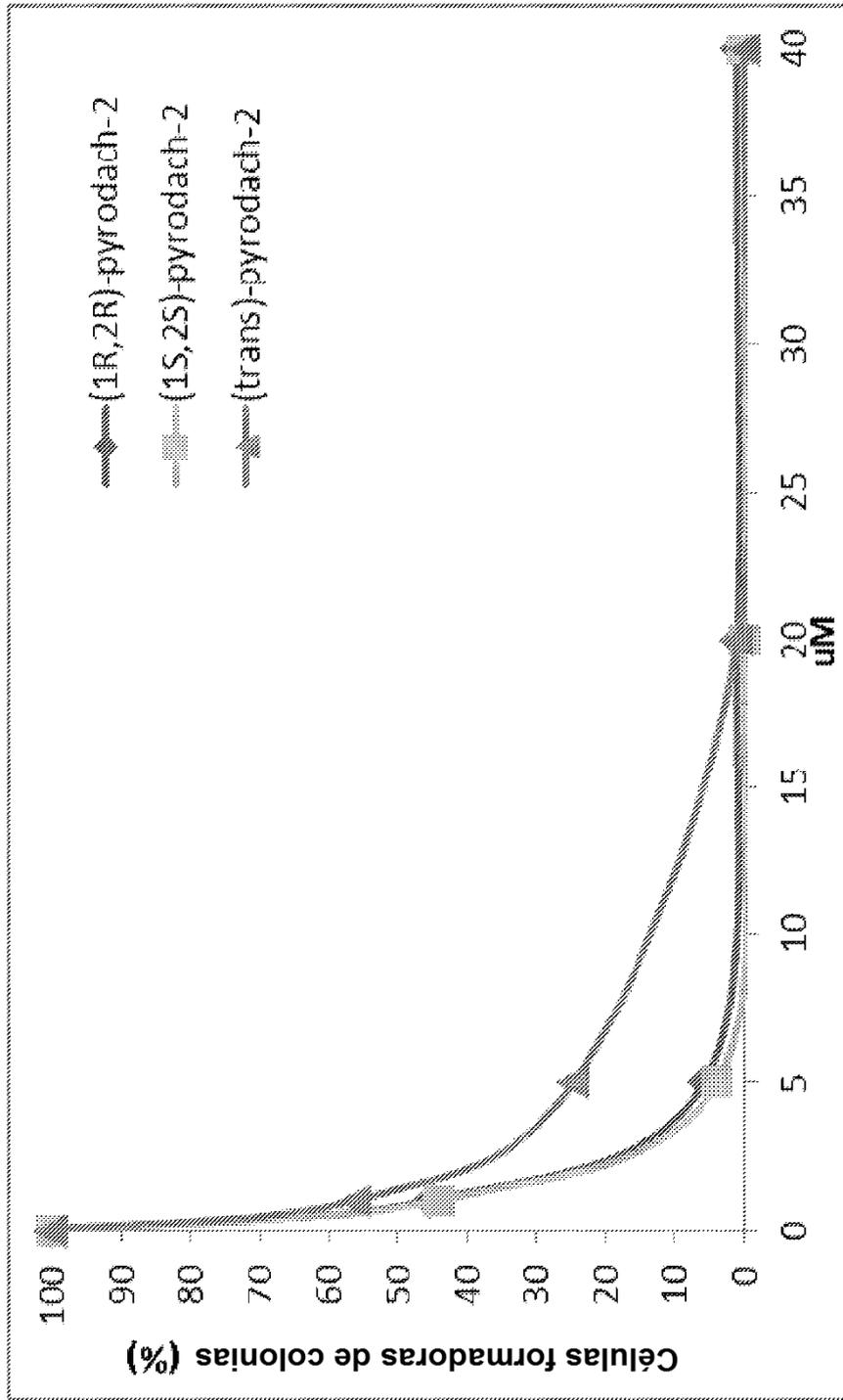


FIG. 2

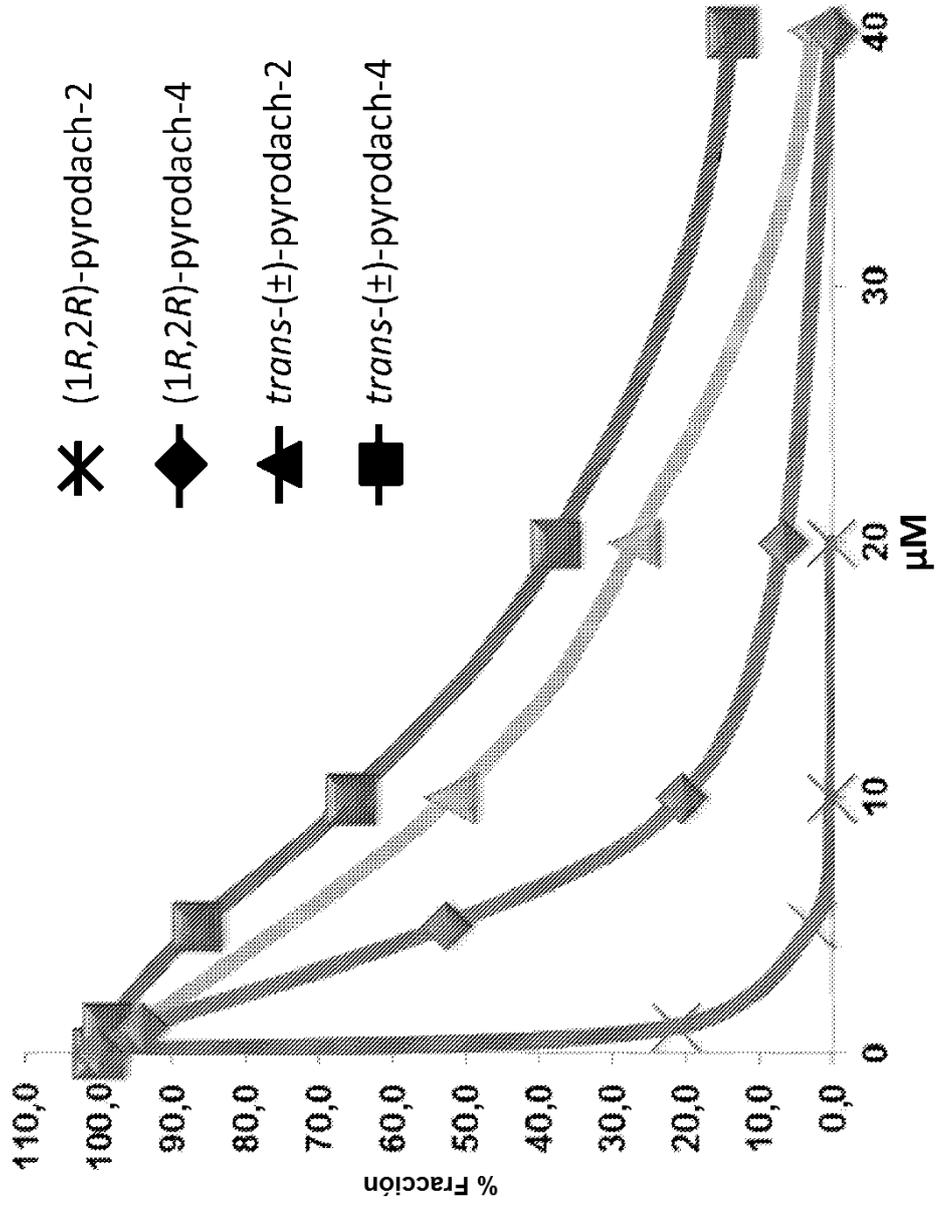


FIG. 3

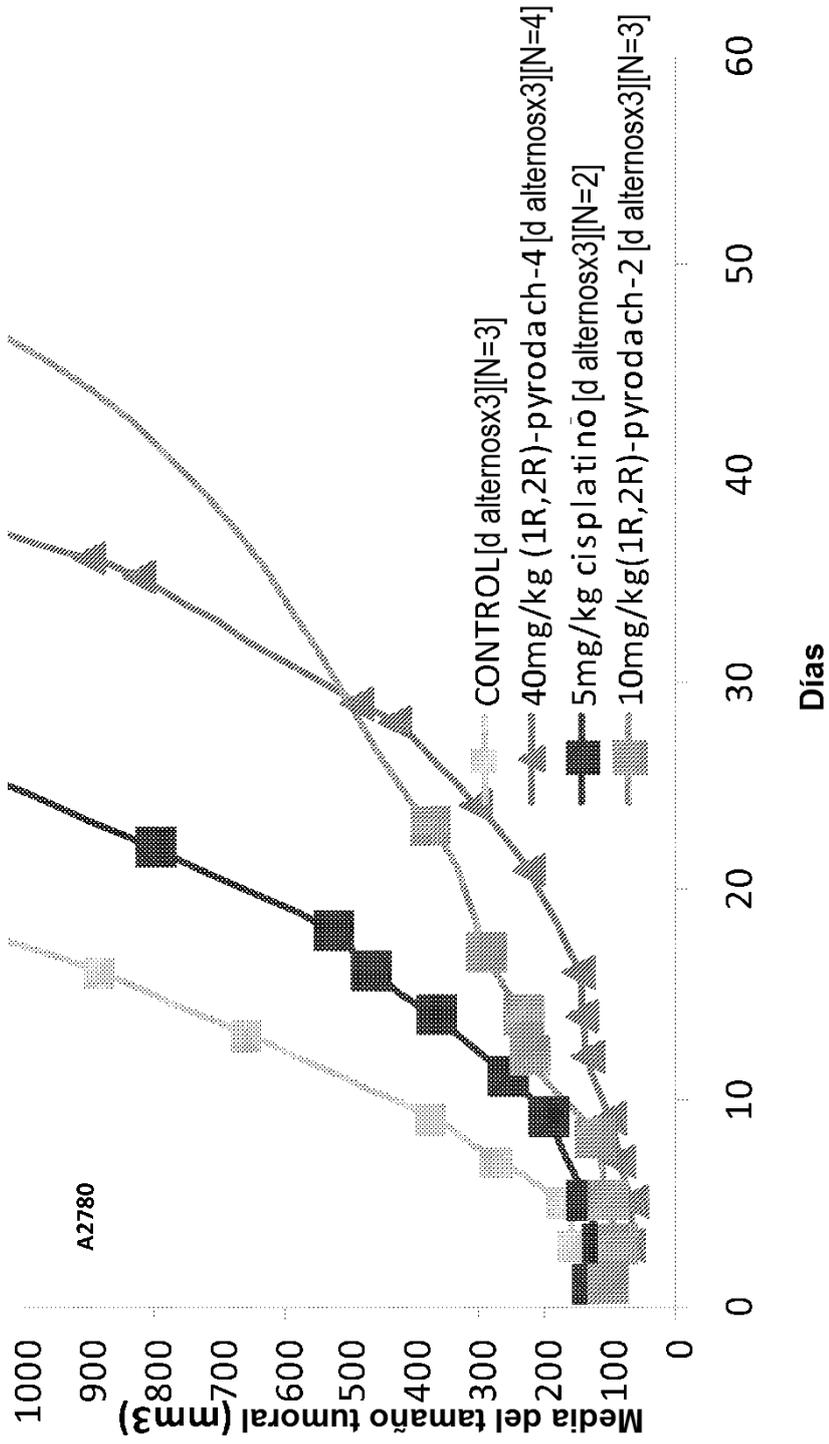


FIG. 4

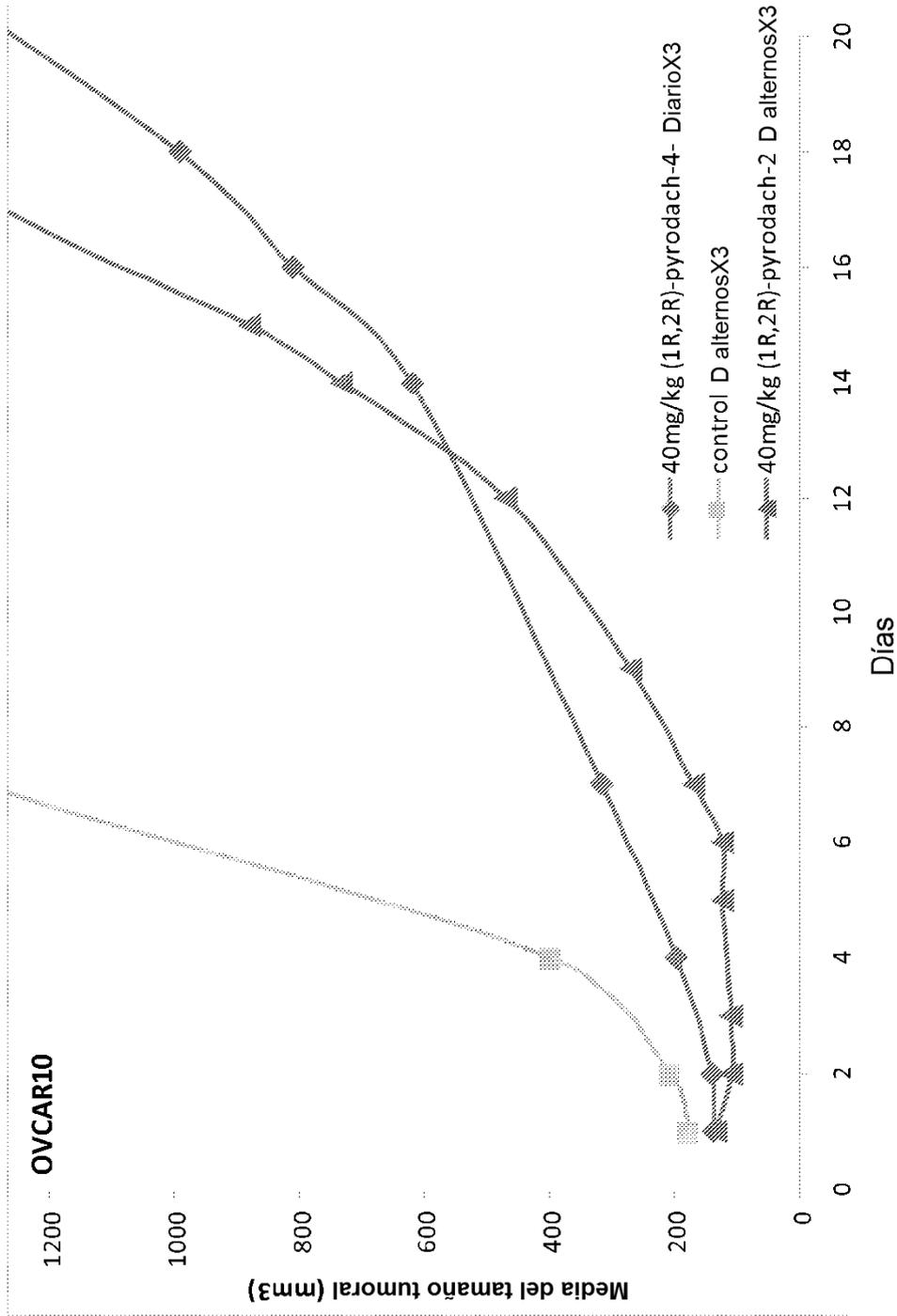


FIG. 5

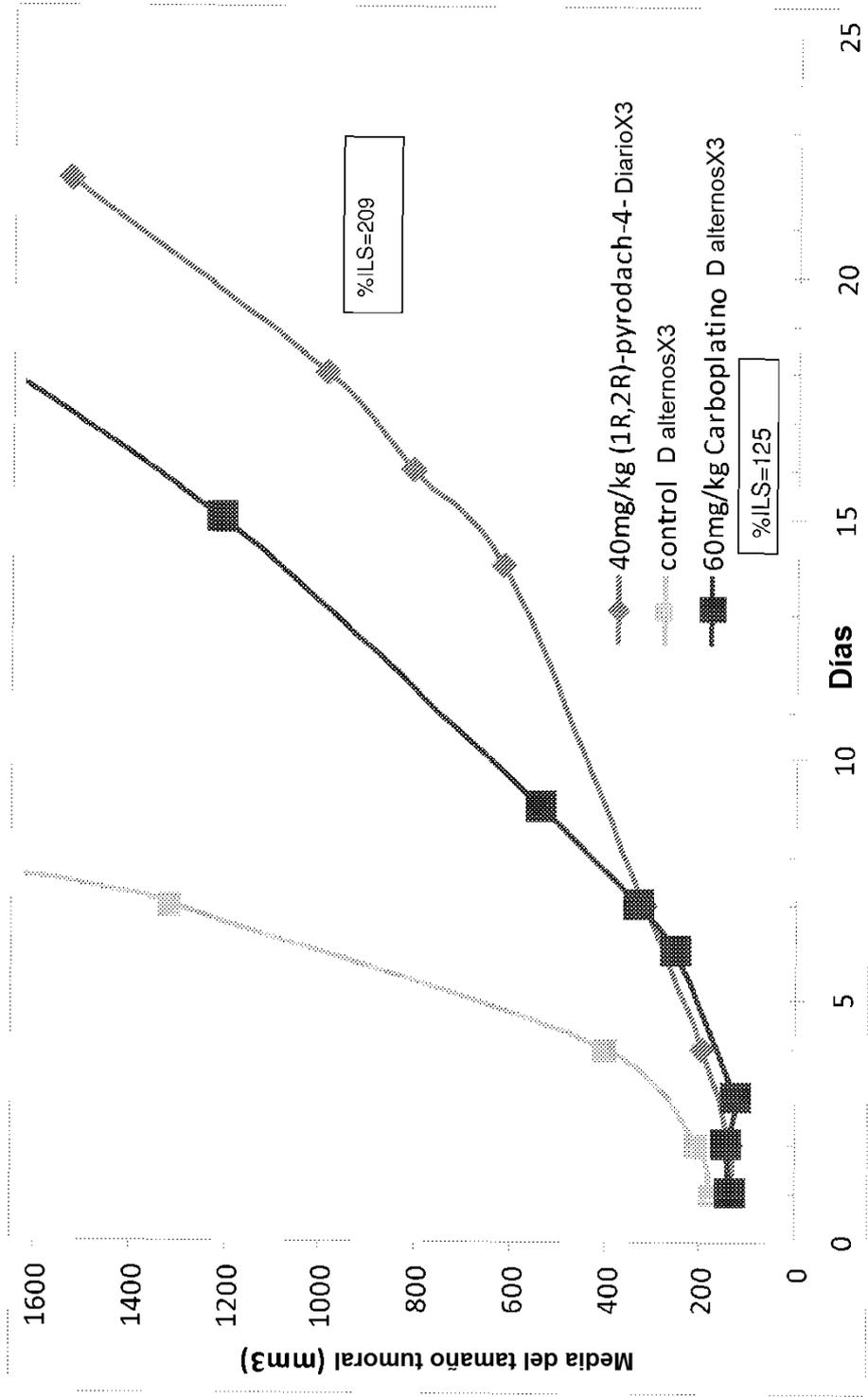


FIG. 6

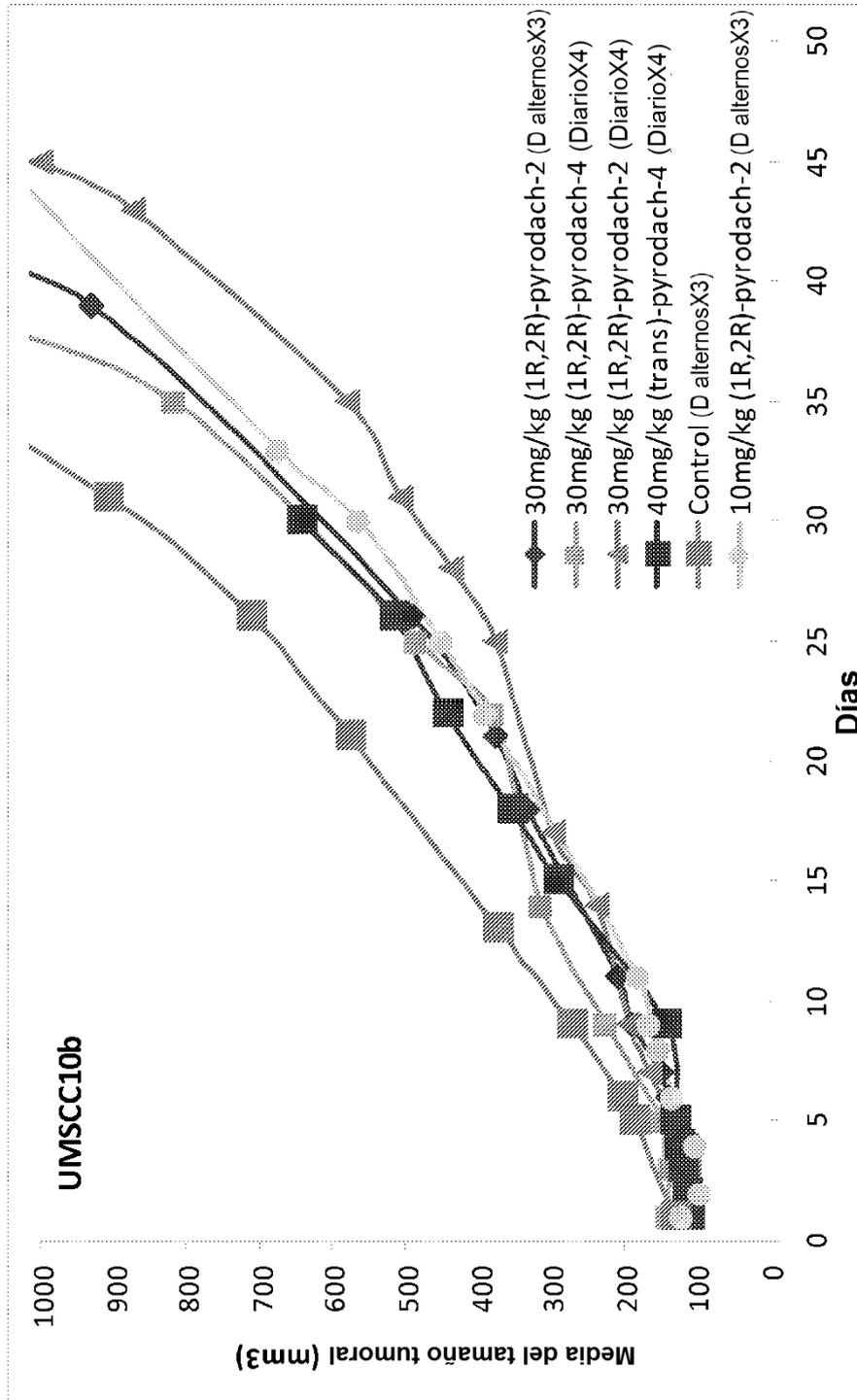


FIG. 7