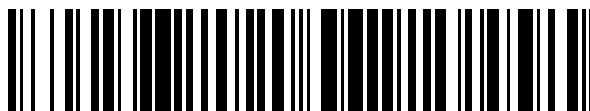


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 938**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/84** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)  
**C08H 7/00** (2011.01)  
**C07G 1/00** (2011.01)  
**C08H 8/00** (2010.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2013 PCT/DK2013/050092**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO2013143549**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2013 E 13728943 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2831151**

54 Título: **Compuestos de ácido bencenopolicarboxílico y su uso como fármacos**

30 Prioridad:

**30.03.2012 DK 201270159**  
**30.03.2012 US 201261618037 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2017**

73 Titular/es:

**RDINNOVATION APS (100.0%)**  
**Robert Jacobsens Vej 60**  
**2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es:

**SHIPOV, VALERY, PAVLOVICH;**  
**PIGAREV, EVGENY, SERGEEVICH y**  
**FEDOROS, ELENA, I.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 618 938 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de ácido bencenopolicarboxílico y su uso como fármacos

## 5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a nuevos compuestos de ácido bencenopolicarboxílico, que se preparan por oxidación alcalina de hidrolizado de lignina. La presente descripción también se refiere al uso de los nuevos compuestos de ácido bencenopolicarboxílico como parte de una sustancia compuesta, donde la sustancia  
10 compuesta se prepara por complejación o encapsulación de los nuevos compuestos del ácido bencenopolicarboxílico con un catión metálico. La presente descripción también se refiere a un método de preparación del nuevo compuesto de ácido bencenopolicarboxílico y a su uso en composiciones cosméticas, nutracéuticas y farmacéuticas.

## 15 Antecedentes

Uno de los fármacos más estudiados para el tratamiento del cáncer es el fármaco de platino Cisplatino. Cisplatino es un fármaco con un amplio espectro de actividad y es eficaz en la terapia de sarcomas, carcinomas y linfomas, por mencionar algunos. Al mismo tiempo, este fármaco conlleva varias desventajas significativas. Así, debido a su  
20 rápido metabolismo con formación de compuestos unidos a proteínas inactivos, el fármaco daña tanto las células cancerosas como las normales de manera que exhibe una toxicidad alta, especialmente nefrotoxicidad.

Para solventar estos problemas se han hecho esfuerzos importantes en la búsqueda de métodos de reducción de la toxicidad del Cisplatino, con desarrollo de nuevos complejos metalorgánicos basados en ligandos orgánicos de bajo  
25 peso molecular (US 4,169,846; US 4,657,927). A este respecto, el uso de compuestos poliméricos como agentes quelantes o encapsulantes se presenta por sí mismo como una posible solución eficaz a este problema.

La solicitud de patente US2010/0278925 describe un nuevo tipo de formulación de compuestos organoplatínicos, que comprende al menos un compuesto organoplatínico y al menos un polímero hidrosoluble asociativo, en la que  
30 dicho polímero se produce por polimerización de monómeros del ácido metacrílico, monómeros de uretano y monómeros de hemimaleato, y un compuesto organoplatínico, que se selecciona del grupo del Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. En particular, esta descripción hace posible la obtención de una formulación oral del fármaco en forma de jarabe o granular.

35 La presente descripción difiere de las invenciones anteriormente citadas en el uso de un compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos como polímero hidrosoluble para la producción de compuestos organometálicos, preferentemente para aplicación parenteral, enteral o tópica.

Otra patente, BY6420, describe una formulación del fármaco polimérico de cis-diaminodichloroplatino (II) que exhibe efecto antitumoral. El objeto de dicha descripción radica en la inmovilización (encapsulación) del compuesto de  
40 platino en la superficie de la 6-carboxicelulosa. La formulación del fármaco resultante se usa para la implantación cerebral en neurocirugía, para evitar la recurrencia de las neoplasias malignas. Dicha formulación del fármaco polimérico biodegradable de cis-platino exhibe una neurotoxicidad moderada y un mayor efecto citostático.

45 La presente descripción difiere de la invención descrita en la patente BY6420 en que el polímero hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos exhibe su propio efecto biológico y en que la formulación del fármaco polimérico basada en dicho polímero se puede usar para aplicación parenteral, enteral y tópica.

En la patente RU 2182482 se describe un procedimiento de preparación de un agente anticancerígeno basado en el  
50 tetracloroplatinato de potasio. Dicha patente describe un método, en el que el tetracloroplatinato de potasio reacciona con compuestos húmicos. En este método, se trata una solución acuosa de sustancias húmicas con una solución de tetracloroplatinato de potasio. El tratamiento se realiza bajo irradiación con ondas ultrasónicas con densidad de potencia de  $40 \text{ W/cm}^2$  y frecuencia de 22 kHz durante entre 4 y 8 minutos. El producto de la presente descripción difiere del producto descrito en la patente RU 2182482 en la elección de un compuesto plano cuadrado  
55 de platino (II) como agente de platino. Además, el producto de la presente descripción se produce por un método diferente en el que las condiciones de irradiación son diferentes y en el que la potencia de irradiación se ajusta por volumen del producto irradiado y en el que la irradiación se lleva a cabo hasta que la cantidad de platino sin reaccionar con el polímero alcanza un valor menor o igual al 25 % de la cantidad inicial y en el que asimismo se lleva a cabo una termostatación hasta que la cantidad del platino hidrolizable alcanza un valor menor o igual al 10

% . De este modo, se obtiene un producto diferente. El complejo resultante de la presente descripción está caracterizado por una alta estabilidad de los enlaces y una toxicidad considerablemente reducida.

En las patentes EP1864673 y RU2368379 se describe otro agente anticancerígeno, que se produce por reacción de un compuesto de coordinación de platino (II) con un compuesto húmico que se somete previamente a cavitación acústica causada por exposición a ultrasonidos con densidad de potencia de 0,5 a 5 W/cm<sup>3</sup> y frecuencia ultrasónica de 18 a 66 kHz. El agente anticancerígeno así obtenido está caracterizado por el contenido de una fracción de alto peso molecular del compuesto húmico menor o igual al 5 %. El producto de la presente descripción difiere del producto descrito en las patentes EP1864673 y RU2368379 en que la irradiación se lleva a cabo hasta que la cantidad de platino sin reaccionar con el polímero alcanza un valor menor o igual al 25 % de la cantidad inicial y en que asimismo se lleva a cabo una termostatización hasta que la cantidad del platino hidrolizable alcanza un valor menor o igual al 10 %. De este modo, se obtiene un producto diferente. El complejo resultante de la presente descripción está caracterizado por una alta estabilidad de los enlaces y una toxicidad considerablemente reducida.

En la patente RU2183124 se describe un método de producción de medios de protección de un organismo contra la radiación ionizante, concretamente una sustancia con propiedades radioprotectoras, a partir de materiales de origen natural. De acuerdo con este método, las sustancias húmicas derivan de materias primas naturales y una solución acuosa de dichas sustancias húmicas se trata con molibdato amónico. Dicho tratamiento con molibdato amónico se realiza a una temperatura de 40 ± 5 °C bajo irradiación con ondas ultrasónicas con densidad de potencia de 40 W/cm<sup>2</sup> y frecuencia de 22 kHz durante entre 4 y 8 minutos. El método usa sustancias húmicas obtenidas a partir de lignina de la madera oxidada. El producto de la presente descripción difiere de la invención descrita en la patente RU2183124 en que la sal de molibdeno se selecciona de un amplio rango de compuestos. Además, el producto de la presente descripción se produce mediante un método diferente en el que las condiciones de irradiación son diferentes y en el que la potencia de irradiación se ajusta por volumen del producto irradiado y en el que la irradiación se lleva a cabo hasta que la cantidad de molibdeno sin reaccionar con el polímero alcanza un valor menor o igual al 25 % de la cantidad inicial y en el que asimismo se lleva a cabo una termostatización hasta que la cantidad de molibdeno hidrolizable alcanza un valor menor o igual al 10 %. De este modo, se obtiene un producto diferente. El complejo resultante de la presente descripción está caracterizado por una alta estabilidad de los enlaces y una toxicidad considerablemente reducida.

En las patentes EP1864674 y RU2350353 se describe otro método de producción de un agente protector de un organismo contra la radiación ionizante. Este agente se prepara por tratamiento de una solución acuosa que contiene sustancias húmicas y molibdato amónico con radiación de ondas. El contenido de molibdato amónico se selecciona en el rango de hasta 0,4 partes en peso por 1 parte de sustancias húmicas, el tratamiento se realiza hasta que la fracción de alto peso molecular de sustancias húmicas alcanza un nivel de menor o igual al 5 %. El producto de la presente descripción difiere de la invención descrita en las patentes EP1864674 y RU2350353 en que la sal de molibdeno se selecciona de un amplio rango de compuestos. Además, el producto de la presente descripción se produce mediante un método diferente en el que las condiciones de irradiación son diferentes y en el que la irradiación se lleva a cabo hasta que la cantidad de molibdeno sin reaccionar con el polímero alcanza un valor menor o igual al 25 % de la cantidad inicial y en el que asimismo se lleva a cabo una termostatización hasta que la cantidad de molibdeno hidrolizable alcanza un valor menor o igual al 10 %. De este modo, se obtiene un producto diferente. El complejo resultante de la presente descripción está caracterizado por una alta estabilidad de los enlaces y una toxicidad considerablemente reducida.

Además de los beneficios, las composiciones descritas en RU2182482, EP1864673, RU2368379, RU2183124, EP1864674 y RU2350353 tienen varias desventajas causadas por el hecho de que los ligandos orgánicos que incorporan están caracterizados por una composición, seguridad y actividad biológica variables y, en consecuencia, no se pueden usar en el desarrollo de complejos estables o sustancias compuestas aptas para la preparación de composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o cosméticas.

US 3,910,873, US 2005/069974, EP0786491, EP1369122, WO 02/24609, WO 01/97750, WO 02/24610, EP1864673, EP1864674 y Dalimova 2006 (Chemistry of natural compounds, Kluwer academic publishers consultants bureau, NE, vol. 42, no.

1) describe la oxidación alcalina de una materia prima basada en lignina.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que se puede usar un novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, caracterizado por un bajo contenido en minerales e impurezas de bajo peso molecular y con actividad biológica propia, para el desarrollo de complejos organometálicos

estables, seguros y potentes.

La mejora de la estabilidad de los enlaces entre el polímero y el catión metálico de tales complejos se consigue mediante introducción de operaciones de polimerización, purificación y termostatación y al uso de nuevas condiciones de ultrasonificación en las que la potencia se ajusta por volumen y el tratamiento se continúa hasta que se forma el complejo con más de un 75 % del compuesto metálico. De este modo, se obtiene un producto diferente.

La presente descripción también describe sustancias compuestas basadas en el nuevo compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, en las cuales dicho compuesto polimérico actúa como un agente complejante y/o encapsulante que forma complejos de alta eficacia y baja toxicidad con enlaces de alta estabilidad. Estas nuevas sustancias compuestas muestran alta eficacia incluso a bajas concentraciones. Tales sustancias compuestas que comprenden, por ejemplo, complejos de platino y molibdeno, demuestran propiedades prometedoras. Los complejos de platino actúan como eficaces agentes anticancerígenos y los resultados experimentales demuestran su mayor capacidad para matar células cancerígenas en comparación con los prototipos y tales agentes anticancerígenos conocidos como el Cisplatino y el Carboplatino. Los complejos de molibdeno actúan como eficaces agentes para la profilaxis y tratamiento de enfermedades causadas por alteraciones del ciclo celular, las cuales resultan, por ejemplo, de la exposición a radiación, del envejecimiento celular o de trastornos inmunológicos. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también se pueden usar para la reducción/minimización de los efectos secundarios resultantes de la radioterapia o quimioterapia convencionales.

Las propiedades químicas de los nuevos compuestos poliméricos hidrosolubles de ácidos bencenopolicarboxílicos hacen posible la obtención de un amplio rango de complejos altamente estables, así como de composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas para administración parenteral, enteral y tópica en seres humanos y animales.

## Resumen

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, caracterizado por tener una composición elemental de 62-67 % de C, 3,8-4,2 % de H, 29-34 % de O, y menos de 0,2% de N del peso seco y donde la suma de otros elementos no es superior al 1 % del peso seco.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un método de preparación del novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, en el cual una materia prima de partida que contiene lignina se somete a tratamiento alcalino, seguido de tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido, para obtener un compuesto polimérico hidrosoluble bruto de ácidos bencenopolicarboxílicos y, finalmente, se somete el compuesto bruto a purificación.

En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere al novedoso compuesto polimérico hidrosoluble para su uso en la profilaxis, tratamiento y modificación de enfermedades humanas y animales y a las composiciones farmacéuticas que comprenden el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble para su uso en la profilaxis, tratamiento y modificación de enfermedades humanas y animales.

En un cuarto aspecto, la presente descripción se refiere a una composición cosmética o a una composición nutracéutica que comprenden el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble.

En un quinto aspecto, la presente descripción se refiere a una sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, un catión metálico y opcionalmente un agente anticancerígeno y a su uso en una composición farmacéutica para la profilaxis, tratamiento y modificación de una enfermedad humana o animal.

En un sexto aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II).

En un séptimo aspecto, la presente descripción se refiere a la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II) para su uso como fármaco o para su uso en la preparación de una composición farmacéutica.

En un octavo aspecto, la presente descripción se refiere al uso del fármaco o composición farmacéutica que comprende la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II) en la profilaxis, tratamiento o cuidados paliativos o para la modificación de una enfermedad de un mamífero, tal como por ejemplo el cáncer.

En un noveno aspecto, la presente descripción se refiere a una sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno, donde el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos encapsula o forma un complejo con dicho compuesto de molibdeno.

En un décimo aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación de la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno.

En un onceavo aspecto, la presente descripción se refiere a la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno para su uso como fármaco o para su uso en la preparación de una composición farmacéutica.

En un doceavo aspecto, la presente descripción se refiere al uso del fármaco o composición farmacéutica que comprende la sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno en la profilaxis, tratamiento o cuidados paliativos de un mamífero que padece una enfermedad tal como, por ejemplo, una enfermedad derivada de alteraciones del ciclo celular o para la modificación de dicha enfermedad.

En un treceavo aspecto, la presente descripción se refiere a las composiciones farmacéuticas para su uso en la reducción/minimización de los efectos secundarios resultantes de la radioterapia o quimioterapia convencionales.

### Descripción de los dibujos

- Figura 1. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de los ácidos húmicos de acuerdo con el prototipo RU2182482.  
 Figura 2. Espectro IR del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción.  
 Figura 3. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción.  
 Figura 4. Espectros diméricos homo y heteronucleares del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción.  
 Figura 5. Espectro FTICR MS del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción.  
 Figura 6. Estructura fina del espectro de absorción de rayos X en la región extendida (m) de una sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción y cis-diaminodicloroplatino (II), el cis-diaminodicloroplatino (II) inorgánico (denotado en la figura como "Cisplatino") y cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino (II) (denotado en la figura como "Carboplatino").  
 Figura 7. Imágenes de células PBMC en el día 15 de incubación en un medio sin adición del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos (denotado como "grupo de referencia a") y en el medio que contiene el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción en una concentración de 215  $\mu\text{g/L}$  del medio (denotado como "compuesto polimérico b, 215  $\mu\text{g/L}$ ").  
 La figura 8 muestra los datos de viabilidad de células MCF-7, células del cáncer de mama en humanos tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.  
 La figura 9 muestra los datos de viabilidad de células T47-D, células del cáncer de mama en humanos tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.  
 La figura 10 muestra los datos de viabilidad de células PI45, células del cáncer pancreático en humanos tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.  
 La figura 11 muestra los datos de viabilidad de células T24P, células del cáncer de vejiga en humanos, y células SKOV-3, células del cáncer ovárico en humanos, tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.  
 La figura 12 muestra la actividad LDH de células MCF-7, células del cáncer de mama en humanos tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.  
 La figura 13 muestra la actividad LDH de células T47-D, células del cáncer de mama en humanos tras tratamiento con compuestos de la presente descripción.

### Descripción detallada

La presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere a un novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos, caracterizado por la siguiente composición elemental: 62-67 % de C, 3,8-4,2 % de H, 29-34 % de O, menos de un 0,2% de N del peso seco y suma de otros elementos (impurezas inorgánicas) inferior al 1 % del peso seco. Este novedoso compuesto posee su propia actividad farmacológica, un grado de pureza superior y una mayor capacidad de formación de complejos estables o de encapsulación de diversos agentes.

10 Por el término "compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos", tal y como se usa en la presente patente, se entiende un polímero que comprende principalmente ácidos carbónicos aromáticos polibásicos hidrosolubles.

El novedoso polímero hidrosoluble se puede caracterizar además mediante métodos de RMN  $^{13}\text{C}$ , IR y FTICR-MS.

15

De acuerdo con la RMN  $^{13}\text{C}$ , la cantidad de carbono de los grupos alifáticos  $\text{CH}_n$  detectados en el rango de 0-48 ppm constituye el 15-22 %; la cantidad de carbono aromático  $\text{C}_{\text{AR}}$  detectado en el rango de 108-145 ppm constituye el 30-42 %; la cantidad de carbono de los grupos COO carboxílicos y éster detectados en el rango de 165-187 ppm constituye el 5-13 % y la cantidad de carbono de los grupos cetónicos C=O detectados en el rango de 187-220 ppm constituye el 2-8 %. La cantidad total de impurezas de bajo peso molecular detectadas en 168,5 ppm (anión carbonato), 171 ppm (anión formato), 173 ppm (anión oxalato) y 181-182 ppm (anión acetato) es inferior al 1 por ciento.

Por el término "impureza de bajo peso molecular", tal y como se usa en la presente descripción, se entiende un compuesto de peso molecular inferior a 300 Da, que no polimerizó.

25

En el espectro IR del polímero se pueden ver vibraciones de elongación específicas evidentes de los grupos COO-asimétricos ionizados con picos a  $1410\text{ cm}^{-1}$ . La banda ancha de absorción del complejo correspondiente a la mezcla de ácidos carbónicos alifáticos y aromáticos se ve en el rango de  $1500 - 1700\text{ cm}^{-1}$ . Junto con los ácidos carboxílicos, el polímero también contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos unidos unos a otros mediante enlaces de hidrógeno. Esto queda demostrado por la presencia de bandas de absorción en las siguientes regiones:  $3400 - 3600\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1050\text{ cm}^{-1}$  (C-O) y  $1250 - 1300\text{ cm}^{-1}$  (OH). La región de  $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$  contiene la banda de absorción con picos a  $2928\text{ cm}^{-1}$  y  $2853\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de valencia de los grupos CH- en los grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ . Los picos de absorción más o menos expresados que se identifican a  $1750\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de los grupos C=O.

30

35

Un fragmento de 1500 Da del novedoso compuesto polimérico de la presente descripción se puede representar por la siguiente fórmula bruta:  $(\text{C}_3\text{H}_2\text{O})_{x_1}(\text{C}_2\text{H}_2\text{O})_{x_2}(\text{CH}_2)_{x_3}$ , donde  $x_1 \leq 12$ ,  $x_2 \leq 9$ ,  $x_3 \leq 33$ .

40 Los ácidos bencenopolicarboxílicos (componentes aromáticos, predominantemente definidos como ésteres metílicos de ácidos bencenopolicarboxílicos) son los principales monómeros del polímero. Asimismo, el polímero de ácidos bencenopolicarboxílicos comprende monómeros, tales como ácidos carboxílicos alifáticos saturados, ácidos hidrocarboxílicos alifáticos saturados, ácidos carboxílicos alifáticos monoinsaturados, ácidos hidrocarboxílicos alifáticos monoinsaturados y ácidos carboxílicos alifáticos poliinsaturados.

45

Los ácidos carboxílicos alifáticos saturados corresponden a la fórmula general -  $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ , donde n es de 12 a 26. Los ácidos hidrocarboxílicos alifáticos saturados corresponden a la fórmula general -  $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_3$ , donde n es de 16 a 26. Los ácidos carboxílicos e hidrocarboxílicos alifáticos monoinsaturados corresponden a las siguientes fórmulas:  $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$ ,  $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_3$ ,  $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_4$ ,  $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_5$ , donde n es de 14 a 28. Los compuestos anteriormente descritos son responsables de las propiedades tensoactivas del polímero. Los ácidos carboxílicos alifáticos poliinsaturados están representados por el ácido 13-cis-retinoico, el ácido (6Z, 9Z,12Z,15Z)-octadecatetraenoico, el ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico, el ácido (9R,13R)-2-oxo-5-pentil-3-ciclopenteno-1-octanoico, el ácido 9S-hidroperoxi-10E,12Z,15Z-octadecatrienoico, el ácido C13(S)-hidroxioctadeca-9Z,11E-dienoico, el ácido 10S,11S-epoxi-9S-hidroxi-12Z-octadecenoico, el ácido 9S,12S,13S-trihidroxi-10E,15Z-octadecadienoico, el ácido 5,6-deshidroaraquidónico y el ácido 15(S)-hidroxi-(5Z,8Z,11Z,13E,17Z)-eicosapentanoico. Los efectos antitumorales y antioxidantes de muchos de los compuestos que pertenecen a esta última serie (por ejemplo, el 13-cis-retinoico (isotretinoína), el ácido C13(S)-hidroxioctadeca-9Z,11E-dienoico y el ácido 5,6-deshidroaraquidónico) también están contenidos en el polímero de la presente descripción.

50

55

El grupo principal de monómeros (componentes aromáticos) comprende los siguientes monómeros: éster metílico del ácido 3-benciloxi-4,5-dihidroxi-benzoico, éster metílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, éster dimetílico del ácido 2,6-dimetil-benzo(1,2-b,4,5-b')difurano-3,7-dicarboxílico, éster etílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, ramnetina, éster metílico del ácido ((4-metil-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-il)oxi)acético hidrato, carbonato de bis(2-(metoxicarbonil)fenilo), sulocrina, 2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetildibenzofurano-1,3(2H,9bH)-diona, anhídrido O-acetilsalicílico, 4-ho-3-((6-ho-benzo(1,3)dioxol-5-il)-(3-metoxi-fenil)-metil)-5h-furan-2-ona, ácido 2,3-bis-benzoiloxi-succínico, éster metílico del ácido 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,3-dioxo-1,3,10,11-tetrahidrobenzo[5,6]cicloocta[1,2-c]furan-4-carboxílico, éster metílico del ácido (1-metoxicarbonilmetoxi-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-iloxi)-acético, atranorina y epicatequinas fenilpropanoide-sustituidas. Muchos de los compuestos que pertenecen a este grupo exhiben efectos antibióticos y antitumorales.

La presente descripción también está dirigida a un método de preparación del compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos policarboxílicos. El novedoso compuesto polimérico de la presente descripción puede prepararse de acuerdo con el método expuesto a continuación.

15

En la primera etapa del método se proporciona un material que contiene lignina como materia prima de partida. Entre los ejemplos de tales materiales que contienen lignina se incluyen la lignina oxidada, la madera, la turba, remanentes de plantas y restos de fábricas de pulpa de celulosa. La materia prima de partida que contiene lignina preferente se produce a partir de árboles de coníferas y está caracterizada por tener un pH de 5,5 a 7, contenido de humedad del 50 al 70% y por comprender no más de un 32% de polisacáridos, no menos de un 66% de lignina y no más de un 2% de compuestos hidrosolubles.

En la segunda etapa del método se somete una suspensión acuosa de la materia prima que contiene lignina a tratamiento con álcalis a un pH de  $13 \pm 0,5$  y una presión de  $2,2 \pm 0,3$  MPa. Entre los ejemplos de álcalis que se pueden usar se incluyen los hidróxidos de metales alcalinos y/o alcalinotérreos y/o amoniaco. Sin embargo, el álcali preferente es el hidróxido de sodio. Mediante este tratamiento alcalino se obtiene una solución de sales sódicas de ácidos benzenopolicarboxílicos como resultado de la hidrólisis y oxidación.

En la tercera etapa del método, la solución de sales sódicas de ácidos policarboxílicos se somete a un tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido. En esta etapa, la solución de sales sódicas de ácidos benzenopolicarboxílicos se trata con un ácido mineral y se somete a tratamiento con fuerzas centrífugas. Como resultado, se crea un gradiente de densidad y tiene lugar la condensación y polimerización de los ácidos benzenopolicarboxílicos. Entre los ejemplos de ácidos minerales que se pueden usar se incluyen ácidos solubles estables tales como el sulfúrico, el ortofosfórico, el nítrico y el clorhídrico. Sin embargo, el ácido mineral preferente es el ácido clorhídrico.

La cuarta etapa es la etapa de purificación, donde la purificación se lleva a cabo con uno o más procedimientos de purificación, tales como la extracción, flotación, destilación, filtración, precipitación, centrifugación, decantación y diálisis, para eliminar las impurezas de bajo peso molecular. Se continúa la purificación hasta que la cantidad de impurezas de bajo peso molecular detectada mediante RMN  $^{13}\text{C}$  u otro método representativo (por ejemplo, cromatografía de gases) cae por debajo del 1 % del peso seco del polímero.

La mejor modalidad del método de fabricación del polímero se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de la comparación del polímero de esta descripción con los ácidos húmicos obtenidos de acuerdo con el documento RU2182482 también se describen en el Ejemplo 1.

La presente descripción también está dirigida a las sustancias compuestas que comprenden el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos benzenopolicarboxílicos, un catión metálico y, opcionalmente, un agente anticancerígeno. En las sustancias compuestas preferentes, el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos policarboxílicos actúa como un agente complejante y/o encapsulante.

Por el término "polímero hidrosoluble", tal y como se usa en la presente patente, se entiende un polímero que es soluble en agua a pH neutro o alcalino en una concentración del 5 % p/p.

Por el término "agente complejante", tal y como se usa en la presente patente, se entiende un compuesto donante de electrones que es capaz de formar complejos solubles con iones metálicos, donde estos complejos pueden ser complejos de coordinación y/o quelatos. En estos complejos, los fragmentos del polímero de la presente descripción son los ligandos del ión metálico central. El ión metálico puede ser un metal 2s-5s o 3d-5d. Ejemplos de tales metales 2s-5s o 3d-5d son el platino, molibdeno, litio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, zinc, plata,

paladio y cobre.

Por el término "agente encapsulante", tal y como se usa en la presente descripción, se entiende una molécula grande que es capaz de confinar moléculas pequeñas y protegerlas del impacto del entorno circundante. Al contrario  
5 que el agente complejante, el agente encapsulante no forma enlaces químicos estables con las moléculas pequeñas que confina. Por lo tanto, por el término "encapsular" se entiende el procedimiento de confinamiento de moléculas pequeñas en el interior de una molécula más grande.

Asimismo, los presentes inventores han asumido la tarea de preparar composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y  
10 cosméticas que comprenden tal novedoso polímero hidrosoluble y, opcionalmente, uno o más excipientes adicionales.

Las composiciones cosméticas están formadas por el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble junto con otros ingredientes normalmente presentes en tales composiciones cosméticas. Las composiciones cosméticas pueden  
15 comprender además otros compuestos que poseen, por ejemplo, propiedades bactericidas, de cicatrización de heridas o propiedades antioxidantes. Así, para obtener una composición bactericida, el catión de plata se usa como un metal que exhibe actividad bactericida. Para obtener una composición para la cicatrización de heridas, el cobre se usa como un metal que exhibe actividad de cicatrización de heridas. Para obtener una composición antioxidante, el litio se usa como un metal cuyos complejos organominerales exhiben actividad antioxidante. Las composiciones  
20 cosméticas se pueden usar para la corrección de la piel o para la curación de la misma.

Las composiciones nutracéuticas están formadas por el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble junto con otros ingredientes normalmente presentes en tales composiciones nutracéuticas. Las composiciones nutracéuticas pueden comprender además otros nutrientes. Como nutrientes (minerales dietéticos vitales para un organismo vivo)  
25 se pueden usar macroelementos tales como, por ejemplo, hierro, potasio, calcio, magnesio y otros y/o microelementos tales como, por ejemplo, litio, plata, zinc, cobre, manganeso, paladio y otros. Las composiciones nutracéuticas se pueden usar para la restauración del equilibrio nutricional.

Las composiciones farmacéuticas comprenden, en algunas formas de realización, el novedoso compuesto  
30 polimérico hidrosoluble, mientras que en otras formas de realización, las composiciones farmacéuticas comprenden una sustancia compuesta que comprende el novedoso compuesto polimérico hidrosoluble y un catión metálico. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender asimismo un agente anticancerígeno, que se puede seleccionar del Grupo L del sistema de clasificación Anatómica, Terapéutica y Química (ATC) de la Organización Mundial de la Salud. Buenos ejemplos de tales agentes anticancerígenos son la ciclofosfamida, el cisplatino, el metotrexato, el  
35 flurouracilo, la doxorubicina, la goserelina, el tamoxifeno, el filgrastim, el interferón alfa y la interleuquina. La composición farmacéutica se puede usar para la terapia, profilaxis o modificación de enfermedades. Entre los ejemplos de excipientes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción se incluyen los compuestos seleccionados del grupo constituido por antiadherentes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, disgregantes, diluyentes, solventes/cosolventes, saborizantes, colorantes, lubricantes,  
40 deslizantes, sorbentes, edulcorantes, vehículos, polímeros para liberación moderada de API, polímeros para protección de API, agentes amortiguadores, antioxidantes, agentes humectantes, agentes antiespumantes, agentes espesantes, humectantes o mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción se formulan preferentemente de tal modo  
45 que se administren por vía oral, mucosa o lingual. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la descripción se formulan preferentemente en forma de comprimidos, pastillas, gomas de mascar, pastas líquidas viscosas, caramelos sólidos o piruletas o en forma de caramelos masticables o gotas gelificadas.

Algunas formas de realización de la presente invención están dirigidas a un sustancia compuesta, que comprende el  
50 novedoso compuesto polimérico hidrosoluble y un catión metálico. Entre los tipos de sustancias compuestas anteriormente citadas, el mayor interés lo suscitan las sustancias compuestas que contienen el polímero y un compuesto de platino o aquellas que contienen el polímero y un compuesto de molibdeno.

Se sabe que los compuestos de platino bivalente que se distinguen unos de otros por tener una estructura plano  
55 cuadrada, que es una estructura donde el ión platino ocupa la posición central y los ligandos se sitúan a los lados del cuadrado dispuestos en el mismo plano, son los compuestos antitumorales más potentes. En tales composiciones, el ángulo de valencia del ión de coordinación de platino coincide con la distancia entre moléculas vecinas de guanina del ADN, lo que le permite inhibir la síntesis de este último mediante la formación de aductos intrahebra. En una forma de realización preferida de la presente invención, el cis-diaminodicloroplatino (II), el



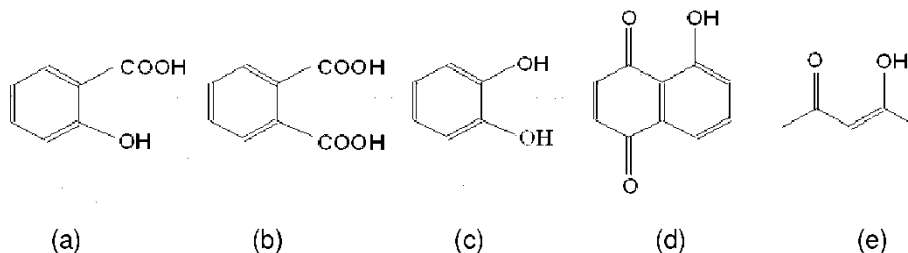
tetracloroplatinato de potasio o mezclas de los mismos se usan como complejos de platino bivalente para la síntesis de una sustancia compuesta.

La presente descripción también está dirigida a un procedimiento de preparación de la sustancia compuesta de acuerdo con la presente descripción. De acuerdo con la presente descripción, tal sustancia compuesta, que comprende el compuesto polimérico de la presente descripción y un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II), se puede obtener por exposición de la sustancia a radiaciones de onda y, más concretamente, a tratamiento con ultrasonidos con densidad de potencia en el rango de 0,5 - 5 W/cm<sup>3</sup> y frecuencia en el rango de 18 - 66 kHz durante entre 1 y 30 minutos hasta que el contenido de platino no unido (es decir, platino que no ha reaccionado con el polímero) cae por debajo del 25 % de su cantidad original.

En la siguiente etapa, la sustancia compuesta experimenta una termostatación (es decir, almacenamiento bajo condiciones de temperatura específicas) durante entre 1 y 30 días a entre 2 °C y 40 °C hasta que la porción de platino sin unir cae por debajo del 10 % de su cantidad original y se logra la formación del complejo entre el compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II) y el polímero.

En una etapa final, la sustancia compuesta experimenta una purificación para obtener un producto apto para su aplicación farmacéutica. La purificación puede comprender uno o más procedimientos de purificación tales como esterilización por filtración, en autoclave o por radiación.

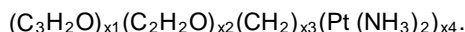
En la sustancia compuesta, el platino es encapsulado o forma un complejo con una de las siguientes estructuras de ácidos benzenopolicarboxílicos:



donde las estructuras a, b, c y d representan partes de componentes aromáticos y la estructura e representa una parte de los componentes alifáticos anteriormente citados.

La presencia de estas estructuras queda demostrada por bandas de absorción IR características a 3400-3600 cm<sup>-1</sup>, 2800-3000 cm<sup>-1</sup>, 1500-1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup>, 1250-1300 cm<sup>-1</sup> y 1050 cm<sup>-1</sup>. Si bien, la intensidad de los picos a 3400-3600 cm<sup>-1</sup>, 1500-1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup> y 1250-1300 cm<sup>-1</sup> es menor que la del compuesto polimérico de ácidos benzenopolicarboxílicos debido a la formación de enlaces entre el polímero y el platino.

La fórmula empírica de la sustancia compuesta que contiene platino se estableció usando los métodos de RMN <sup>13</sup>C (fórmula bruta) y RMN 2D, de acuerdo con los cuales está compuesta por fragmentos individuales del polímero repetidos: (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O), (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O), (CH<sub>2</sub>). Debido al hecho de que en las soluciones el compuesto polimérico existe solo en forma de micelas coloidales es difícil establecer su verdadera masa molecular. La fórmula molecular exacta del polímero no se ha establecido todavía y, por tanto, no se pueden ejemplificar coeficientes más específicos en su fórmula bruta. De acuerdo con la presente descripción, la composición de la sustancia compuesta que contiene platino se representa por la siguiente fórmula general:



En ella, se respetan las siguientes relaciones estequiométricas para  $x_4=1$ ,  $x_1 \leq 12$ ,  $x_2 \leq 9$  y  $x_3 \leq 33$ . Esta fórmula bruta describe un fragmento de 1500-2000 Da de la sustancia compuesta. Cuando se obtiene una sustancia compuesta de mayor o menor peso molecular, los coeficientes  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  y  $x_4$  se cambian proporcionalmente. En ella, siguen siendo números naturales positivos enteros o fraccionarios.

La mejor modalidad del método de preparación de la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico y un compuesto de platino se describe en el Ejemplo 2.

La presente descripción también se refiere a un fármaco que comprende el compuesto polimérico y un compuesto de platino (II).

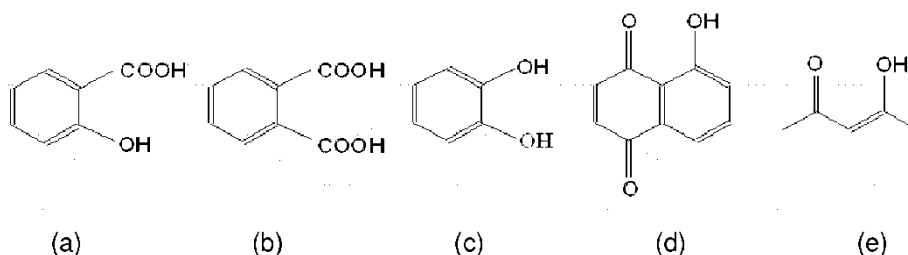
La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el fármaco a base del compuesto polimérico y un compuesto de platino (II). Esta composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más excipientes adicionales. Preferentemente, el uno o más excipientes adicionales se seleccionan del grupo constituido por los antiadherentes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, disgregantes, diluyentes, solventes/cosolventes, saborizantes, colorantes, lubricantes, deslizantes, sorbentes, edulcorantes, vehículos, polímeros para liberación moderada de API, polímeros para protección de API, agentes amortiguadores, antioxidantes, agentes humectantes, agentes antiespumantes, agentes espesantes, humectantes y mezclas de los mismos.

El fármaco y la composición farmacéutica que comprende el fármaco se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad tal como en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama metastásico. Entre los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se incluyen, pero no se limitan a, el cáncer de mama, el cáncer pancreático, el cáncer de la vejiga urinaria, el cáncer de próstata, el cáncer de colon y el cáncer de cabeza y cuello. El fármaco y la composición farmacéutica también se pueden usar en la profilaxis o cuidados paliativos de un mamífero que padezca cáncer o para la modificación de dicho cáncer. Por el término "modificación de dicho cáncer", tal y como se usa en la presente patente, se entiende la situación en la que el fármaco no garantiza un efecto anticancerígeno directo, pero afecta al desarrollo de la enfermedad y/o cambios en la calidad de vida del paciente con cáncer. El fármaco puede ser administrado por cualquiera de las vías habituales de administración, pero la vía de administración preferente es la parenteral, enteral o tópica y en el caso de la administración parenteral, se prefieren las inyecciones intramusculares. Los mamíferos a tratar en una de las formas de realización son especies no productoras de alimentos. Preferentemente, dichas especies no productoras de alimentos se pueden seleccionar entre seres humanos, perros, gatos y caballos.

Cuando se usan en el tratamiento del cáncer, las composiciones farmacéuticas basadas en la sustancia compuesta garantizan una inhibición significativa del crecimiento tumoral en los ensayos preclínicos y clínicos en seres humanos (Ejemplo 3).

Los presentes inventores también obtuvieron un rango de sustancias compuestas basadas en el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno. Preferentemente, el compuesto de molibdeno se seleccionó entre las sales de ácidos de molibdeno tales como molibdato amónico, molibdato amónico tetrahidratado, molibdato potásico, molibdato sódico, molibdato sódico dihidratado y mezclas de los mismos.

En la sustancia compuesta, el molibdeno es encapsulado o forma un complejo con una de las siguientes estructuras de ácidos bencenopolicarboxílicos:

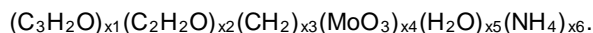


donde las estructuras a, b, c y d representan partes de componentes aromáticos y la estructura e representa una parte de los componentes alifáticos anteriormente citados.

La presencia de estas estructuras queda demostrada por las bandas de absorción IR características a  $3400-3600\text{ cm}^{-1}$ ,  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250-1300\text{ cm}^{-1}$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$ . En esa intensidad de los picos a  $3400-3600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$  y  $1250-1300\text{ cm}^{-1}$  es menor que la del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos debido a la formación de enlaces entre el polímero y el molibdeno.

De acuerdo con la presente descripción, la composición de la sustancia compuesta que contiene molibdeno se

puede representar por la siguiente fórmula general:



- 5 En ella, se respetan las siguientes relaciones estequiométricas para  $x_4=1,5$ ,  $x_1 \leq 12$ ,  $x_2 \leq 9$  y  $x_3 \leq 33$ ,  $x_5 \leq 2$  y  $x_6 \leq 2$ . Esta fórmula bruta describe un fragmento de 1500-2000 Da de la sustancia compuesta. Cuando se obtiene una sustancia compuesta de mayor o menor peso molecular, los coeficientes  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$ ,  $x_5$  y  $x_6$  se cambian proporcionalmente. En ella, siguen siendo números naturales positivos enteros o fraccionarios.
- 10 La presente descripción también está dirigida a un procedimiento de preparación de la sustancia compuesta de acuerdo con la presente descripción. De acuerdo con la presente descripción, tal sustancia compuesta, que comprende el compuesto polimérico de la presente descripción y un compuesto de molibdeno, se puede obtener por exposición de la sustancia a radiaciones de onda y, más concretamente, a tratamiento con ultrasonidos con densidad de potencia en el rango de 0,5 - 5 W/cm<sup>3</sup> y frecuencia en el rango de 18 - 66 kHz durante entre 1 y 30 minutos hasta que el contenido de molibdeno no unido (es decir, molibdeno que no ha reaccionado con el polímero) cae por debajo del 25 % de su cantidad original.
- 15 En la siguiente etapa, la sustancia compuesta experimenta una termostatación (es decir, almacenamiento bajo condiciones de temperatura específicas) durante entre 1 y 30 días a entre 2 °C y 40 °C hasta que la porción de molibdeno sin unir cae por debajo del 10 % de su cantidad original y se logra la formación del complejo entre el compuesto de molibdeno y el polímero.
- 20 En la etapa final, la sustancia compuesta experimenta una purificación para obtener un producto apto para su aplicación farmacéutica. La purificación puede comprender uno o más procedimientos de purificación tales como esterilización por filtración, en autoclave o por radiación.
- 25 La mejor modalidad del método de preparación de la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico y un compuesto de molibdeno se describe en el Ejemplo 4.
- 30 La presente descripción también se refiere a un fármaco que comprende el compuesto polimérico y un compuesto de molibdeno.
- La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el fármaco del compuesto polimérico y el compuesto de molibdeno. Esta composición farmacéutica puede comprender
- 35 opcionalmente uno o más excipientes adicionales. Preferentemente, el uno o más excipientes adicionales se seleccionan del grupo constituido por los antiadherentes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, disgregantes, diluyentes, solventes/cosolventes, saborizantes, colorantes, lubricantes, deslizantes, sorbentes, edulcorantes, vehículos, polímeros para liberación moderada de API, polímeros para protección de API, agentes amortiguadores, antioxidantes, agentes humectantes, agentes antiespumantes, agentes espesantes y humectantes.
- 40 El fármaco y la composición farmacéutica que comprende el fármaco se pueden usar en el tratamiento de un mamífero que padezca una enfermedad derivada de alteraciones del ciclo celular tal como, por ejemplo, la carcinogénesis inducida por radiación o causada por el envejecimiento natural de las células.
- 45 El fármaco y la composición farmacéutica también se pueden usar en los cuidados paliativos de un mamífero que padezca una enfermedad derivada de alteraciones del ciclo celular tal como, por ejemplo, la carcinogénesis inducida por radiación o causada por el envejecimiento natural de las células, o para la modificación de dicha enfermedad. Por el término "modificación de dicha enfermedad", tal y como se usa en la presente patente, se entiende la situación en la que el fármaco no garantiza una cura directa pero afecta al desarrollo de la enfermedad y/o cambios
- 50 en la calidad de vida del paciente. El fármaco puede ser administrado por vía oral. Los mamíferos a tratar en una de las formas de realización son especies no productoras de alimentos. Preferentemente, dichas especies no productoras de alimentos se pueden seleccionar entre seres humanos, perros, gatos y caballos.
- El ejemplo 5 describe los resultados de los estudios de una composición farmacéutica que comprende el compuesto polimérico y el compuesto de molibdeno, donde dicha composición farmacéutica se usa para inducir respuesta celular.

## EJEMPLOS

La descripción se ilustra además con referencia a los siguientes ejemplos.

**Ejemplo comparativo 1A: Método de producción de ácidos húmicos tal y como se describe en la patente RU2182482 y caracterización de dicho compuesto**

5

Con fines comparativos, los ácidos húmicos conocidos de acuerdo con el ejemplo 1 de la patente rusa RU 2182482 se prepararon y caracterizaron tal y como se describe a continuación.

**Preparación**

10

Hidrolizado de lignina - se usó como material de partida un sorbente enteral inespecífico (disponible bajo el nombre comercial de "Polyphepanum", Scientek Ltd).

Se trató una solución de 1 kg de material de partida, 100 g de hidróxido de sodio y 8,1 kg de agua durante una hora en un reactor de oxidación equipado con un mecanismo de agitación mecánica a una temperatura de 160 °C, una presión de 2,5 MPa y con suministro de oxígeno en una cantidad de 5 l/min. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se eliminó el residuo sólido por filtración. El pH del filtrado, una solución alcalina que contiene sustancias húmicas, se ajustó a 2-3 usando ácido sulfúrico. Se aislaron los residuos de los ácidos húmicos mediante filtración y se enjuagaron sucesivamente con agua destilada y una mezcla de alcohol y agua hasta que se obtuvo un pH de 6,0-6,5. A continuación, se secó el producto resultante a una temperatura de 105 °C hasta que se obtuvo una masa homogénea.

**Caracterización**

25 Los ácidos húmicos preparados tal y como se describe anteriormente se caracterizaron como sigue.

Cenizas (impurezas minerales): 13,5 %

Composición elemental: C 67,0 %, H 4,0 %, N 1,0 %, O 0,28 %

Impurezas de bajo peso molecular: identificadas por los siguientes picos RMN <sup>13</sup>C: 168,5 ppm (anión carbonato), 171 (anión formato), 173 (anión oxalato), 181-182 ppm (anión acetato). La cantidad total de impurezas identificadas constituyó un 4,1 % del peso seco.

La estructura de los ácidos húmicos se analizó mediante RMN <sup>13</sup>C. El resultado se presenta en la Tabla 1 a continuación y en la Figura 1.

35

Tabla 1: Resultado del análisis por RMN <sup>13</sup>C

INTENSIDADES INTEGRALES, %± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
0-48	108-145	165-187	187-200
18,0±2,5	29,0±2,1	13,0±0,3	8,0±3

**Ejemplo 1B: Método de producción del compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y caracterización de dicho compuesto**

40

**Preparación**

Hidrolizado de lignina - se usó como material de partida un sorbente enteral inespecífico (disponible bajo el nombre comercial de "Polyphepanum", Scientek Ltd).

45

Este material de partida tiene las siguientes características físico-químicas: pH de 6,5, contenido de humedad del 66,63%, contenido de polisacáridos igual al 25%, contenido de lignina igual al 72,5%, compuestos hidrosolubles iguales al 1,5% del peso seco.

50

Etapa a: Se colocaron 0,998 kg de Polyphepanum en un recipiente de 15 litros y se añadieron 6 kg de agua destilada. Se agitó la mezcla exhaustivamente.

Etapa b: Se añadieron de forma intermitente aproximadamente 2 litros de una solución de hidróxido de sodio al 50 % a la mezcla de la etapa a para obtener un pH de 13. A continuación, se sometió la suspensión a tratamiento alcalino en un reactor de destrucción oxidativa-hidrolítica de 10 litros. Cuando la temperatura y la presión alcanzaron los 160

55

°C y 2,2 MPa respectivamente, se redujo el suministro de aire a 5 dm<sup>3</sup>/min y se continuó el tratamiento durante 2 horas más para garantizar la hidrólisis y oxidación completas de la lignina insoluble. A continuación, el producto resultante, una solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos, se aisló del residuo sólido mediante un filtro prensa.

5

Etapa c: A continuación, se trató la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos obtenida en la etapa b con ácido clorhídrico hasta que se obtuvo un pH de 1-2 y, a continuación, se sometió al efecto de fuerzas centrífugas durante 15 minutos a 2500 rpm para inducir la polimerización de los ácidos bencenopolicarboxílicos mediante el gradiente de densidad. Así, se obtuvo el polímero crudo densificado de ácidos bencenopolicarboxílicos.

10

Etapa d: A continuación, se colocó el polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos en tubos de diálisis de 3,5 kDa y se dializó contra agua destilada hasta que la cantidad de impurezas de bajo peso molecular, detectadas con RMN <sup>13</sup>C u otro método representativo (por ejemplo, cromatografía de gases), alcanzó el 1 % del peso seco del polímero. Se obtuvo el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado final.

15

A continuación, se secó el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado final para su posterior caracterización.

**Caracterización**

20 El polímero obtenido en la etapa d se caracterizó como sigue.

**Descripción:** cristales negros.

**Identidad:** bandas de absorción del espectro IR a: 3400-3600 cm<sup>-1</sup> (OH), 1050 cm<sup>-1</sup> (C-O), 1250-1300 cm<sup>-1</sup> (OH). La región de 2800-3000 cm<sup>-1</sup> contiene la banda de absorción con picos en 2928 y 2853 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a las vibraciones de valencia de los grupos CH- en el CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub>. Se identificó un pico de absorción más o menos expresado a 1750 cm<sup>-1</sup> correspondiente a las vibraciones de los grupos C=O. El espectro IR del polímero se presenta en la Figura 2.

**Residuo sólido:** 93,25 %.

**Cenizas (impurezas minerales):** 0,67 %.

30 **Cloruros:** por debajo de 0,03 %.

**Metales pesados:** por debajo de 0,001 %.

**Composición elemental:** C 62,5%, H 3,8%, N 0,18%, O 33,7%.

**Impurezas de bajo peso molecular:** se identificaron con los siguientes picos del espectro RMN <sup>13</sup>C: 168,5 ppm (anión carbonato), 171 (anión formato), 173 (anión oxalato), 181-182 ppm (anión acetato). La cantidad total de impurezas identificadas constituyó un 0,8 % del peso seco.

35

La estructura del compuesto polimérico se analizó mediante RMN <sup>13</sup>C. El resultado se presenta en la Tabla 2 a continuación y en la Figura 3.

40

Tabla 2: Resultado del análisis por RMN <sup>13</sup>C

INTENSIDADES INTEGRALES, %± DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
0-48	108-145	165-187	187-200
17,4±1,7	41,1±0,2	6,0±0,5	2,0±0

Asimismo, se obtuvieron los **espectros diméricos homo y heteronucleares** para el polímero de la presente descripción (Figura 4). Los resultados de la asignación de picos se presentan a continuación en la Tabla 3.

45

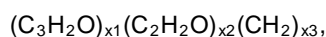
Tabla 3: Espectros diméricos homo y heteronucleares del polímero de la presente descripción.

F2 d (1H), ppm	F1 d (1H) o d (13C), ppm	Fragmentos estructurales	Descripción
<b><sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY</b>			
1,2-1,5	1,2-1,5	-CH <sub>n</sub> -CH <sub>n</sub> -	Alquilo
1,2-1,8	3,7-4,2	-CH <sub>n</sub> -CH <sub>n</sub> O-	Alcoholes alifáticos
1,5-2,2	1,5-2,2	-CH <sub>n</sub> -CH <sub>n</sub> -C <sub>f</sub>	Alquilo, sustituido con anillos aromáticos o grupos carboxílicos
2,2-2,6	2,2-2,6	C <sub>f</sub> -CH <sub>n</sub> -CH <sub>n</sub> -C <sub>f</sub>	

2,2-2,3	3,7; 4,2	-CH <sub>n</sub> O-CH <sub>n</sub> -C <sub>f</sub>	Alcoholes alifáticos, sustituidos con anillos aromáticos o grupos carboxílicos
3,4-3,8	3,4-3,8	-CH <sub>n</sub> O-CH <sub>n</sub> O-	Alcoholes alifáticos
<b><sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-TOCSY</b>			
1,2-2,2	1,2-2,2	-CH <sub>n</sub> -...-CH <sub>n</sub> -	Alquilo
1,9-2,8	1,9-2,8	C <sub>f</sub> -CH <sub>n</sub> -...-CH <sub>n</sub> -C <sub>f</sub>	Alquilo, sustituido con anillos aromáticos o grupos carboxílicos
1,2-1,8	3,2-4,0	-CH <sub>n</sub> -...-CH <sub>n</sub> O-	Alcoholes alifáticos
2,9-3,9	2,9-3,9	-CH <sub>n</sub> O-...-CH <sub>n</sub> O-	
<b><sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC</b>			
1,1-1,9	17-32	CH <sub>n</sub>	Alquilo
1,7-2,4	32-42	CH <sub>n</sub> -C <sub>f</sub>	Alquilo, sustituido con anillos aromáticos o grupos carboxílicos
3,0-4,2	53-73	CH <sub>n</sub> O	Alcoholes alifáticos, metoxilo
7,2-7,8	110-130	C <sub>ar</sub> -OH	Fenólico

De acuerdo con los datos obtenidos del análisis por RMN, el polímero de esta descripción se puede caracterizar como un núcleo aromático sustituido por grupos alquilo, metoxilo, alcohol e hidroxilo, así como por grupos carboxilo prácticamente en todas las posiciones. Como se puede ver en la Tabla 3, de 4,5 a 6 átomos de carbono alifático 5 corresponden a 6 átomos de carbono de carbono aromático. Entonces, se repiten los siguientes fragmentos estructurales: (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O), (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O), (CH<sub>2</sub>).

El peso molecular del polímero reivindicado se analizó mediante el método de filtración en gel. El peso molecular de un fragmento del polímero reivindicado así establecido constituyó 1,5 kDa. Se calculó la siguiente fórmula estructural 10 en base al peso molecular, los datos de la composición elemental y el análisis por RMN:



donde  $x1 \leq 12$ ,  $x2 \leq 9$ ,  $x3 \leq 33$

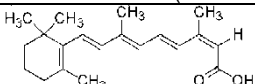
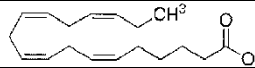

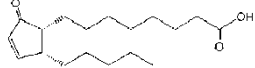

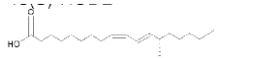
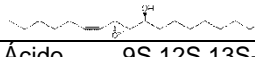
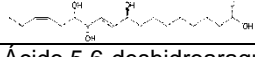
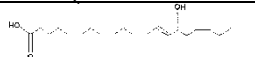
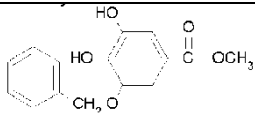
15

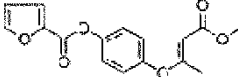
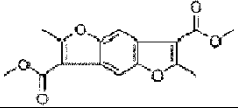
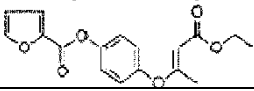
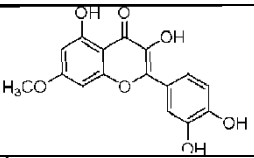
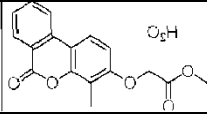
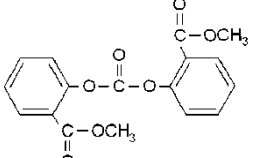
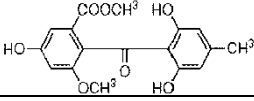
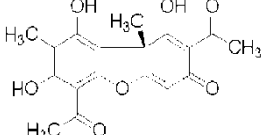
También se estudiaron los monómeros del polímero de la presente descripción mediante Espectrometría de masas de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR-MS) (Figura 5) (Tabla 4).

Tabla 4: Monómeros de gran abundancia identificados en el polímero de la presente descripción

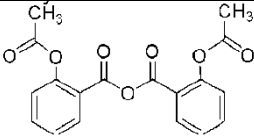
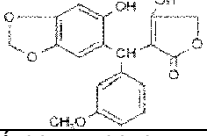
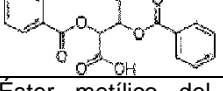
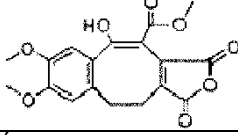
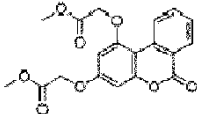
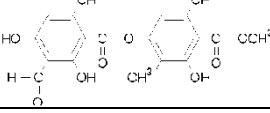
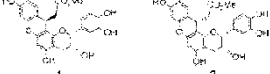
20

Masa	Ab.	DBE	O/C	H/C	Fórmula bruta	Nombre
<b>Ácidos carboxílicos e hidrocarboxílicos alifáticos saturados:</b>						
227,2017	28015291	1,5	0,143	2	C14H28O2	Tetradecanoico
255,2329	270821660	1,5	0,125	2	C16H32O2	Hexadecanoico (palmítico)
269,2486	59100516	1,5	0,118	2	C17H34O2	Heptadecanoico
271,2279	67014157	1,5	0,188	2	C16H32O3	Hidroxihexadecanoico
283,2642	82866764	1,5	0,111	2	C18H36O2	Octadecanoico (esteárico)
299,2592	19214471	1,5	0,167	2	C18H36O3	Hidroxiocadecanoico
311,2956	19002772	1,5	0,1	2	C20H39O2	Eicosanoico (araquídico)
315,2541	18526027	1,5	0,222	2	C18H36O4	Dihidroxiocadecanoico
327,2905	16100520	1,5	0,15	2	C20H39O3	Hidroxiieicosanoico
331,249	59016821	1,5	0,278	2	C18H36O5	Trihidroxiocadecanoico
339,3268	45615662	1,5	0,091	2	C22H44O2	Docosanoico (behénico)
353,3425	17780922	1,5	0,087	2	C23H46O2	Tricosanoico
355,3218	37040552	1,5	0,136	2	C22H44O3	Hidroxidocosanoico
367,3581	96229191	1,5	0,083	2	C24H48O2	Tetracosanoico (lignocérico)
381,3738	33496500	1,5	0,08	2	C25H50O2	Pentacosanoico (behénico)
383,3531	24354456	1,5	0,125	2	C24H48O3	Hidroxitetracosanoico
395,3894	47932385	1,5	0,077	2	C26H52O2	Hexacosanoico (cerotínico)
397,3687	5537977	1,5	0,12	2	C25H50O3	Hidroxipentacosanoico
<b>Ácidos carboxílicos e hidrocarboxílicos alifáticos monoinsaturados</b>						

253,2173	94496905	2,5	0,125	1,875	C16H30O2	Hexadecenoico
267,233	25781436	2,5	0,118	1,882	C17H32O2	Heptadecenoico
281,2486	464974220	2,5	0,111	1,889	C18H34O2	Octadecenoico (oleico)
297,2435	147552180	2,5	0,167	1,889	C18H34O3	Hidroxiocetadecenoico
309,2799	18244791	2,5	0,1	1,9	C20H38O2	Eicosenoico
313,2384	67067499	2,5	0,222	1,889	C18H34O4	Dihidroxiocetadecenoico
341,2697	20568853	2,5	0,2	1,9	C20H38O4	Dihidroxiicosenoico
345,2283	15144174	2,5	0,333	1,889	C18H34O6	Tetrahidroxiocetadecenoico
369,301	22943789	2,5	0,182	1,909	C22H42O4	Dihidroxidocosenoico
<b>Ácidos carboxílicos alifáticos poliinsaturados (gran abundancia):</b>						
299,2016	260077700	7,5	0,1	1,4	C20H28O2	13-cis-retinoico (isotretinoína)
						
275,2017	19416936	5,5	0,111	1,556	C18H28O2	Ácido estearidónico Ácido 6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoico Ácido all-cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico
						
277,2173	26976285	4,5	0,111	1,667	C18H30O2	Ácido γ-linolénico Ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico
						
293,2122	25597466	4,5	0,167	1,667	C18H30O3	Ácido (9R,13R)-2-oxo-5-pentil-3-ciclopenteno-1-octanoico
						
309,2071	20667567	4,5	0,222	1,667	C18H30O4	Ácido 9S-hidroperoxi-10E,12Z,15Z-octadecatrienoico
						
279,2329	90009812	3,5	0,111	1,778	C18H32O2	Ácido C13(S)-hidroxiocetadeca-9Z,11 E-dienoico 13(S)-HODE
						
311,2228	120864140	3,5	0,222	1,778	C18H32O4	Ácido 10S,11S-epoxi-9S-hidroxi-12Z-octadecenoico
						
327,2177	55125151	3,5	0,278	1,778	C18H32O5	Ácido 9S,12S,13S-trihidroxi-10E,15Z-octadecadienoico
						
301,2173	148273490	6,5	0,1	1,5	C20H30O2	Ácido 5,6-deshidroaraquidónico
						$C_1^2C^3C^4CH=CHC^5C^6C^7C^8C^9C^{10}C^{11}C^{12}C^{13}C^{14}C^{15}C^{16}C^{17}C^{18}C^{19}C^{20}$
317,2122	21897255	6,5	0,15	1,5	C20H30O3	Ácido 15(S)-hidroxi-(5Z,8Z,11Z,13E,17Z)-eicosapentanoico
						
<b>Componentes aromáticos (gran abundancia):</b>						
273,0769	17358509	9,5	0,333	0,933	C15H14O5	Éster metílico del ácido 3-benciloxi-4,5-dihidroxi-benzoico
						
299,0561	12935282	11,5	0,375	0,75	C16H12O6	Éster metílico del ácido 5-(furano-2-

						carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico
						
301,0718	54827333	10,5	0,375	0,875	C16H14O6	Éster dimetílico del ácido 2,6-dimetilbenzo(1,2-b,4,5-b')difurano-3,7-dicarboxílico
						
313,0718	10849880	11,5	0,353	0,824	C17H14O6	Éster etílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico
						
315,051	14450485	11,5	0,438	0,75	C16H12O7	Ramnetina
						
315,0874	33201977	10,5	0,353	0,941	C17H16O6	Éster metílico de ácido ((4-metil-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-il)oxi)acético hidrato
						
329,0667	14824822	11,5	0,412	0,824	C17H14O7	Carbonato de bis(2-(metoxycarbonil)fenil)
						
331,0823	29603426	10,5	0,412	0,941	C17H16O7	Sulocrina
						
343,0823	13065197	11,5	0,389	0,889	C18H16O7	2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetildibenzofurano-1,3(2H,9bH)-diona (+)-Ácido úsnico a partir de Usnea dasypoga
						
341,0667	11490045	12,5	0,389	0,778	C18H14O7	Anhídrido O-acetilsalicílico



						
355,0823	12398987	12,5	0,368	0,842	C19H16O7	4-ho-3-((6-ho-benzo(1,3)dioxol-5-il)-(3-metoxi-fenil)-metil)-5h-furan-2-ona
						
357,0616	10787448	12,5	0,444	0,778	C18H14O8	Ácido 2,3-bis-benzoiloxi-succínico
						
359,0773	11996010	11,5	0,444	0,889	C18H16O8	Éster metílico del ácido 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,3-dioxo-1,3,10,11-tetrahidrobenzo[5,6]cicloocta[1,2-c]furan-4-carboxílico
						
371,0772	15370496	12,5	0,421	0,842	C19H16O8	Éster metílico del ácido (1-metoxicarbonilmetoxi-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-iloxi)-acético
						
373,0929	13466093	11,5	0,421	0,947	C19H18O8	Atranorina
						
423,1085	10753758	14,5	0,348	0,87	C24H20O9	Epicatequinas fenilpropanoide-sustituidas
						

### Datos experimentales

El compuesto polimérico de ácidos benzenopolicarboxílicos de la presente descripción se diluyó además con agua 5 destilada para obtener diferentes concentraciones y se ensayaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) constituidas por linfocitos (70-80 %) y monocitos (20-30 %) aislados de la sangre de donantes sanos mediante centrifugación con Lymphoprep.

Se estableció que tras 15 días de incubación del cultivo celular que contenía 215 µg/L del compuesto polimérico de 10 ácidos benzenopolicarboxílicos de la presente descripción, estos últimos ejercían un efecto sobre las PBMC que se manifestaba en forma de incremento de la motilidad de los linfocitos, así como de incremento de la permanencia de los monocitos, tal y como se ilustra en la Figura 7.

**Ejemplo 2A: Método de preparación de un agente anticancerígeno de acuerdo con la patente RU2182482 y 15 caracterización de dicho agente anticancerígeno**

**Preparación**

Se trataron los ácidos húmicos preparados en el Ejemplo 1A de acuerdo con el método descrito en la patente RU2182482 con una solución de amoníaco al 5 % en una cantidad de 80 ml por 1 g de ácidos húmicos, se calentaron al baño maría para eliminar el exceso de amoníaco, se filtraron y se mezclaron con un 30 % en volumen de agua destilada. Además, la solución resultante en forma de sales de ácidos húmicos se trató con tetracloroplatinato de potasio en una cantidad del 0,27 % en masa por 1 g de sales de ácidos húmicos y se expuso a cavitación acústica a 40 W/cm<sup>2</sup> y 22 kHz durante 4 minutos. Se usó agua para ajustar el volumen de la solución a 100 ml.

**EXPERIMENTO 2A-1**

El agente anticancerígeno así obtenido se administró subcutáneamente en una cantidad de 62,5 mg/kg de peso corporal a ratones a los que se había inoculado el tumor de Ehrlich. El tumor se inoculó subcutáneamente en una cantidad de 10<sup>7</sup> células. El tratamiento se inició 48 horas después de la inoculación del tumor. Se administraron inyecciones de 0,3 ml/ratón tres veces a la semana durante 3 semanas (un total de 9 inyecciones). Se administró una solución isotónica de cloruro sódico al grupo de referencia de acuerdo con el mismo régimen de dosificación. En el experimento, se registró un 60 % de supervivencia (6 de cada 10 animales) y un 50 % de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo que no recibió tratamiento.

La mortalidad de los animales fue causada por la toxicidad del compuesto de platino no unido a los ácidos húmicos.

**Ejemplo 2B: Método de producción de la sustancia compuesta que comprende platino (II) y caracterización de dicha sustancia compuesta****Preparación**

Etapa a: Se diluyeron 4,529 gramos de polímero seco producido por el método descrito en el Ejemplo 1B en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 9.2 con una solución de amoníaco al 10 %. Se añadieron 0,8373 g de cis-diaminodichloroplatino(II) a la solución. La solución resultante se sometió a tratamiento con ultrasonidos a 3,5 W/cm<sup>3</sup> y 22 kHz hasta que el contenido de platino sin unir cayó por debajo del 25 % de la cantidad original.

**Método de detección del platino sin unir**

La formación de la totalidad del complejo de platino se controló mediante membranas de diálisis de celulosa con poros estándar de 500-1000 Da. El tamaño de los poros hace posible que el compuesto de platino penetre a través de la membrana, mientras que evita que el polímero de 1500 Da reivindicado y, por consiguiente, su complejo con el platino lo hagan.

Para llevar a cabo el ensayo, se llenaron tubos de diálisis con muestras de 8 ml de la sustancia compuesta recogida durante el tratamiento con ultrasonidos y se sumergieron en recipientes llenos de agua destilada durante 4 horas para acondicionar la diálisis.

Se diluyeron 0,8373 g of cis-diaminodichloroplatino(II) en 1 litro de agua destilada para obtener la solución modelo (solución de referencia). Se consideró que la cantidad de platino transferida desde la solución modelo al dializado era del 100 %.

La concentración de platino libre medida en el dializado de la solución modelo constituyó 76 mg/l (100 %), mientras que la concentración del mismo en el dializado de la sustancia compuesta de esta descripción constituyó 18 mg/l (24 %).

Etapa b: Además, se sometió la mezcla de reacción, que comprendía el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos y cis-diaminodichloroplatino(II), a termostatación a 40 °C durante 24 horas para acondicionar la finalización de la formación del complejo deseado. Se continuó la termostatación hasta que la concentración de platino sin unir (establecida con el método anteriormente descrito) cayó por debajo del 10 % de la cantidad añadida en la etapa a.

Etapa c: Además, se purificó la sustancia compuesta cruda del paso b de inclusiones mecánicas mediante un filtro

de polipropileno de 10,0 µm y, a continuación, se usó para la preparación de la composición farmacéutica tal y como se describe en el Ejemplo 3.

### **EXPERIMENTO 2B-1**

5 La sustancia compuesta así obtenida se administró subcutáneamente en una cantidad de 62,5 mg/kg de peso corporal a animales a los que se había inoculado el tumor de Ehrlich. El tumor se inoculó subcutáneamente en una cantidad de  $10^7$  células. El tratamiento se inició 48 horas después de la inoculación del tumor. Se administraron inyecciones de 0,3 ml/ratón tres veces a la semana durante 3 semanas (un total de 9 inyecciones). Se administró  
10 una solución isotónica de cloruro sódico al grupo de referencia de acuerdo con el mismo régimen de dosificación. En el experimento, se registró un 100% de supervivencia (10 de cada 10 animales) y un 65% de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo que no recibió tratamiento.

La mayor seguridad y eficacia de la sustancia compuesta en comparación con el agente anticancerígeno de la  
15 patente RU2182482 fueron el resultado de un mejor complejamiento del compuesto de platino con la sustancia compuesta reivindicada.

### **Caracterización**

20 La formación del novedoso complejo del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos con cis-diaminodicloroplatino(II) se investigó además mediante análisis de la estructura fina del espectro de absorción de rayos X en la región extendida (EXAFS) (véase la Figura 6). En el espectro EXAFS se pueden ver diferencias significativas entre la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos de la presente descripción y el cis-diaminodicloroplatino (II), el cis-diaminodicloroplatino (II)  
25 inorgánico (denotado en el espectro como "Cisplatino") y el cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino (II) (denotado en la figura como "Carboplatino").

La sustancia polimérica de la presente descripción está caracterizada por las siguientes bandas de absorción características en el espectro IR:  $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1410 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1250 - 1300 \text{ cm}^{-1}$   
30  $^1$  y  $1050 \text{ cm}^{-1}$ , donde la intensidad de las bandas  $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1410 \text{ cm}^{-1}$  y  $1250-1300 \text{ cm}^{-1}$  de la sustancia compuesta es menor que la del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos.

En base a los datos extraídos con los métodos RMN  $^{13}\text{C}$  y EXAFS, se calculó la siguiente fórmula bruta de la sustancia compuesta:  $(\text{C}_3\text{H}_2\text{O})_{x1}(\text{C}_2\text{H}_2\text{O})_{x2}(\text{CH}_2)_{x3}(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2)_{x4}$ , donde  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  y  $x_4$  son los coeficientes que  
35 representan a cualquier número natural positivo entero o fraccionario.

**Ejemplo 3: Descripción de los datos clínicos y no clínicos que respaldan el uso de la composición farmacéutica basada en la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de Pt y caracterización de la misma**

### **Preparación**

Se usó la sustancia compuesta al 0,5% preparada de acuerdo con el Ejemplo 2B como base para la obtención de la composición farmacéutica que comprende asimismo excipientes tales como el solvente en forma de solución isotónica de cloruro sódico para obtener la composición farmacéutica al 0,05 % y el agente amortiguador en forma de ácido clorhídrico para obtener un pH de 7 a 8. La composición farmacéutica se obtuvo mediante agitación mecánica de la sustancia compuesta y los excipientes con monitorización constante del pH. Asimismo, se purificó la composición farmacéutica mediante esterilización por filtración.

50 La composición farmacéutica así obtenida se puede usar para administración parenteral (subcutánea o intramuscular).

### **Caracterización**

La composición farmacéutica se caracterizó por los métodos descritos en la 6ª edición de la Farmacopea Europea  
55 como sigue:

**Descripción:** líquido transparente y marrón oscuro.

**pH:** 7,27.

**Identidad:** bandas características de absorción IR a  $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1410 \text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup>, 1250 - 1300 cm<sup>-1</sup> y 1050 cm<sup>-1</sup>, con intensidad de los picos en 3400 - 3600 cm<sup>-1</sup>, 1500 - 1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup> y 1250 - 1300 cm<sup>-1</sup> menor que la del compuesto polimérico de ácidos benceno policarboxílicos.

**Contenido de Pt:** 0,0049 %.

**Esterilidad:** estéril.

5 **Toxicidad:** no tóxica a 0,1 mg por ratón.

**Pirogenicidad:** no pirogénica en dosis de 1,3 mg/kg de peso corporal, intramuscular (ensayo en conejos).

**Datos no clínicos:**

10 Se evaluó la eficacia antitumoral de la composición farmacéutica reivindicada en tumores mamarios espontáneos autóctonos en hembras de ratón HER-2/neu caracterizadas por elevados niveles de expresión del oncogen HER-2/neu, del factor de crecimiento epidérmico y alta probabilidad de desarrollo espontáneo de neoplasias mamarias múltiples.

15 De acuerdo con el diseño elegido, cuando el diámetro de los tumores mamarios había crecido hasta alcanzar por lo menos 5 mm, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de referencia y grupos experimentales. La composición farmacéutica reivindicada se inyectó subcutáneamente en dos dosis (62,5 mg/kg de peso corporal y 3,0 mg/kg de peso corporal) 3 veces a la semana hasta la muerte de los animales.

20 Los porcentajes de remisión a los 7 - 14 días en animales tratados con 62,5 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal de la composición farmacéutica reivindicada constituyeron el 13 % y el 12 % respectivamente (los resultados fueron estadísticamente significativos) frente al 0 % del grupo de referencia. Este es un buen indicio de la eficacia de la composición farmacéutica reivindicada en el tratamiento de tumores mamarios que se puede extrapolar a los seres humanos y a las especies no productoras de alimentos.

25

**Datos clínicos**

Se llevó a cabo un estudio clínico en fase Ib de la composición farmacéutica reivindicada en 8 pacientes con cáncer de mama metastásico. Se administró a los pacientes 1 inyección diaria del fármaco durante 32 días. La ventana de dosificación acumulativa evaluada constituyó desde 0,96 mg/kg de peso corporal a 1,12 mg/kg de peso corporal.

Se obtuvieron los siguientes resultados usando la composición farmacéutica reivindicada: 1 respuesta completa (desaparición de todas las metástasis), 1 respuesta parcial (más del 25 % de reducción de la magnitud de las metástasis), 3 estabilizaciones de la enfermedad (cambios de la magnitud de las metástasis entre el -25 % y el 25 %) y 3 progresiones de la enfermedad (más del 25 % de aumento de la magnitud de las metástasis).

Estos resultados son un buen indicio de la eficacia clínica de la composición farmacéutica reivindicada en el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

40 En total, se registraron 78 eventos adversos en el estudio. Ninguno de los eventos adversos registrados fue grave. Los eventos adversos fueron principalmente de leves a moderados y solo un 2 % de los 78 eventos adversos estuvieron relacionados con la composición farmacéutica reivindicada.

Además, se observó una reducción del número de efectos secundarios en respuesta a un incremento de la dosis de tratamiento de la composición farmacéutica reivindicada. Este dato es un buen indicio de la excelente seguridad de la composición farmacéutica reivindicada y de su potencial en las terapias paliativas de, por ejemplo, los pacientes terminales.

Asimismo, se estableció que la composición farmacéutica reivindicada ayuda a la normalización de los parámetros sanguíneos. Así, al final del periodo de seguimiento se normalizaron los siguientes parámetros sanguíneos: hemoglobina en 2 de los 4 pacientes, eritrocitos en 2 de los 3 pacientes, trombocitos en 1 de los 3 pacientes, leucocitos en 3 de los 5 pacientes, neutrófilos en 3 de los 3 pacientes y linfocitos en 1 paciente, en comparación con los niveles registrados en el cribado.

55 Este dato es un buen indicio de que la composición farmacéutica reivindicada se puede usar eficientemente para la modificación de la enfermedad principal, por ejemplo, el cáncer.

**Ejemplo 4: Método de producción de la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno y caracterización de dicha**

**sustancia compuesta**

Etapa a: Se diluyeron 15 gramos de polímero seco producido por el método descrito en el Ejemplo 1B en 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 9,2 usando aproximadamente 15 ml de una solución de amoníaco al 10 %.

- 5 Además, se calentó la solución a 60 °C y se agitó durante 1,5 horas para eliminar el exceso de amoníaco. Se añadieron 5 g de molibdato amónico tetrahidratado y la solución resultante se sometió a tratamiento con ultrasonidos a 3,5 W/cm<sup>3</sup> y 22 kHz hasta que el contenido de molibdeno sin unir cayó por debajo del 25 % de la cantidad original.

**Método de detección del molibdeno sin unir:**

10

La formación de la totalidad del complejo de molibdeno se controló mediante membranas de diálisis de celulosa con poros estándar de 500 - 1000 Da. El tamaño de los poros hace posible que el compuesto de molibdeno penetre a través de la membrana, mientras que evita que el polímero de 1500 Da reivindicado y, por consiguiente, su complejo con el molibdeno lo hagan.

15

Para llevar a cabo el ensayo, se llenaron tubos de diálisis con muestras de 8 ml de la sustancia compuesta recogida durante el tratamiento con ultrasonidos y se sumergieron en recipientes llenos de agua destilada durante 4 horas para acondicionar la diálisis.

- 20 Se diluyeron 5 g de molibdato amónico tetrahidratado en 1 litro de agua destilada para obtener la solución modelo (solución de referencia). Se consideró que la cantidad de molibdeno transferida desde la solución modelo al dializado era del 100 %.

La concentración de molibdeno libre/sin unir en el dializado de la solución modelo constituyó 52 mg/l (100 %),  
25 mientras que la concentración del mismo en el dializado de la sustancia compuesta constituyó 11 mg/l (21%).

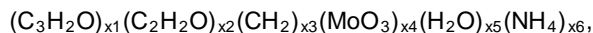
- Etapa b: Además, se sometió la sustancia compuesta, que comprende el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos y molibdato amónico tetrahidratado, a termostatación a 40 °C durante 24 horas para acondicionar la completa formación del complejo deseado. Se continuó la termostatación hasta que la  
30 concentración de molibdeno sin unir (establecida con el método antes descrito) cayó por debajo del 10 % de la cantidad añadida en la etapa a.

Etapa c: La sustancia compuesta cruda del paso b se purificó de inclusiones mecánicas mediante un filtro de polipropileno de 10,0 µm y se usó para la preparación de la composición farmacéutica tal y como se describe en el  
35 Ejemplo 5.

**Caracterización**

- La sustancia compuesta se caracteriza por las siguientes bandas de absorción características en el espectro IR:  
40 3400 - 3600 cm<sup>-1</sup>, 2800 - 3000 cm<sup>-1</sup>, 1500 - 1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup>, 1250 - 1300 cm<sup>-1</sup> y 1050 cm<sup>-1</sup>, donde la intensidad de las bandas 3400 - 3600 cm<sup>-1</sup>, 1500 - 1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup> y 1250 - 1300 cm<sup>-1</sup> de la sustancia compuesta es menor que la del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos.

En base a los datos extraídos con el método RMN <sup>13</sup>C, se calculó la siguiente fórmula bruta de la sustancia  
45 compuesta:



donde x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>, x<sub>4</sub>, x<sub>5</sub> y x<sub>6</sub> son los coeficientes que representan cualquier número natural, positivo, entero o  
50 fraccionario.

**Ejemplo 5: Descripción de los datos experimentales que respaldan el uso de la composición farmacéutica basada en la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos policarboxílicos y un compuesto de molibdeno y caracterización de la misma**

55

**Preparación**

Se usó la sustancia compuesta preparada de acuerdo con el Ejemplo 4 como base para la obtención de la composición farmacéutica que comprende asimismo agua destilada como solvente. Para ello, se mezcló un 0,55 %

de la sustancia compuesta con agua destilada en una proporción de 1:40 y se agitó mecánicamente. La composición farmacéutica así obtenida se puede usar para administración peroral.

### **Caracterización**

5 La composición farmacéutica se caracterizó por los métodos descritos en la 6ª edición de la Farmacopea Europea como sigue:

**Descripción:** líquido no transparente y marrón claro.

10 **pH:** 8,27.

**Identidad:** IR con bandas de absorción en: las regiones 3400 - 3600  $\text{cm}^{-1}$ , 2800 - 3000  $\text{cm}^{-1}$ , 1500 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ , 1410  $\text{cm}^{-1}$ , 1250 - 1300  $\text{cm}^{-1}$  y 1050  $\text{cm}^{-1}$  con intensidad de las bandas 3400 - 3600  $\text{cm}^{-1}$ , 1500 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ , 1410  $\text{cm}^{-1}$  y 1250 - 1300  $\text{cm}^{-1}$  de la composición farmacéutica menor que la del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos.

15 **Carga biológica:** inferior a 100 cfu/g.

**Toxicidad:** no tóxica en dosis de 0,1 mg por ratón.

**Pirogenicidad:** no pirogénica en dosis de 1,3 mg/kg de peso corporal, intramuscular (ensayo en conejos).

### **Datos experimentales**

20 La composición farmacéutica basada en la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno se diluyó además con agua destilada para obtener diferentes concentraciones y se ensayaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) constituidas por linfocitos (70-80 %) y monocitos (20-30 %) aislados de la sangre de donantes sanos mediante  
25 centrifugación con Lymphoprep.

Se estableció que tras 11 días de incubación del cultivo celular que contenía 35 y 215  $\mu\text{g/L}$  de la composición farmacéutica, estos últimos ejercían un efecto sobre las PBMC que se manifestaba en forma de incremento de la motilidad de los linfocitos, así como incremento de la permanencia de los monocitos.

30

En la misma serie de experimentos se evaluó el efecto de la composición farmacéutica en un panel de citoquinas producidas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se estableció que tras 11 días de incubación del cultivo celular, la producción de IFN-gamma había crecido desde 0 - 75  $\text{pg/ml}$  en el grupo de referencia hasta 2000 - 3000  $\text{pg/ml}$  en los grupos tratados con la composición farmacéutica y que la producción de TNF-alfa había  
35 crecido desde 0 en el grupo de referencia hasta 400 - 650  $\text{pg/ml}$  en grupos tratados con la composición farmacéutica.

Este dato es un buen indicio de que la composición farmacéutica se puede usar eficazmente para la profilaxis y tratamiento de enfermedades derivadas de alteraciones del ciclo celular (por ejemplo, la carcinogénesis inducida por  
40 radiación o causada por el envejecimiento natural de las células).

**Ejemplo 6: Descripción de los datos experimentales que respaldan el uso clínico de una composición farmacéutica basada en la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno en la reducción/minimización de los efectos  
45 secundarios derivados de la radioterapia y quimioterapia convencionales**

### **Características del paciente:**

50 El paciente de este estudio fue una mujer de 64 años con un largo historial de problemas gastrointestinales. Se le diagnosticó cáncer de colon con metástasis a los ganglios linfáticos en mayo de 2012 y se recomendó cirugía, que fue llevada a cabo en junio del mismo año. Por diferentes circunstancias, tuvo que volver a ser operada dos veces. La paciente fue evaluada por primera vez para empezar la quimioterapia a finales de agosto.

### **Resultados y procedimiento:**

55 Los resultados de laboratorio correspondientes a la primera evaluación detectaron un nivel de albúmina sérica considerablemente bajo en combinación con niveles bajos de hemoglobina, leucocitos, granulocitos neutrófilos y linfocitos. Asimismo, el análisis del laboratorio detectó niveles reducidos de eosinófilos, ALT, AST y fosfatasas alcalinas (Tabla 5). El oncólogo responsable evitó el inicio de la quimioterapia y se tuvo que llevar a cabo una nueva evaluación en un plazo máximo de dos semanas. Durante este periodo, se administraron diariamente a la paciente

20 ml de una composición farmacéutica que comprendía el nuevo complejo de ácidos bencenopolicarboxílicos y molibdeno. La composición se administró oralmente. Los resultados de laboratorio tomados en la segunda evaluación mostraron una normalización de la albúmina y un incremento considerable de los niveles de hemoglobina, leucocitos, granulocitos neutrófilos, linfocitos y eosinófilos. Asimismo, se incrementaron los niveles de ALT y AST. Se empezó la quimioterapia inmediatamente.

**Tratamiento de quimioterapia:**

La paciente recibió inyecciones en periodos de dos días 12 veces, con un periodo de descanso de dos semanas entre cada tratamiento de quimioterapia. Se tomaron muestras de sangre para su análisis en el laboratorio tras cada tratamiento. Asimismo, la paciente rellenó el cuestionario C-30 de Calidad de Vida (QoL) en la parte intermedia de algunos de los periodos de descanso.

La paciente recibió 20 ml de la composición de la presente descripción por vía oral (es decir, la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno) dos semanas antes y la primera semana después del primer periodo de inyecciones de dos días.

Una semana antes y una semana después del segundo periodo de inyecciones, no estaba disponible ninguna composición de la presente descripción. Se reinició el tratamiento con la composición de la presente descripción una semana después del segundo periodo de inyecciones y se administró diariamente antes y después de los siguientes tres periodos de inyecciones. Una semana antes del sexto periodo de inyecciones, la paciente agotó otra vez la composición de la presente descripción. Este tratamiento adicional se volvió empezar justo antes del séptimo periodo de tratamiento y se mantuvo durante la parte restante de los 12 periodos de tratamiento de quimioterapia.

La paciente rellenó el cuestionario QoL C-30 después del primer periodo de tratamiento y el segundo periodo de tratamiento. Asimismo, rellenó el cuestionario después del quinto, sexto y séptimo periodos de tratamiento.

**Resultados**

*Variables de laboratorio:* Se encontró que la albúmina sérica era demasiado baja para empezar el tratamiento de quimioterapia. Inicialmente, se encontró que el nivel era tan bajo como 28 (Tabla 5), pero se incrementó a 39 después de 10 días de tratamiento con la composición de la presente descripción. Este valor se mantuvo durante el primer periodo de tratamiento de quimioterapia con tratamiento adicional con la composición de la presente descripción. La albúmina se redujo ligeramente durante el segundo y sexto periodos del tratamiento de quimioterapia sin tratamiento adicional con la composición de la presente descripción en comparación con el tratamiento anterior y posterior, en los que la paciente fue tratada también con la composición de la presente descripción.

También se detecta un patrón similar con respecto a la hemoglobina, leucocitos, granulocitos, linfocitos y eosinófilos. Todas estas variables eran bajas antes del comienzo de la quimioterapia, pero se incrementaron considerablemente con el tratamiento oral adicional con la composición de la presente descripción en 10 días. Se encontró que estos niveles obtenidos permanecían prácticamente invariables durante el primer periodo de tratamiento con tratamiento adicional con la composición de la presente descripción.

Tabla 5: Desarrollo de algunas variables de laboratorio durante los siete primeros periodos de quimioterapia. La columna en negrita indica la situación sin tratamiento adicional con la composición de la presente descripción.

Variables	Antes	Periodo de tratamiento de quimioterapia							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Tratamiento ad.*	<b>no</b>	sí	sí	<b>no</b>	sí	sí	sí	<b>no</b>	sí
Hemoglobina	<b>9,4</b>	11,0	11,3	<b>10,3</b>	10,8	10,9	10,2	<b>10,6</b>	10,9
Leucocitos	<b>4,0</b>	7,6	7,2	<b>3,8</b>	5,8	7,1	4,0	<b>3,7</b>	4,8
Granulocitos	<b>2,4</b>	5,1	4,4	<b>2,2</b>	3,7	4,9	2,2	<b>2,2</b>	3,2
Linfocitos	<b>1,0</b>	1,6	2,0	<b>1,0</b>	1,4	1,4	1,2	<b>0,9</b>	1,1
Eosinófilos	<b>0,03</b>	0,09	0,13	<b>0,11</b>	0,07	0,14	0,19	<b>0,12</b>	0,13
ALT	<b>28</b>	89	66	<b>55</b>		49		<b>29</b>	
AST	<b>25</b>	111	43	<b>51</b>					
Albúmina	<b>28</b>	39	40	<b>37</b>		41		<b>38</b>	39

\* Tratamiento ad. indica si la composición de la presente descripción se administró de forma

conjunta con la quimioterapia; "sí" indica que la composición de la presente descripción se administró en ese periodo, mientras que "no" indica que la composición de la presente descripción no se administró en ese periodo.

El segundo periodo de tratamiento de quimioterapia se llevó a cabo sin administración de la composición de la presente descripción y se encontró de nuevo una reducción de todas las variables anteriormente descritas. Los tres siguientes periodos de quimioterapia se llevaron a cabo con administración adicional de la composición de la presente descripción y la hemoglobina, leucocitos, granulocitos, y linfocitos se incrementaron otra vez hasta los niveles previos. También se detectó un patrón prácticamente igual para los eosinófilos, excepto en el tercer periodo de tratamiento. El sexto periodo de tratamiento de quimioterapia fue como el segundo llevado a cabo también sin administración adicional de la composición de la presente descripción y sucedió otra vez prácticamente lo mismo.

10 La ALT y AST se midieron únicamente antes del comienzo y durante los dos primeros periodos de tratamiento de quimioterapia. Sin embargo, se indicó el mismo patrón descrito para las variables hematológicas anteriormente mencionadas.

15 *Cuestionario de Calidad de Vida C-30:* Se encontró una reducción del 53 % en la suma de C-30 desde el resto del periodo posterior al primer tratamiento de quimioterapia con administración adicional de la composición de la presente descripción hasta el resto del periodo posterior al segundo tratamiento de quimioterapia sin administración adicional de la composición de la presente descripción. También se detectó un patrón similar en el resto del periodo posterior al quinto, sexto y séptimo tratamientos de quimioterapia. Desde el quinto con administración adicional de la composición de la presente descripción hasta el sexto sin, se redujo la suma de C-30 en un 48 % y se incrementó en un 58 % desde el sexto hasta el séptimo con administración adicional de la composición de la presente descripción.

25 **Conclusión:** Incluso aunque este estudio fue únicamente un informe de caso desestructurado, indica claramente un efecto beneficioso de las composiciones de la presente descripción como un posible tratamiento complementario al tratamiento de quimioterapia.

### **Ejemplo 7: Estudio de viabilidad de las células cancerosas cuando son tratadas con compuestos de la presente descripción**

Las células estudiadas en este estudio son:

- 30
- MCF-7, células del cáncer de mama en humanos (bien diferenciadas).
  - Células T47-D del cáncer de mama en humanos (mal diferenciadas).
  - Células PI45 pancreáticas humanas (mal diferenciadas).
  - T24P del cáncer de vejiga en humanos (mal diferenciadas).
  - 35 • Células SKOV del cáncer ovárico en humanos (mal diferenciadas).
  - Células HCT116 del cáncer colorrectal en humanos.
  - Células Fadu del cáncer de cabeza y cuello en humanos.

Las células se trataron con:

- 40
- el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos (al que se hace referencia en las Figuras 8-13 como "Compuesto 2"),
  - la sustancia compuesta que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de platino (al que se hace referencia en las Figuras 8-13 como "Compuesto 1") y
  - 45 • la sustancia compuesta, que comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos y un compuesto de molibdeno (al que se hace referencia en las Figuras 8-13 como "Compuesto 3")

50 en diferentes cantidades (10-200 µg/pocillo) durante 72 horas.

### **Viabilidad celular**

Las células se colocaron en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/ml) y al segundo día se sustituyó el medio por un



medio que contenía concentraciones variables de los compuestos/sustancias compuestas. Después de 72 y 96 horas, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT de acuerdo con el protocolo adjunto al equipo.

Los resultados se muestran en las figuras 8-11.

5

Los resultados muestran que los tres compuestos/sustancias compuestas afectan a la viabilidad de todas las líneas celulares. La viabilidad se redujo desde el 40 % al 90 % dependiendo de la línea celular investigada. El efecto destructivo más efectivo se vio en líneas celulares del colon humano y de la cabeza y cuello humanos y el menor efecto destructivo se observó con las sustancias a ensayo en las líneas celulares de ovarios e hígado. Véase la

10 Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Valores de IC50 estimados para la sustancia compuesta que comprende platino

Línea celular	T47D (mama)	MCF-7 (mama)	HEPG2 (hígado)	T24P (vejiga)	Skov3 (ovario)	PL45 (páncreas)	HCT116 (colon)	Fadu (cabeza y cuello)
IC50 (µg/ml)	-490	-370	-1700	-500	-1000	-500	-150	-150

15 **Actividad citotóxica por medición de lactato deshidrogenasa (LDH)**

Se determinó la integridad de la membrana plasmática por medición de la actividad de la LDH liberada al medio de cultivo. Se monitorizó la actividad LDH mediante seguimiento de la oxidación de la NADH a medida que se reducía la absorbancia a 334 nm. El porcentaje de LDH liberada se definió como la proporción entre la actividad LDH en el sobrenadante y la suma de la cantidad de LDH liberada más la actividad medida en el lisado celular.

20

Los resultados se muestran en las figuras 12-13.

Los resultados no muestran indicios de daño celular. Igual liberación de LDH por parte de las células del grupo de referencia que de las células tratadas con las sustancias de ensayo; es decir, las sustancias no son tóxicas. Un daño celular, tal como una necrosis, causa una elevación de la concentración de LDH en el medio. La integridad de la membrana plasmática en tratamiento se determinó por medición de la actividad de la LDH liberada al medio de cultivo. La actividad enzimática se midió mediante un método espectrofotométrico (Moran and Schnellmann, 1996).

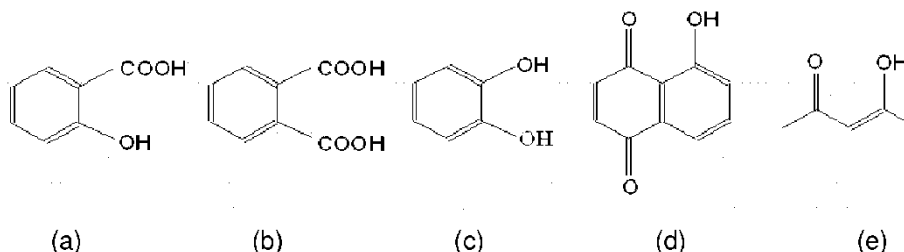
25

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos **caracterizado porque** tiene una composición elemental de 62-67 % C, 3,8-4,2 % H, 29-34 % O y menos de 0,2 % N del peso seco y donde la suma de otros elementos no es superior al 1% del peso seco.
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1,  
 donde el compuesto está **caracterizado porque** además tiene picos característicos RMN <sup>13</sup>C del 15-22 % en el rango 0-48 ppm, 30-42 % en el rango 108-145 ppm, 5-13 % en el rango 165-187 ppm y 2-8 % en el rango 187-220 ppm; y/o  
 donde el compuesto está **caracterizado porque** además comprende no más del 1 % de impurezas de bajo peso molecular identificadas por picos característicos RMN <sup>13</sup>C en 168,5, 171, 173, 181-182 ppm; y/o  
 donde el compuesto está **caracterizado porque** además tiene bandas de absorción IR en 3400-3600 cm<sup>-1</sup>, 2800-3000 cm<sup>-1</sup>, 1500-1700 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup>, 1250-1300 cm<sup>-1</sup> y 1050 cm<sup>-1</sup>.
3. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está **caracterizado porque** además comprende al menos un monómero de cada uno de los grupos: ácidos carboxílicos alifáticos saturados, ácidos hidrocarboxílicos alifáticos saturados, ácidos carboxílicos alifáticos monoinsaturados, ácidos hidrocarboxílicos alifáticos monoinsaturados, ácidos carboxílicos alifáticos poliinsaturados y componentes aromáticos.
4. Procedimiento de preparación del compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende las etapas de  
 a) proporcionar una materia prima de partida que contiene lignina, que es producida a partir de árboles de coníferas y tiene un pH de 5,5 a 7, un contenido de humedad del 50 al 70% y comprende no más de un 32% de polisacáridos, no menos de un 66% de lignina y no más de un 2% de compuestos hidrosolubles,  
 b) someter a la materia prima de partida que contiene lignina de la etapa a tratamiento alcalino por adición de hidróxido de sodio para obtener una solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos,  
 c) someter la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa b a tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido para obtener un polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos, y  
 d) purificar el polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa c mediante eliminación de impurezas de bajo peso molecular para obtener el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado.
5. Composición cosmética que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o composición nutracéutica que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha composición nutracéutica opcionalmente puede comprender además nutrientes.
6. Sustancia compuesta que comprende un compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un catión metálico.
7. Sustancia compuesta de acuerdo con la reivindicación 6, donde el catión metálico es seleccionado del grupo de elementos 2s-5s o 3d-5d.
8. Sustancia compuesta de acuerdo con la reivindicación 6, donde la sustancia compuesta comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II), donde el compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos encapsula o forma un complejo con dicho compuesto de platino (II).
9. Sustancia compuesta de acuerdo con la reivindicación 8, que **se caracteriza porque** además tiene una fórmula molecular de (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O)<sub>x1</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)<sub>x2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x3</sub>(Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>x4</sub>, donde x1, x2, x3 y x4 son los coeficientes que representan cualquier número natural, positivo, entero o fraccionario.

10. Sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que se **caracteriza porque** además compuesto de platino está encapsulado por o forma un complejo con una de las siguientes estructuras del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos

5



donde las estructuras a, b, c y d representan partes de componentes aromáticos seleccionados del grupo constituido por éster metílico del ácido 3-benciloxi-4,5-dihidroxi-benzoico, éster metílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, éster dimetílico del ácido 2,6-dimetil-benzo(1,2-b,4,5-b')difurano-3,7-dicarboxílico, éster etílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, ramnetina, éster metílico del ácido ((4-metil-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-il)oxi)acético hidrato, carbonato de bis(2-(metoxicarbonil)fenilo), sulocrina, 2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetildibenzofurano-1,3(2H,9bH)-diona, anhídrido O-acetilsalicílico, 4-ho-3-((6-ho-benzo(1,3)dioxol-5-il)-(3-metoxi-fenil)-metil)-5h-furan-2-ona, ácido 2,3-bis-benzoiloxi-succínico, éster metílico del ácido 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,3-dioxo-1,3,10,11-tetrahidrobenzo[5,6]cicloocta[1,2-c]furan-4-carboxílico, éster metílico del ácido (1-metoxicarbonilmetoxi-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-iloxi)-acético, atranorina y epicatequinas fenilpropanoide-sustituidas y la estructura e representa una parte de ácidos, donde dicho ácido es un ácido hidrocarboxílico alifático saturado seleccionado del grupo constituido por ácido hidroxihexadecanoico, ácido hidroxioctadecanoico, ácido dihidroxioctadecanoico, ácido hidroxieicosanoico, ácido trihidroxioctadecanoico, ácido hidroxidocosanoico, ácido hidroxitetraecosanoico y ácido hidroxipentacosanoico; o un ácido carboxílico alifático monoinsaturado seleccionado del grupo constituido por ácido hexadecenoico, ácido heptadecenoico, ácido octadecenoico y ácido eicosenoico o un ácido hidrocarboxílico alifático monoinsaturado seleccionado del grupo constituido por ácido hidroxioctadecenoico, ácido dihidroxioctadecenoico, ácido dihidroxieicosenoico, ácido tetrahidroxioctadecenoico y ácido dihidroxidocosenoico.

25

11. Procedimiento de preparación de la sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que comprende las etapas de

- a1) proporcionar una materia prima de partida que contiene lignina, que es producida a partir de árboles de coníferas y tiene un pH de 5,5 a 7, un contenido de humedad del 50 al 70% y comprende no más de un 32% de polisacáridos, no menos de un 66% de lignina y no más de un 2% de compuestos hidrosolubles,
- b1) someter a la materia prima de partida que contiene lignina de la etapa a1 a tratamiento alcalino por adición de hidróxido de sodio para obtener una solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos,
- c1) someter la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa b1 a tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido para obtener un polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos,
- d1) purificar el polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa c1 para obtener un polímero de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado,
- e1) hacer reaccionar el polímero de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado obtenido en la etapa d1 con un compuesto de coordinación plano cuadrado de platino (II) para obtener una mezcla de reacción,
- f1) termostatar la mezcla de reacción de la etapa e1 para obtener la sustancia compuesta cruda, y
- g1) purificar la sustancia compuesta cruda de la etapa f1 para obtener la sustancia compuesta.

40

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde el compuesto plano cuadrado de platino es cis-diaminodichloroplatino (II) o tetrachloroplatinato de potasio o la mezcla de los mismos.

45

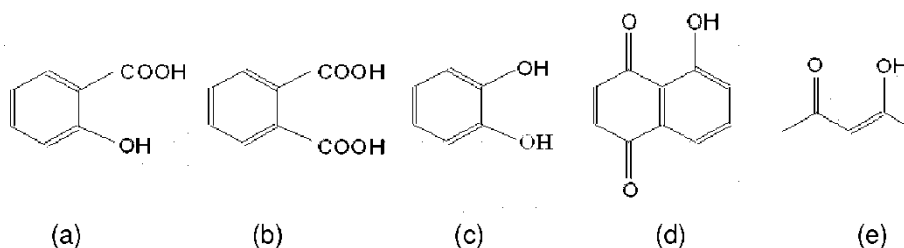
13. Sustancia compuesta de acuerdo con la reivindicación 6, donde la sustancia compuesta comprende el compuesto polimérico hidrosoluble de ácidos bencenopolicarboxílicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un compuesto de molibdeno en forma de sal de ácidos de molibdeno, donde el compuesto polimérico de ácidos policarboxílicos encapsula o forma un complejo con dicho compuesto de molibdeno.

50

14. Sustancia compuesta de acuerdo con la reivindicación 13, que se **caracteriza porque** además tiene

una fórmula molecular  $(C_3H_2O)_{x_1}(C_2H_2O)_{x_2}(CH_2)_{x_3}(MoO_3)_{x_4}(H_2O)_{x_5}(NH_4)_{x_6}$ , donde  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$ ,  $x_5$  y  $x_6$  son los coeficientes que representan cualquier número natural, positivo, entero o fraccionario.

15. Sustancia polimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, que se **caracteriza** porque el compuesto de molibdeno está encapsulado por o forma complejo con una de las siguientes estructuras del compuesto polimérico de ácidos bencenopolicarboxílicos



- 10 donde las estructuras a, b, c y d representan partes de componentes aromáticos seleccionados del grupo constituido por éster metílico del ácido 3-benciloxi-4,5-dihidroxi-benzoico, éster metílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, éster dimetílico del ácido 2,6-dimetil-benzo(1,2-b,4,5-b')difurano-3,7-dicarboxílico, éster etílico del ácido 5-(furano-2-carboniloxi)-2-metil-benzofurano-3-carboxílico, ramnetina, éster metílico del ácido ((4-metil-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-il)oxi)acético hidrato, carbonato de bis(2-(metoxicarbonil)fenilo), sulocrina, 2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetildibenzofurano-1,3(2H,9bH)-diona, anhídrido O-acetilsalicílico, 4-ho-3-((6-ho-benzo(1,3)dioxol-5-il)-(3-metoxi-fenil)-metil)-5h-furan-2-ona, ácido 2,3-bis-benzoiloxi-succínico, éster metílico del ácido 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,3-dioxo-1,3,10,11-tetrahidrobenzo[5,6]cicloocta[1,2-c]furan-4-carboxílico, éster metílico del ácido (1-metoxicarbonilmetoxi-6-oxo-6h-benzo(c)cromen-3-iloxi)-acético, atranorina y epicatequinas fenilpropanoide-sustituidas y la estructura e representa una parte de ácidos, donde dicho ácido es un ácido
- 20 hidrocarboxílico alifático saturado seleccionado del grupo constituido por ácido hidroxihexadecanoico, ácido hidroxioctadecanoico, ácido dihidroxioctadecanoico, ácido hidroxieicosanoico, ácido trihidroxioctadecanoico, ácido hidroxidocosanoico, ácido hidroxitetraecosanoico y ácido hidroxipentacosanoico; o un ácido carboxílico alifático monoinstaurado seleccionado del grupo constituido por ácido hexadecenoico, ácido heptadecenoico, ácido octadecenoico y ácido eicosenoico o un ácido hidrocarboxílico alifático monoinsaturado seleccionado del grupo
- 25 constituido por ácido hidroxioctadecenoico, ácido dihidroxioctadecenoico, ácido dihidroxieicosenoico, ácido tetrahidroxioctadecenoico y ácido dihidroxidocosenoico.

16. Procedimiento de preparación de una sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15 que comprende las etapas de

30 a2) proporcionar una materia prima de partida que contiene lignina, que es producida a partir de árboles de coníferas y tiene un pH de 5,5 a 7, un contenido de humedad del 50 al 70% y comprende no más de un 32% de polisacáridos, no menos de un 66% de lignina y no más de un 2% de compuestos hidrosolubles,

35 b2) someter a la materia prima de partida que contiene lignina de la etapa a2 a tratamiento alcalino por adición de hidróxido de sodio para obtener una solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos,

40 c2) someter la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa b2 a tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido para obtener un polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos,

d2) purificar el polímero crudo de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa c2 para obtener un polímero de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado,

45 e2) hacer reaccionar el polímero de ácidos bencenopolicarboxílicos purificado obtenido en la etapa d2 con un compuesto de molibdeno para obtener una mezcla de reacción,

f2) termostatar la mezcla de reacción de la etapa e2 para obtener la sustancia compuesta cruda,

50 g2) purificar la sustancia compuesta cruda de la etapa f2 para obtener la sustancia compuesta.

17. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4, 11 y 16, donde el tratamiento

- alcalino de la etapa b, b1 o b2 se lleva a cabo por reacción de una suspensión alcalina del material que contiene lignina de la etapa a, a1 o a2 con oxígeno a un pH de  $13 \pm 0,5$  y una presión de  $2,2 \pm 0,3$  MPa; y/o donde el tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido de la etapa c o c1 se lleva a cabo sometiendo la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa b o b1 a tratamiento con un ácido mineral para obtener un pH de 1-2 o el tratamiento de gradiente de densidad en medio ácido de la etapa c2 se lleva a cabo sometiendo la solución de sales sódicas de ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa b2 a tratamiento con un ácido mineral y posteriormente a la acción de una fuerza centrífuga; y/o donde la purificación en la etapa d, d1 o d2 se lleva a cabo sometiendo el polímero crudo de los ácidos bencenopolicarboxílicos de la etapa c, c1 o c2 a uno o más procedimientos de purificación seleccionados entre extracción, flotación, destilación, filtración, precipitación, centrifugación, decantación y diálisis.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, donde la sal de ácidos de molibdeno es molibdato amónico, molibdato amónico tetrahidratado, molibdato potásico, molibdato sódico, molibdato sódico dihidratado o una mezcla de los mismos.
19. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la sustancia compuesta de acuerdo con las reivindicaciones 6-10 o la sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
20. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 para uso en profilaxis, tratamiento o cuidados paliativos de un mamífero que padezca una enfermedad derivada de alteraciones del ciclo celular o para la modificación de dicha enfermedad, donde la composición farmacéutica comprende la sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
21. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 para uso en profilaxis, tratamiento o cuidados paliativos de un mamífero que padezca cáncer o para la modificación de dicho cáncer.
22. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde dicha composición farmacéutica comprende además un agente anticancerígeno, donde la composición farmacéutica comprende la sustancia compuesta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10 o 13-15.
23. Composiciones farmacéuticas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 para uso en la reducción/minimización de los efectos secundarios resultantes de la radioterapia o quimioterapia convencionales.

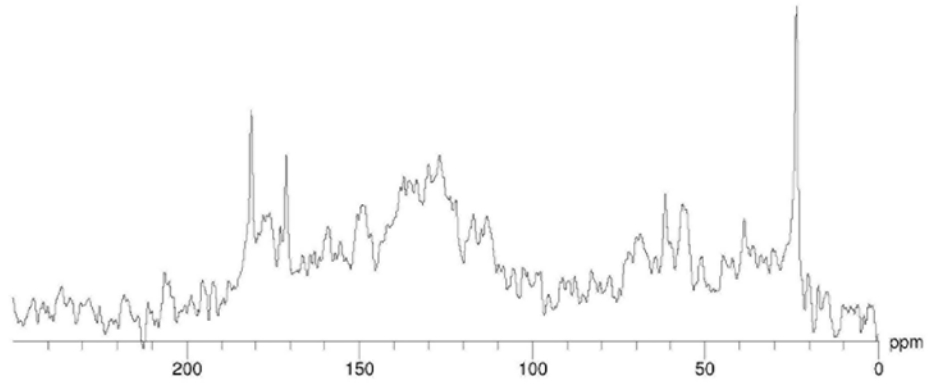


Figura 1

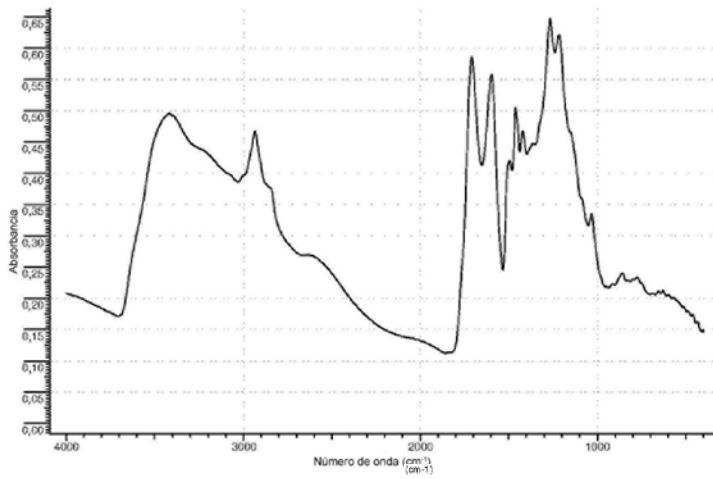


Figura 2

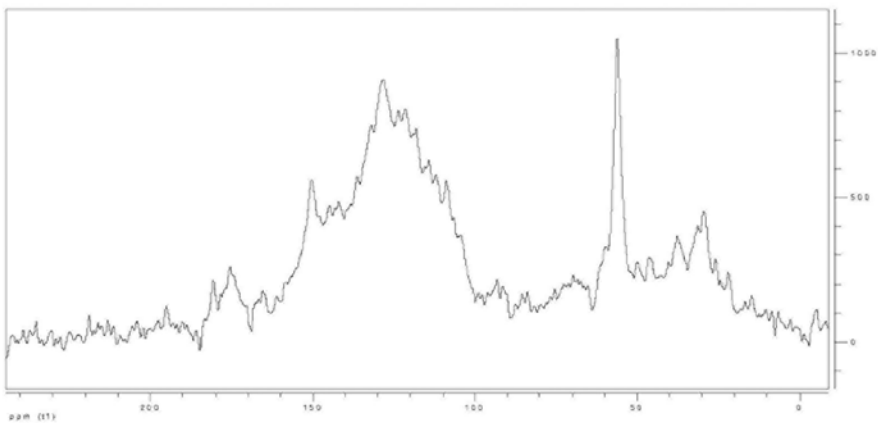
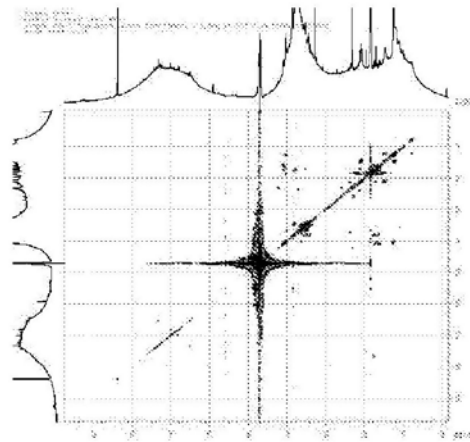
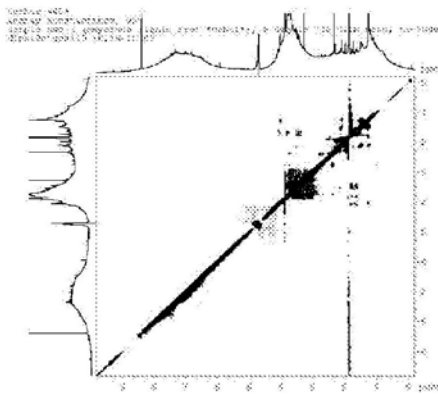


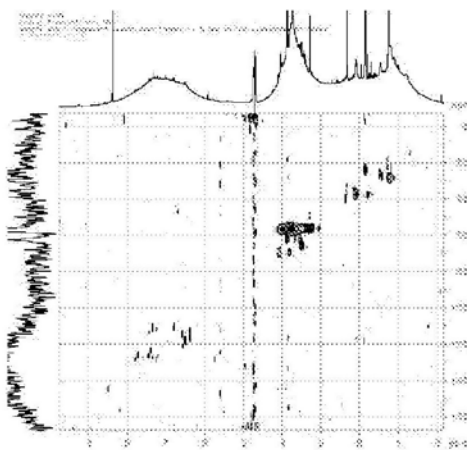
Figura 3



$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY



$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY



$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC

Figura 4

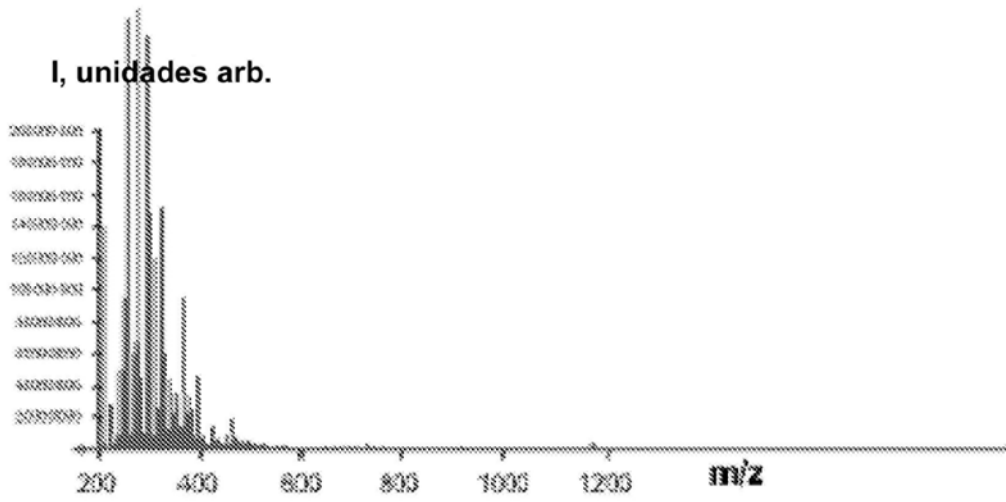


Figura 5

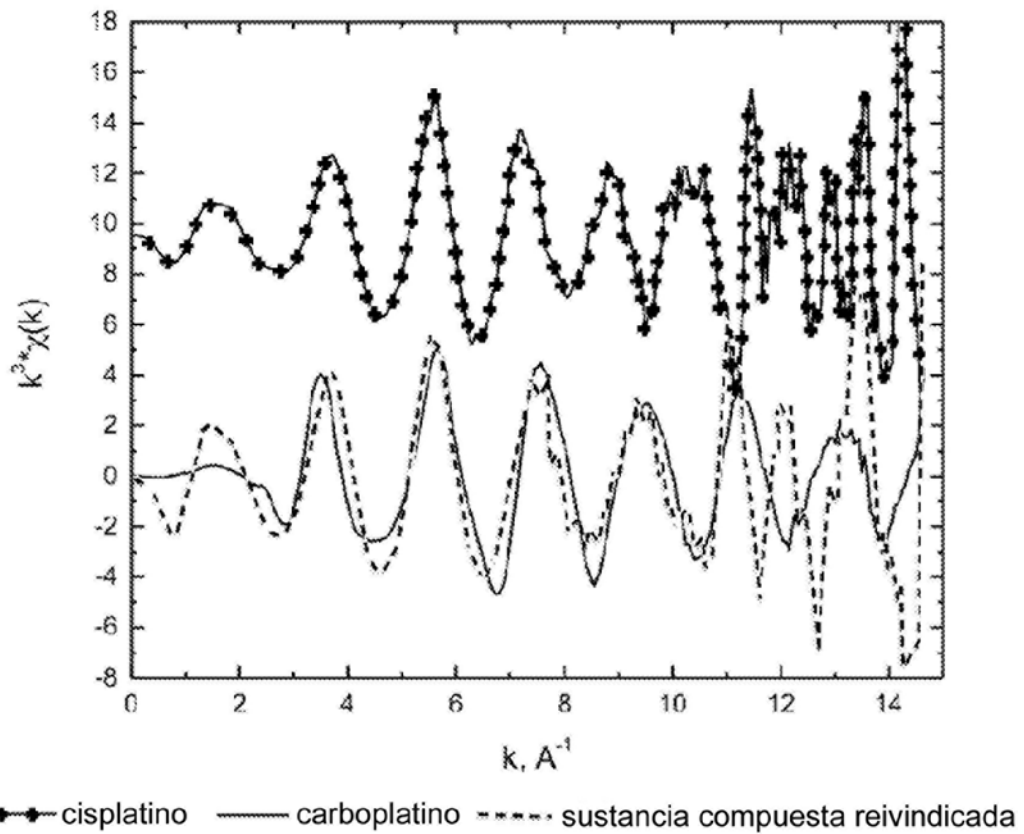
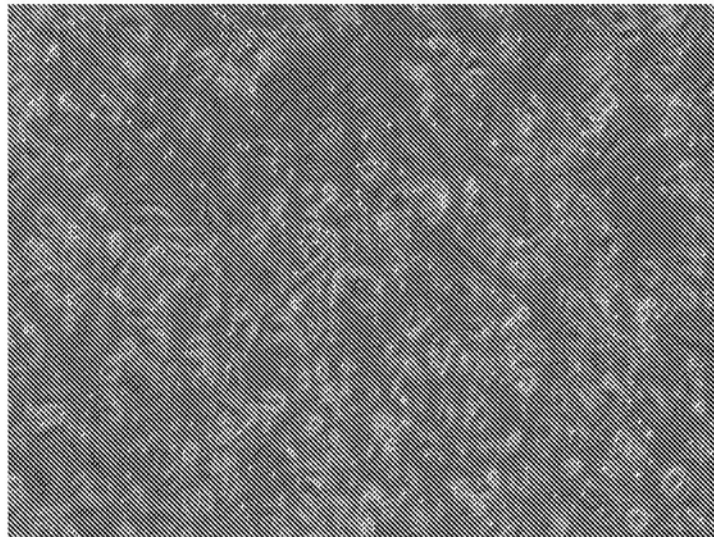
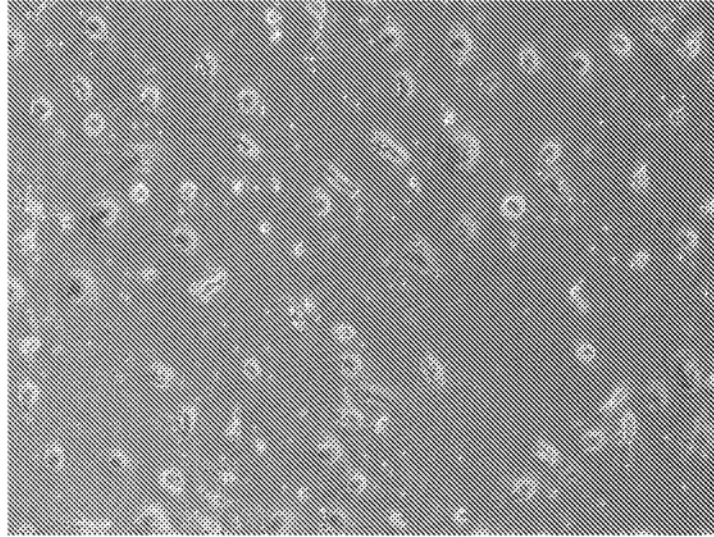


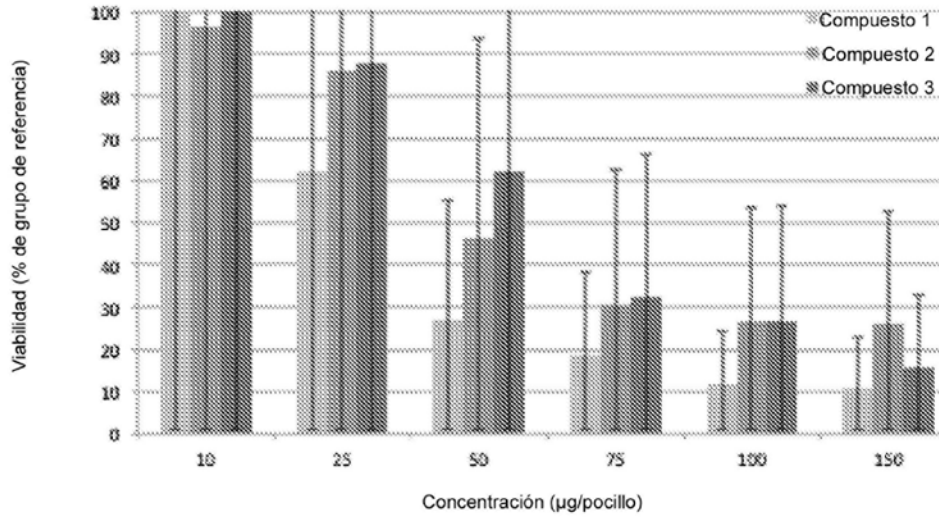
Figura 6





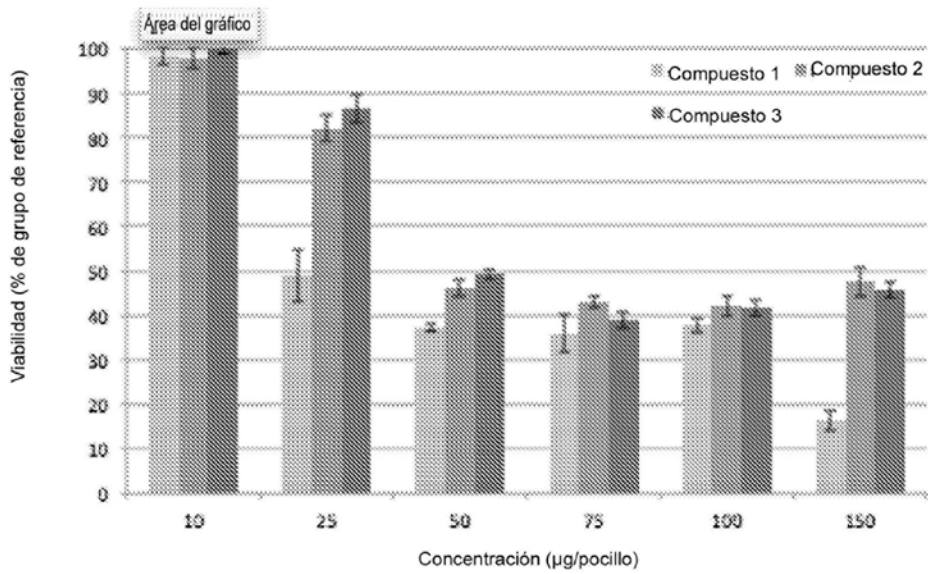
**Figura 7**

**Efectos de los compuestos sobre la viabilidad de las células MCF-7**



**Figura 8**

**Efectos de los compuestos sobre la viabilidad de las células T47D**



**Figura 9**

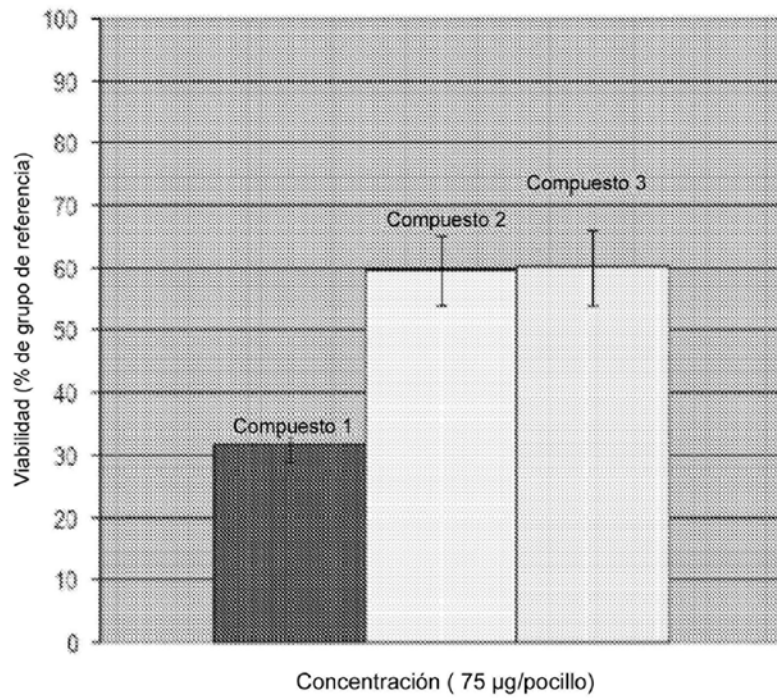


Figura 10

**Viabilidad de T24P (vejiga) y SKOV-3 (ovario)**

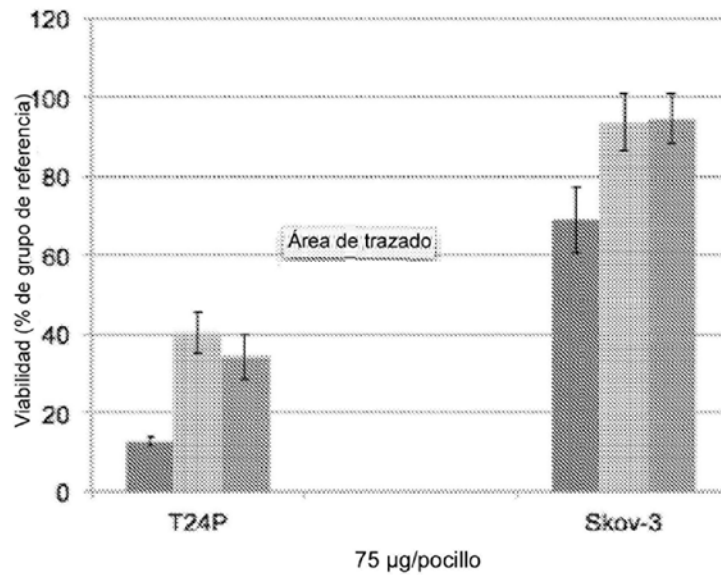
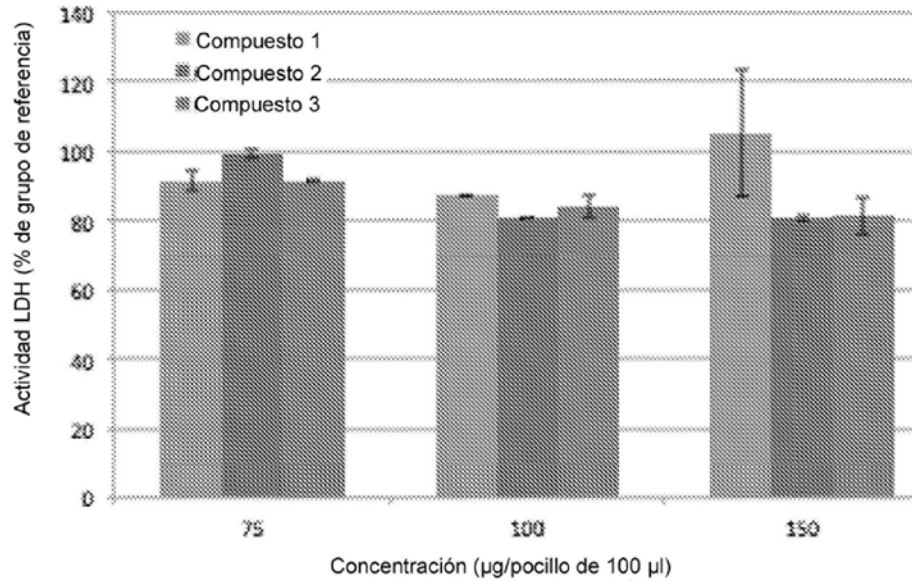


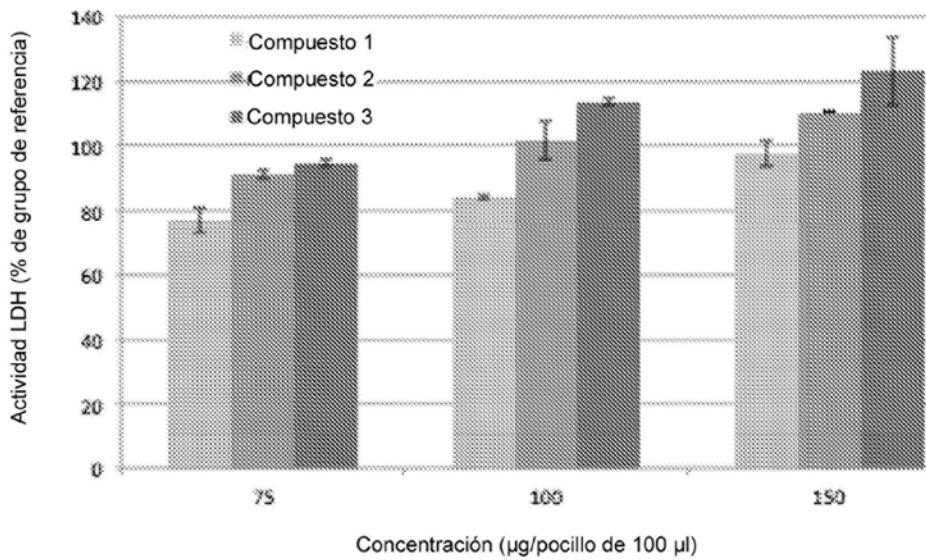
Figura 11

**Efectos de los compuestos sobre las células MCF-7**



**Figura 12**

**Efectos de los compuestos sobre las células T47D**



**Figura 13**