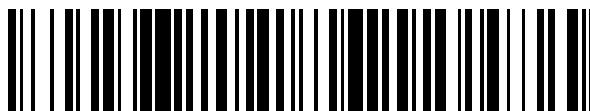


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 356**

51 Int. Cl.:

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2013 PCT/CN2013/082513**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067336**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2013 E 13851191 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2913335**

54 Título: **Complejo de platino bivalente antitumoral y método de preparación para el complejo y ligado del complejo**

30 Prioridad:

29.10.2012 CN 201210422936

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**SOUTHEAST UNIVERSITY (100.0%)
No. 2 Sipailou, Xuanwu Nanjing
Jiangsu 210096, CN**

72 Inventor/es:

GOU, SHAOHUA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 629 356 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

Complejo de platino bivalente antitumoral y método de preparación para el complejo y ligado del complejo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un complejo de platino de un nuevo tipo para tratar el cáncer así como a su método de preparación, particularmente a un complejo de platino (II) antitumoral que contiene radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico como grupo saliente.

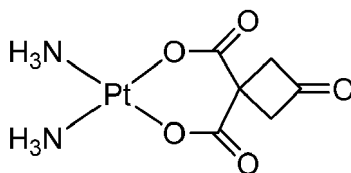
Antecedentes de la invención

Desde la aplicación clínica de cisplatino, algunos investigadores han realizado selecciones de fármacos con miles de complejos de platino. Particularmente en los últimos 20 años, se ha realizado una enorme investigación sobre complejos de platino antitumorales que tienen una relación estructura-actividad de un nuevo tipo y sobre sus mecanismos, pero hasta ahora no se ha encontrado un fármaco de platino superior al cisplatino en las prestaciones globales. En la actualidad, se han aplicado en el campo clínico unos pocos fármacos de platino antitumorales, incluyendo cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, pero también presentan una alta toxicidad y cierta resistencia a fármacos durante su uso clínico. Las deficiencias limitan la aplicación de estos fármacos de platino hasta cierto punto. Entre los fármacos de platino existentes, el cisplatino tiene sin duda una actividad antitumoral muy intensa, pero su toxicidad es también la más alta; aunque la toxicidad de carboplatino es mucho menor que la de cisplatino, su capacidad inhibitoria en muchas células tumorales es decepcionante. En vista de esto, cambiar o ajustar el grupo saliente o ligando de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino puede considerarse aún como una manera eficaz de obtener fármacos de platino con altas prestaciones y baja toxicidad. Por ejemplo, las solicitudes de patente WO 2004/099224 A1 o CN 101967163 A dan a conocer una serie de derivados de carboplatino para terapia antitumoral mejorada.

Sumario de la invención

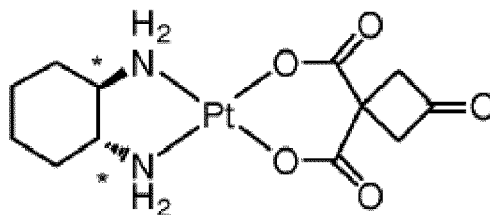
25 Problema técnico: El objeto de la presente invención es proporcionar un complejo de platino (II) antitumoral y el método de preparación del complejo y su ligando. El complejo proporcionado por la presente invención es menos tóxico que cisplatino y oxaliplatino. Particularmente, el complejo GSH-5 es menos tóxico que carboplatino y su actividad antitumoral es mayor que la de carboplatino en general y equivalente a la de cisplatino y oxaliplatino. También tiene una solubilidad en agua deseable y puede superar la resistencia a fármacos hasta cierto punto. Es un fármaco de platino antitumoral potencialmente eficaz y con baja toxicidad.

30 Solución técnica: En el complejo de platino bivalente antitumoral proporcionado por la presente invención, el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico es un ligando de grupo saliente del complejo de platino; el complejo de platino puede ser cis-[radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico-diaminoplatino (II)], abreviatura: GSH-5. Su estructura química se muestra en la fórmula (1):



Fórmula 1

35 El complejo de platino puede ser también cis-[radical de ácido 3-cetona-1,1-ciclobutano-dicarboxílico-trans-1,2-ciclohexanodiaminoplatino (II)], abreviatura: GSH-6. Su estructura química se muestra en la fórmula (2):



Fórmula 2

40 En la fórmula (2), los dos átomos de carbono quirales marcados con * en el grupo trans-1,2-ciclohexanodiamina tienen ambos la configuración R o la configuración S.

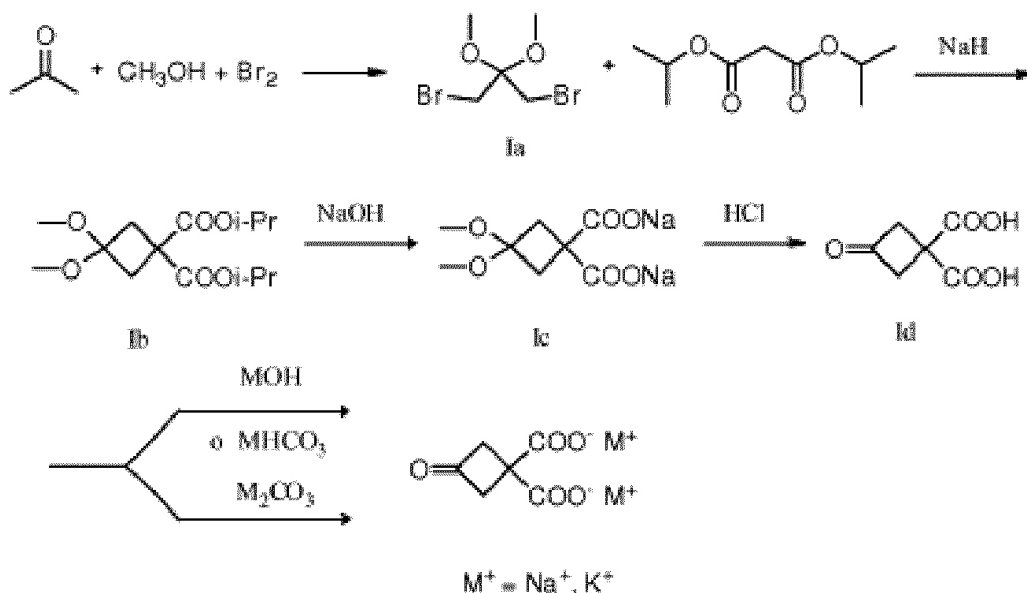
Los complejos de platino bivalentes antitumorales mostrados en la fórmula (1) y la fórmula (2) se preparan mediante el siguiente método:

5 En primer lugar, reacciona tetrahaloplatinato de potasio con amoníaco o trans-1,2-ciclohexanodiamina en disolución acuosa para obtener el complejo cis-[dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)]; luego se obtiene el producto objetivo en disolución acuosa mediante los siguientes métodos que se realizan con protección frente a la luz y mediante purga con nitrógeno: mediante el método A: se usan iones de plata para retirar iones haluro de [dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)], y reacciona el producto intermedio obtenido con 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino para obtener el producto objetivo; o mediante el método B: reacciona 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata con [dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)] para obtener el producto objetivo.

10 El 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino implicado en el método A se obtiene haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de MOH o MHCO_3 en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con M_2CO_3 en disolución acuosa, en el que M es Na^+ o K^+ .

15 El 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata implicado en el método B se prepara haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de nitrato de plata en disolución acuosa.

En el método para preparar el ligando de complejo de platino bivalente antitumoral, el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico es un ligando de grupo saliente del complejo de platino y se prepara mediante la siguiente ruta de reacción A:



20

Ruta de reacción A

25 En primer lugar, reaccionan acetona, metanol y bromo para obtener la mediante condensación y bromación, en segundo lugar, Ia y malonato de diisopropilo siguen la reacción de ciclación bajo la acción de hidruro de sodio para obtener Ib, luego se hidroliza Ib en una disolución de hidróxido de sodio para obtener Ic, y se acidifica Ic con ácido clorhídrico para obtener Id, es decir: ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico; el ligando, es decir: se obtiene el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico haciendo reaccionar un equivalente de Id y dos equivalentes de MOH o MHCO_3 en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes de Id con M_2CO_3 en disolución acuosa; en el que M^+ es Na^+ o K^+ .

30 En la ruta de reacción A anterior, el método de preparación de los productos intermedios Ia e Ib se ha notificado en la bibliografía. Remítase a J. Fluorine Chem., 2010, 131, 221 y J. Org. Chem., 1988, 53, 3841.

35 En la bibliografía, se notifican dos métodos para preparar el ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico. Remítase a J. Med. Chem., 1990, 33, 1905 y Journal of Beijing University of Technology, 1998, 24, 97. En comparación con la ruta de reacción A, el primer método notificado tiene una ruta de reacción más larga, implica las etapas de oxidación e hidrogenación catalítica a alta presión y tiene un bajo rendimiento y un alto coste; el último método notificado usa componentes o productos intermedios, que son productos químicos restringidos, y tiene un rendimiento de solo el 10%, así que ninguno de ellos es adecuado para producción industrial a gran escala.

El producto obtenido a partir de la ruta de reacción A se confirma mediante H-RMN (resonancia magnética nuclear

de H), ESI-EMAR (espectrometría de masas con ionización por electropulverización de alta resolución) y análisis elemental que es ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico. Datos espectrales del producto: $^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ : 3,702 ppm (s, 4H); ESI-EM: $[\text{M-H}]^-$ 157,0128 (100%). Datos del análisis elemental (fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5$): valor teórico el 45,57% de C, el 3,82% de H; valor medido el 45,59% de C, el 3,85% de H.

- 5 **Efectos beneficiosos:** Los complejos de platino bivalentes de la presente invención tienen una solubilidad en agua deseable, en particular el complejo GSH-5, y pueden realizarse en preparación para inyección y polvo liofilizado convencionales.

10 Se usaron el complejo GSH-5 y el complejo GSH-6 proporcionados por la presente invención para realizar una investigación de la actividad antitumoral *in vitro* en una serie de células tumorales humanas. Los valores CI_{50} se muestran en la tabla 1. Los datos en la tabla 1 indican que el efecto inhibidor del complejo GSH-5 en diferentes células tumorales es próximo al de cisplatino en diferente medida, incluso mejor que el de oxaliplatino en algunos casos, y su efecto anticancerígeno es mucho mejor que el de carboplatino. Además de mostrar citotoxicidad en células tumorales comunes equivalente a la de cisplatino, el complejo GSH-5 también tiene un efecto inhibidor obvio sobre la célula resistentes a fármacos de cáncer de mama humano MCF-7 y supera al cisplatino en actividad.

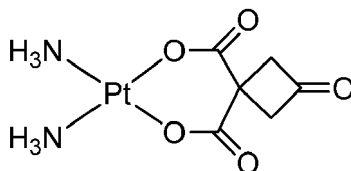
15 Se adoptó un modelo animal de tumor trasplantado en ratón para observar por separado el efecto inhibidor del complejo GSH-5 y el complejo GSH-6 proporcionados por la presente invención en tumor Heps y sarcoma S180 de tumor trasplantado en animal. Los datos relevantes se muestran en la tabla 2 y la tabla 3 respectivamente. El resultado de la tabla 2 indica que en comparación con el grupo de control de modelo, GSH-5 y GSH-6 de muestra tienen ambas un efecto inhibidor significativo ($P < 0,05$) sobre el crecimiento tumoral de S180 y el peso corporal de los animales de experimentación; en comparación, el primero tiene un mejor efecto inhibidor sobre el crecimiento tumoral que el último. El resultado de la tabla 3 indica que en comparación con el grupo de control de modelo, GSH-5 de muestra tiene un efecto inhibidor obvio ($P < 0,01$) sobre el crecimiento de tumor Heps y el peso corporal de los animales de experimentación; en comparación, GSH-5 de muestra tiene un mejor efecto inhibidor sobre el crecimiento tumoral que el que tiene GSH-6.

25 Se investigó de manera preliminar la toxicidad de los dos complejos de platino proporcionados por la presente invención. El resultado de la prueba de toxicidad tras la dosis única realizada inyectando por vía intravenosa GSH-5 de muestra a ratones es de 150 mg/kg y el resultado de GSH-6 de muestra es de 100 mg/kg. Los valores de DL_{50} para ratón de cisplatino, oxaliplatino y carboplatino en la bibliografía son de 13,40, 14,63 y 139,00 mg/kg respectivamente (remítase a Toxicology & Applied Pharmacology, 1973, 25, 230; Northwest Pharmaceutical Journal, 2001, 16(2), 67; Journal of Zhejiang Academy of Medical Sciences, 1993, 15, 33).

30 Los resultados anteriores indican que los complejos proporcionados por la presente invención son menos tóxicos que cisplatino y oxaliplatino, y particularmente, el complejo GSH-5 es menos tóxico que carboplatino; la actividad antitumoral de los complejos proporcionados por la presente invención es mayor que la de carboplatino en general. Particularmente, la actividad antitumoral del complejo GSH-5 es equivalente a la de cisplatino y oxaliplatino. También tiene una solubilidad en agua deseable y puede superar la resistencia a fármacos hasta cierto punto. Es un fármaco de platino antitumoral potencialmente eficaz y con baja toxicidad.

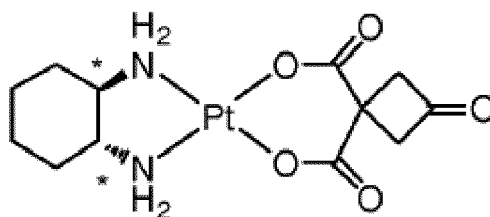
Descripción detallada de las realizaciones

40 La presente invención proporciona dos complejos de platino bivalentes con actividad biológica antitumoral eficaz y baja toxicidad. El radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico es un ligando de grupo saliente de los dos complejos de platino; uno de los complejos es cis-[radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico-diaminoplatino (II)] (abreviatura: GSH-5). Su estructura química se muestra en la fórmula (1):



Fórmula (1);

45 Otro complejo es cis-[radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico-trans-1,2-ciclohexanodiaminoplatino (II)] (abreviatura: GSH-6). Su estructura química se muestra en la fórmula (2):



Fórmula (2),

En la fórmula (2), los dos átomos de carbono quirales marcados con * en el grupo trans-1,2-ciclohexanodiamina tiene ambos la configuración R o la configuración S.

- 5 Los complejos de platino (II) bivalentes antitumorales mostrados en la fórmula (1) y la fórmula (2) de la presente invención se preparan mediante el siguiente método: en primer lugar, reacciona tetrahaloplatinato de potasio con amoníaco o trans-1,2-ciclohexanodiamina en disolución acuosa para obtener el complejo cis-[dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)]; luego se obtiene el producto objetivo en disolución acuosa mediante los siguientes métodos que se realizan con protección frente a la luz y mediante purga con nitrógeno: mediante el método A: se usan iones de plata para retirar iones haluro de [dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)], y reacciona el producto intermedio obtenido con 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino (sal de sodio o sal de potasio) para obtener el producto objetivo; o mediante el método B: reacciona 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata con [dihalo-bis-amino (o diamino)platino (II)] para obtener el producto objetivo.

- 15 El 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino implicado en el método A puede obtenerse haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de MOH (M es Na⁺ o K⁺) o MHCO₃ (M es Na⁺ o K⁺) en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con M₂CO₃ (M es Na⁺ o K⁺) en disolución acuosa.

- 20 El 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata implicado en el método B se obtiene haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de nitrato de plata en disolución acuosa.

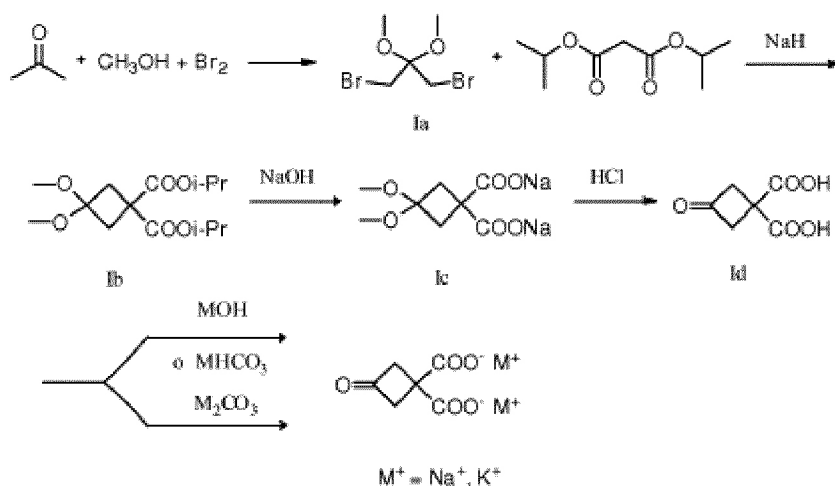
En cuanto al complejo de platino preparado mediante el método de la presente invención, las estructuras moleculares de los compuestos se determinan mediante H-RMN, ESI-EMAR y análisis elemental y se determinó su solubilidad en agua.

- 25 Datos espectrales del complejo GSH-5: ¹H-RMN (d⁶-DMSO): δ 3,717 (s, 4H, CH₂ de ciclobutilo), 4,195 (a, 6H, 2 x NH₃) ppm; ESI-EM: [M+H]⁺ = 386,02854 (48%), [M+Na]⁺ = 408,01273 (100%). Datos del análisis elemental (fórmula molecular: C₆H₁₀N₂O₅Pt): valor teórico el 18,71% de C, el 2,62% de H, el 7,27% de N, el 50,64% de Pt; valor medido el 18,66% de C, el 2,58% de H, el 7,29% de N, el 50,60% de Pt.

- 30 Datos espectrales del complejo GSH-6: ¹H-RMN (d⁶-DMSO): δ 1,011-1,044 (m, 2H, CH₂ de DACH), 1,195-1,232 (m, 2H, CH₂ de DACH), 1,445-1,473 (m, 2H, CH₂ de DACH), 1,801-1,841 (m, 2H, CH₂ de DACH), 2,056 (m, 2H, CHNH₂), 3,718 (s, 4H, CH₂ de ciclobutilo), 5,248 (a, 2H, NH₂), 5,947-5,977 (a, 2H, NH₂) ppm; ESI-EM: [M+H]⁺ = 466,09358 (29%), [M+Na]⁺ = 488,07568 (100%). DACH representa la estructura principal de trans-1,2-ciclohexanodiamina, y ciclobutilo representa un grupo ciclobutilo. Datos del análisis elemental (fórmula molecular: C₁₂H₁₈N₂O₅Pt): valor teórico el 30,97% de C, el 3,90% de H, el 6,02% de N, el 41,92% de Pt; valor medido el 31,02% de C, el 3,93% de H, el 6,03% de N, el 41,87% de Pt.

- 35 La solubilidad del complejo GSH-5 en agua es de 16 mg/ml, y la del complejo GSH-6 es de 2 mg/ml.

La presente invención también proporciona un método eficaz para preparar el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico como ligando de grupo saliente. Se prepara mediante la siguiente ruta de reacción A:



Ruta de reacción A

En primer lugar, reaccionan acetona, metanol y bromo para obtener la mediante condensación y bromación, en segundo lugar, la y malonato de diisopropilo siguen la reacción de ciclación bajo la acción de hidruro de sodio para obtener Ib, luego se hidroliza Ib en una disolución de hidróxido de sodio para obtener Ic, y se acidifica Ic con ácido clorhídrico para obtener Id (ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico); puede obtenerse el ligando (radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico) haciendo reaccionar un equivalente de Id y dos equivalentes de MOH (M es Na⁺ o K⁺) o MHCO₃ (M es Na⁺ o K⁺) en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes de Id con M₂CO₃ (M es Na⁺ o K⁺) en disolución acuosa.

10 La presente invención se describe adicionalmente haciendo referencia a las siguientes realizaciones, pero estas descripciones no deben limitar la presente invención. El iniciador dihalodiamino-platino (II) se prepara mediante un método bien conocido, que se ha descrito en la descripción.

(I) Preparación de compuestos

Realización 1: Preparación del complejo GSH-5 (Método A)

15 Se suspende cis-diyododiamino-platino (II) (4,83 g, 10 mmol) en 400 ml de agua con la condición de estar con protección frente a la luz y purga con nitrógeno, se añaden 30 ml de disolución acuosa de AgNO₃ (3,40 g, 20 mmol), se agita y se hace reaccionar a 40°C en un lugar oscuro durante 12 horas y se retira por filtración el yoduro de plata. Se añaden 40 ml de disolución acuosa que consiste en ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico (1,58 g, 10 mmol) y NaOH (0,80 g, 20 mmol) o Na₂CO₃ (1,06 g, 10 mmol) al filtrado anterior, se agita y se hace reaccionar a 40°C en un lugar oscuro durante 24 horas, y luego se filtra la disolución. Se concentra el filtrado para que precipite una gran cantidad de sólido. Se filtra, se lava repetidamente el sólido con agua, etanol y dietil éter y se seca el mismo a vacío para obtener 2,51 g de un sólido blanco, con un rendimiento del 65%.

Realización 2: Preparación del complejo GSH-5 (Método B)

25 Se suspende cis-diyododiamino-platino (II) (0,48 g, 1 mmol) en 100 ml de agua con la condición de estar con protección frente a la luz y purga con nitrógeno, se añade 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata (0,37 g, 1 mmol), se agita y se hace reaccionar a 55°C en un lugar oscuro durante 12 horas y se retira por filtración el yoduro de plata. Se concentra el filtrado para que precipite una gran cantidad de sólido. Se filtra y se seca a vacío para obtener 0,20 g de un sólido blanco, con un rendimiento del 53%.

Realización 3: Preparación del complejo GSH-6 (Método A)

30 Se suspende dicloro(trans-1R,2R-ciclohexanodiamino)platino (II) (0,38 g, 1 mmol) en 100 ml de agua con la condición de estar con protección frente a la luz y purga con nitrógeno, se añaden 10 ml de disolución acuosa de AgNO₃ (0,34 g, 2 mmol), se agita y se hace reaccionar a 40°C en un lugar oscuro durante 12 horas y se retira por filtración el cloruro de plata. Se añade el filtrado a 20 ml de disolución acuosa que consiste en ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico (0,16 g, 1 mmol) y KOH (0,11 g, 2 mmol) o KHCO₃ (0,20 g, 2 mmol), se agita y se hace reaccionar a 55°C en un lugar oscuro durante 24 horas y luego se filtra la disolución. Se concentra el filtrado para que precipite una gran cantidad de sólido. Se filtra, se lava con agua y se seca a vacío para obtener 0,24 g de un sólido blanco, con un rendimiento del 51%.

Realización 4: Preparación del complejo GSH-6 (Método B)

Se suspende dicloro(trans-1R,2R-ciclohexanodiamino)platino (II) (0,38 g, 1 mmol) en 100 ml de agua con la

condición de estar con protección frente a la luz y purga con nitrógeno, se añade 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata (0,37 g, 1 mmol), se agita y se hace reaccionar a 55°C en un lugar oscuro durante 12 horas y se retira por filtración el cloruro de plata. Se concentra el filtrado para que precipite una gran cantidad de sólido. Se filtra y se seca a vacío para obtener 0,31 g de un sólido blanco, con un rendimiento del 66%.

5 Realización 5: Preparación de ácido 3-cetona-1,1-ciclobutano-dicarboxílico (Id) (ruta de reacción A)

Se preparan los productos intermedios la e Ib mediante los métodos descritos en la bibliografía. Se disuelven 15 g del producto intermedio Ib en 200 ml de etanol, se añaden 30 ml de disolución acuosa de NaOH (12 g, 0,3 mol), se pone a reflujo la disolución de reacción durante 3 horas, se filtra a vacío para obtener un sólido blanco y se lava el mismo con etanol 3 veces para obtener el producto intermedio Ic.

- 10 Se disuelve el producto intermedio Ic en 100 ml de disolución de ácido clorhídrico 6 M, y se agita y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante la noche. Se extrae la disolución de reacción con 400 ml de acetato de etilo, se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, luego se concentra hasta aproximadamente 10 ml, se añaden 300 ml de éter de petróleo o dietil éter y se mantiene la disolución mezclada en una nevera durante la noche para que precipite un sólido de color amarillo claro. Se disuelve el producto en bruto en agua, se calienta, se decolora mediante carbono activado y se recristaliza para obtener el producto sólido blanco Id, con un rendimiento del 89%.
- 15

Realización 6: Preparación del ligando (radical de ácido 3-cetona-1,1-ciclobutano-dicarboxílico) (ruta de reacción A)

Puede obtenerse el ligando mediante los siguientes tres métodos:

- 20 (i) Se obtiene disolviendo Id (1,58 g, 10 mmol) y NaOH (0,80 g, 20 mmol) o KOH (1,12 g, 20 mmol) en 40 ml de disolución acuosa;
- (ii) se obtiene disolviendo Id (1,58 g, 10 mmol) y NaHCO₃ (1,68 g, 20 mmol) o KHCO₃ (2,00 g, 20 mmol) en 50 ml de disolución acuosa; o
- (iii) se obtiene disolviendo Id (1,58 g, 10 mmol) y Na₂CO₃ (1,06 g, 10 mmol) o K₂CO₃ (1,38 g, 10 mmol) en 50 ml de disolución acuosa.

25 Realización 7: Preparación de 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata

Se suspende ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico (1,58 g, 10 mmol) en 100 ml de agua en un lugar oscuro, se añaden 20 ml de disolución acuosa de AgNO₃ (3,40 g, 20 mmol), se agita y se hace reaccionar a temperatura ambiente en un lugar oscuro durante 1-2 horas, se filtra, se lava con agua para que precipite un sólido blanco y se seca el mismo a vacío para obtener 3,41 g del sólido, con un rendimiento del 92%.

30 (II) Prueba de citotoxicidad *in vitro* de los complejos

Ejemplo de prueba 1.

Este ejemplo de prueba adopta el método de MTT para realizar la prueba de citotoxicidad con los complejos de la presente invención y los fármacos de platino anticancerígenos clínicos comunes.

- 35 Método de MTT: Se seleccionan células en fase logarítmica, se cuentan y se inoculan en una placa de cultivo de 96 pocillos, a aproximadamente 8000-10000 células/pocillo. Se cultivan las células durante la noche, se administra el fármaco después de que las células se adhieran a la pared, y se establece un grupo de fármaco, un grupo de control positivo y un grupo de control negativo. Se prepara el complejo que va a someterse a prueba en una disolución madre usando una disolución acuosa de glucosa al 5%. Antes de su uso, se diluye con medio de cultivo celular para obtener disoluciones a una serie de concentraciones. Cada concentración tiene 3 pocillos por duplicado. Se cultiva
- 40 durante 48 horas después de la administración del fármaco, se añaden 20 µl de MTT 5 mg/ml, se incuba a 37°C durante 4 horas, se retira el sobrenadante y se añaden 150 µl de formazano disuelto en DMSO. Se determina el valor de DO de cada pocillo a una longitud de onda de 490 nm mediante un lector de microplacas, se calcula la tasa de inhibición, se traza una curva de concentración-tasa de inhibición y se calcula el valor de CI₅₀.

- 45 Este ejemplo de prueba adopta el método de MTT para someter a prueba la citotoxicidad de los complejos GSH-5 y GSH-6 para múltiples clases de células tumorales humanas (célula de cáncer de pulmón humano A549, célula endotelial de la vena del cordón umbilical humano HUVEC, célula de cáncer de mama humano MCF-7, célula resistente a fármacos de cáncer de mama humano MCF-7, célula de cáncer de mama humano MDA-MB-231, célula de adenocarcinoma gástrico humano BGC823, célula de carcinoma hepatocelular humano HepG-2, célula de eritroleucemia humana K562, célula de leucemia promielocítica aguda humana NB4, célula de cáncer de pulmón de
- 50 células grandes humano NCI-H460 y célula de carcinoma hepatocelular humano SMMC-7721), usando cisplatino, oxaliplatino y carboplatino como controles positivos. Como los complejos de platino preparados tienen una solubilidad en agua deseable, se usan disoluciones de glucosa al 5% de las muestras para las pruebas. Se muestran los resultados en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de CI_{50} de los complejos con algunas células tumorales humanas (μM)

Célula tumoral	CI_{50} (μM)				
	GSH-5	GSH-6	Cisplatino	Oxaliplatino	Carboplatino
A549	36,33	47,53	16,61	70,31	137,42
HUVEC	30,18	68,94	11,24	16,29	101,58
MCF-7	33,43	34,23	32,92	25,71	109,47
MCF-7 resistente a fármacos	20,78	1348,48	32,94	351,35	457,41
MDA-MB-231	31,05	36,33	18,27	29,12	93,29
BGC823	8,82	8,90	5,44	7,92	43,21
HepG2	9,67	31,63	2,11	27,22	99,10
K562	15,43	35,97	10,93	23,628	117,71
NB4	2,18	3,10	1,27	52,82	12,59
NCI-H460	7,45	11,91	nd*	23,08	30,58
SMMC-7721	10,39	216,50	nd*	32,32	52,66

*. Sin determinar.

(III) Efectos inhibidores tumorales *in vivo* de los complejos

Ejemplo de prueba 2.

- 5 Este ejemplo de prueba adopta un método de modelo animal de tumor trasplantado en ratón para someter a prueba los efectos inhibidores de los complejos proporcionados por la presente invención en tumor Heps y sarcoma S180 de tumor trasplantado en animales.

Se obtienen ratones *ICR* y se inocula un tumor sólido según el método de investigación del tumor trasplantado. Se pesan los ratones 24 horas después de la inoculación y se dividen aleatoriamente en 7 grupos, 8 ratones por grupo de fármaco. Se administra el fármaco mediante inyección intravenosa la primera vez 24 horas (d_1) después de la inoculación, se administra el fármaco una vez cada dos días un total de 4 veces, a una dosis de 0,4 ml/20 g cada vez. Se sacrifican y se pesan los ratones que portan tumor 10 días (d_{10}) después de la inoculación, se separan y se pesa la masa tumoral, y se realiza un tratamiento estadístico de todos los datos obtenidos (prueba de la *t*). El efecto inhibidor de los complejos sobre los tumores Heps y S180 trasplantados en ratón se muestra en la tabla 2 y la tabla 3, respectivamente.

Tabla 2. Efecto inhibidor de los complejos sobre tumor S180 trasplantado en ratón

Grupo	Dosis (mg/kg)	Peso corporal (g)		Número de animales		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
		Antes de la administración	Después de la administración	Al principio de la prueba	Al final de la prueba		
		$(\bar{X} \pm DE)$					
Grupo de control de modelo	-	23,80±1,33	23,80±1,78	10	10	0,97±0,17	
GSH-5	30 mg/kg	22,80±1,94	18,13±1,76**	10	8	0,07±0,10**	92,80
	15 mg/kg	19,25±0,66	22,50±1,91*	10	10	0,36±0,15**	62,76
GSH-6	20 mg/kg	19,50±2,35	18,60±2,24**	10	10	0,52±0,13**	46,61
	10 mg/kg	22,80±1,33	20,60±2,50**	10	10	0,65±0,14**	33,13

* $P < 0,05$ en comparación con el grupo de control de modelo, ** $P < 0,01$ en comparación con el grupo de control de modelo.

Tabla 3. Efecto inhibitor de los complejos en tumor Heps trasplantado en ratón

$$(\bar{X} \pm DE)$$

Grupo	Dosis	Peso corporal (g)		Número de animales		Peso tumoral	Tasa de inhibición tumoral
	(mg/kg)	Antes de la administración	Después de la administración	Al principio de la prueba	Al final de la prueba	(g)	(%)
Grupo de control de modelo	----	19,75±1,48	27,63±2,83	8	8	1,30±0,45	
GSH-5	50 mg/kg	19,50±0,71	13,50±0,50**	8	2	0,00**	100
	25 mg/kg	19,25±0,66	22,13±3,52**	8	8	0,39±0,32**	70,08
GSH-6	50 mg/kg	19,50±2,35	-	8	0	-	-
	25 mg/kg	19,13±1,69	18,10±1,10**	8	8	0,84±0,17	35,44

**P<0,01 en comparación con el grupo de control de modelo.

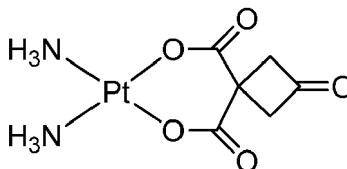
(IV) Toxicidad preliminar de los complejos

5 Ejemplo de prueba 3.

10 Se seleccionan 50 ratones Kunming de grado limpio, 25 machos y 25 hembras, con un peso corporal de 18~22 g, se dividen aleatoriamente en 5 grupos, 10 ratones en cada grupo, y se mantienen en estado de ayuno durante 12 horas. Se disuelven el complejo GSH-5 y el complejo GSH-6 en disolución de glucosa al 5% y se les inyecta (por vía i.v.) la disolución a los ratones a través de la vena caudal en 5 dosis. La capacidad de aceptación de un animal es de 0,4 ml/20 g. Se observan de manera continua durante 14 días después de la administración, y se registran los síntomas de toxicidad y la muerte de los ratones. Se calculan los resultados del experimento según el método de Bliss para obtener los valores de DL₅₀ del complejo GSH-5 y el complejo GSH-6 para ratones (por vía i.v.), que son de 150 mg/kg y 100 mg/kg (límite de confianza del 95%) respectivamente.

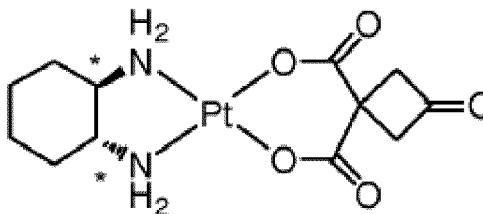
REIVINDICACIONES

1. Complejo de platino bivalente que comprende radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico como ligando de grupo saliente de dicho complejo de platino, en donde el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cis-[radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico-diaminoplatino (II)] (también conocido como GSH-5) que tiene una estructura química tal como se muestra en la fórmula (1):



Fórmula (1);

y cis-[radical de ácido 3-cetona-1,1-ciclobutano-dicarboxílico-trans-1,2-ciclohexanodiaminoplatino (II)] (también conocido como GSH-6), que tiene una estructura química tal como se muestra en la fórmula (2):



Fórmula (2),

en el que en la fórmula (2), los dos átomos de carbono quirales marcados con * en el grupo trans-1,2-ciclohexanodiamina tienen ambos la configuración R.

2. Método para preparar el complejo de platino bivalente según la reivindicación 1, en donde los complejos de platino bivalentes mostrados en la fórmula (1) y la fórmula (2) se preparan mediante el siguiente método:

A) hacer reaccionar tetrahaloplatinato de potasio con amoníaco o trans-1,2-ciclohexanodiamina en disolución acuosa para obtener el complejo cis-[dihalo-bis-aminoplatino (II)] o cis-[dihalo-diaminoplatino (II)];

B) obtener el producto objetivo en disolución acuosa usando uno de los siguientes métodos, y realizando dichos métodos con protección frente a la luz y mediante purga con nitrógeno:

- a) usar iones de plata para retirar iones haluro de cis-[dihalo-bis-aminoplatino (II)] o cis-[dihalo-diaminoplatino (II)], y hacer reaccionar el producto intermedio resultante con 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino para obtener el producto objetivo;

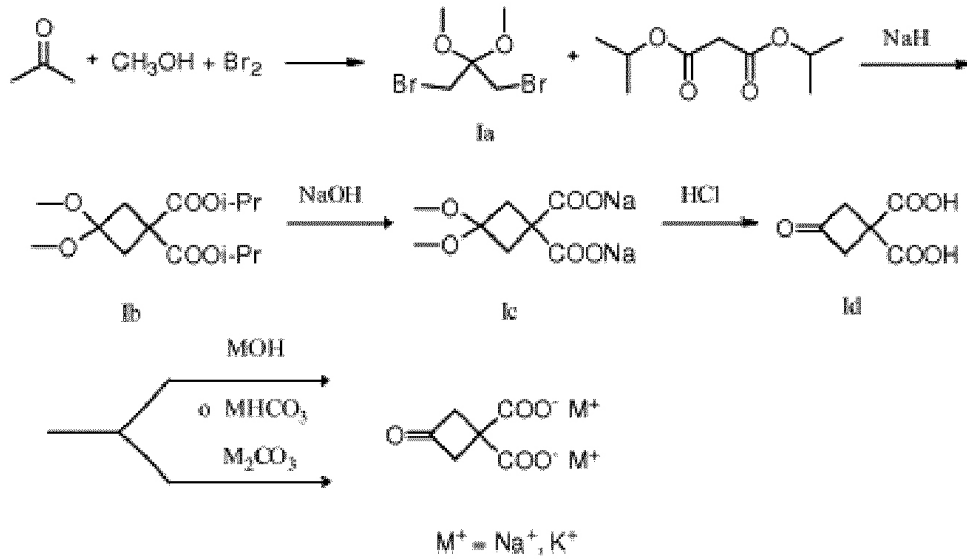
o alternativamente

- b) hacer reaccionar 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata con cis-[dihalo-bis-aminoplatino(II)] o cis-[dihalo-diaminoplatino (II)].

3. Método para preparar el complejo de platino bivalente según la reivindicación 2, en donde se obtiene el 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de metal alcalino usado en la etapa a2) haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de MOH o MHCO_3 en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con M_2CO_3 en disolución acuosa, en el que M se selecciona de Na^+ o K^+ .

4. Método para preparar el complejo de platino bivalente según la reivindicación 2, en donde se obtiene el 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxilato de plata usado en la etapa b) haciendo reaccionar un equivalente de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico con dos equivalentes de nitrato de plata en disolución acuosa.

5. Método para preparar el complejo de platino bivalente según la reivindicación 2, en donde se prepara el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico mediante la siguiente ruta de reacción A:



Ruta de reacción A

que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) hacer reaccionar acetona, metanol y bromo para obtener el producto Ia mediante condensación y bromación,
- b) hacer que el producto Ia y malonato de diisopropilo experimenten una reacción de ciclación bajo la acción de hidruro de sodio para producir el producto Ib,
- c) hidrolizar el producto Ib en una disolución de hidróxido de sodio para producir el producto Ic,
- 10 d) acidificar el producto Ic con ácido clorhídrico para producir el producto Id, es decir: ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico; y
- e) obtener el radical de ácido 3-cetona-ciclobutano-1,1-dicarboxílico haciendo reaccionar un equivalente del producto Id con dos equivalentes de MOH o $MHCO_3$ en disolución acuosa, o haciendo reaccionar los mismos equivalentes del producto Id con M_2CO_3 en disolución acuosa; en el que M^+ se selecciona de Na^+ o K^+ .

15