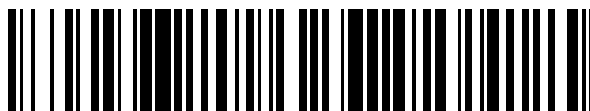


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 305**

51 Int. Cl.:

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 33/32 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2010 PCT/IB2010/053097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11004325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10740006 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2451457**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos que emplean una combinación de un compuesto complejo de manganeso y una forma compleja sin manganeso del compuesto**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223204 P

19.02.2010 US 306348 P

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

25.04.2018

73 Titular/es:

PLEDPHARMA AB (100.0%)

Grev Turegatan 11C

114 46 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

KARLSSON, JAN-OLOF y

ANDERSSON, ROLF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 305 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

Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos que emplean una combinación de un compuesto complejo de manganeso y una forma compleja sin manganeso del compuesto

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere composiciones farmacéuticas para su utilización en un método de reducción de la absorción de manganeso en el cerebro de un paciente cuando un proceso patológico en un paciente producido por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno se trata mediante la administración de un complejo de manganeso de un compuesto, empleando el método una combinación de un complejo de manganeso de un compuesto de dipiridoxilo, por ejemplo, MnDPDP (ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético de manganeso) u otros complejos de manganeso de fórmula I (en lo sucesivo, derivados de piridoxil etil-diamín manganeso) o derivados de MnPLED), como primer componente, y un compuesto que no contiene manganeso de fórmula I (denominado en lo sucesivo derivado de PLED), por ejemplo DPDP, como segundo componente, como agentes terapéuticos. Las composiciones de la invención se pueden usar en cualquier método de tratamiento que emplea convencionalmente dichos complejos de manganeso para efecto terapéutico. En una realización específica, 15 las composiciones pueden usarse en el tratamiento de estados patológicos producidos por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno en el cuerpo, es decir, estrés oxidativo.

Antecedentes de la invención

Se conoce en medicina el uso de agentes quelantes a base de dipiridoxilo y sus quelatos de metales y determinados compuestos que contienen manganeso, en particular quelatos de manganeso. Véanse los documentos EP 0910360, 20 US 6147094, EP 0936915, US 6258828, EP 1054670, US 6310051, EP 1060174 y US 6391895, por ejemplo, que describen que determinados agentes quelantes, en particular los agentes quelantes a base de dipiridoxilo y ácido aminopolicarboxílico, y sus quelatos de metales, son eficaces en el tratamiento o la prevención de la cardiotoxicidad inducida por antraciclina, la toxicidad inducida por radiación, la lesiones inducidas por isquemia-reperusión y aterosclerosis, o desde un punto de vista más general, todos los estados patológicos producidos por la presencia de 25 radicales libres derivados del oxígeno, es decir, estrés oxidativo, en personas y animales.

Se sabe desde hace mucho tiempo que los radicales libres derivados de oxígeno de corta vida pero muy reactivos participan en el daño hístico patológico, especialmente durante el tratamiento con agentes citotóxicos/citostáticos y radioterapia en pacientes con cáncer (Towart *et al.*, *Arch. Pharmacol.* 1998; 358 (Supl. 2):R626, Laurent *et al.*, *Cancer Res.* 2005; 65: 948-956, Karlsson *et al.*, *Cancer Res.* 2006; 66:598, Alexandre *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98:236-244, Doroshov, *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 223-225), insuficiencia hepática inducida por acetaminofeno (Bedda *et al.*, *J. Hepatol.* 2003; 39:765-772; Karlsson, *J. Hepatol.* 2004; 40:872-873), en cardiopatía isquémica (Cuzzocrea *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 2001; 53:135-159) y en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Knight, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1997; 27:11-25). La sobreproducción de radicales libres derivados de 35 oxígeno también está implicada en estados patológicos de sobrecarga de hierro (Rachmilewitz *et al.*, *Ann. N Y Acad. Sci.* 2005; 1054:118-23), por ejemplo, en talasemia, anemia drepanocítica y hemosiderosis transfusional. Los radicales libres derivados de oxígeno también están implicados en la cirrosis hepática inducida por hepatitis (Farrell *et al.*, *Anat. Rec.* 2008; 291:684-692) y en la pérdida de audición inducida por ruido (Wong *et al.*, *Hear Res.* 2010; 260:81-88).

40 Uno de los derivados de MnPLED, a saber ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N, N'-diacético de manganeso; MnDPDP), está aprobado para su uso como agente de contraste de diagnóstico por MRI en personas. Curiosamente, se ha demostrado también que MnDPDP protege a los ratones contra los efectos secundarios graves de varios fármacos citotóxicos/citostáticos (doxorubicina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo y paclitaxel), sin interferir negativamente con los efectos anticancerígenos de estos fármacos (Towart *et al.*, 1998, Laurent *et al.*, 2005, Karlsson *et al.*, 2006, Alexandre *et al.*, 2006, Doroshov, 2006). MnDPDP se ha probado en un paciente con cáncer de colon que se somete a tratamiento paliativo con una combinación de folinato, 5-fluorouracilo y oxaliplatino (FOLFOX) (Yri *et al.*, *Acta Oncol.* 2009; 48: 633- 635). Los datos preclínicos y los resultados de este paciente fueron tan prometedores que las pruebas clínicas en pacientes con cáncer han comenzado en Suecia. Se ha completado un primer estudio de viabilidad y se han comunicado resultados positivos a la Agencia Médica Sueca.

50 También se ha descrito que MnDPDP protege a los ratones contra la insuficiencia hepática aguda inducida por acetaminofeno en ratones (ALF) (Bedda *et al.*, 2003; Karlsson, 2004). ALF se caracteriza por la muerte masiva de hepatocitos, una afección causada por el agotamiento de glutatión, radicales libres derivados de oxígeno y lesión mitocondrial.

El MnDPDP es un profármaco en el sentido de que probablemente tiene que metabolizarse en ácido N, N'-dipiridoxil etilendiamina-N, N'-diacético (MnPLED) antes de que pueda ejercer efectos citoprotectores durante las afecciones *in vivo* (p. ej., véase Karlsson *et al.*, *Acta Radiol.* 2001; 42:540-547).

El manganeso es un metal esencial y potencialmente neurotóxico. Se sabe desde hace muchos años que en condiciones de exposición crónica a altos niveles de manganeso, se produce con frecuencia un síndrome de disfunción extrapiramidal similar al síndrome de Parkinson, aunque clínicamente una entidad patológica diferente ocurre frecuentemente (véase Scheuhammer y Cherian, *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 1982; 11:515-520).

5 Cuando se inyecta por vía intravenosa una dosis de diagnóstico por RM de MnDPDP en personas, se libera aproximadamente el 80% del manganeso administrado (Toft *et al.*, *Acta Radiol* 1997; 38: 677-689). La liberación de manganeso paramagnético es, de hecho, un requisito previo para las propiedades de diagnóstico por RM de MnDPDP (Wendland, *NMR Biomed.* 2004; 17:581-594). Por otro lado, los efectos terapéuticos de MnDPDP y sus contrapartidas desfosforiladas MnDPMP (N,N'-dipiridoxiletilendiamina-N,N'-diacetato-5-fosfato) y MnPLED dependen del complejo metálico intacto (Brurok *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 254:768-721, Karlsson *et al.* 2001; 42:540-547).

10 Los derivados de PLED imitan a la enzima mitocondrial superóxido de manganeso dismutasa (MnSOD) (Brurok *et al.*, 1999). MnSOD protege la célula de mamífero del radical superóxido, subproducto del metabolismo del oxígeno, que se produce en cantidades bastante altas durante las condiciones aeróbicas normales; ningún mamífero sobrevive sin un MnSOD funcional. MnSOD tiene el número de recambio más rápido (velocidad de reacción con su sustrato) de cualquier enzima conocida ($> 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Fridovich, *J. Exp. Biol.* 1998; 201:1203-1209). Los miméticos de MnSOD de bajo peso molecular pueden tener velocidades de recambio cercanas a la de MnSOD natural (Cuzzorea *et al.*, 2001). Curiosamente, los tampones fisiológicos que contienen metales de transición como el manganeso pueden tener números de recambio elevados similares (Culotta *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763:747-758). Sin embargo, la importancia de las enzimas SOD naturales es coherente con un proceso de selección que favorece organismos que elaboran un medio para localizar catalizadores de metales de transición para la dismutación de superóxido en partes de la célula donde existe una gran necesidad de dicha dismutación, p. ej., mitocondrias. Además, los resultados de la isquemia-reperfusión del miocardio en cerdos anestesiados muestran inevitablemente que el MnPLED intacto, pero no el manganeso por sí mismo, protege contra el estrés oxidativo, visto como una reducción en el tamaño del infarto (Karlsson *et al.*, 2001). La inactivación efectiva del superóxido es esencial para prevenir la generación de radicales hidroxilo y peroxinitrito muy devastadores (Cuzzocrea *et al.*, 2001). Durante el estrés oxidativo patológico, la formación de radicales superóxido a menudo excede la capacidad endógena de inactivación. Además, el superóxido estimula la producción de peroxinitrito que nitrifica la SOD endógena. Una vez nitrados, MnSOD y/o CuZn SOD pierden su actividad enzimática, un hecho que favorece la acumulación de superóxido y daño inducido por superóxido (Muscoli *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 2003; 140:445-460). La adición exógena de derivados de MnPLED puede en tales situaciones restablecer el potencial de protección. Los derivados de PLED son además fuertes aglutinantes de hierro, como se describe en los documentos EP 1054670, US 6310051 y por Rocklage *et al.* (*Inorg. Chem.* 1989; 28:477-485), y algunos derivados de MnPLED pueden tener actividades de catalasa y glutatión reductasa (Laurent *et al.*, 2005), que pueden aumentar aún más su capacidad antioxidante.

35 Para el uso de diagnóstico por la imagen y otros usos esporádicos, la disociación del manganeso de MnDPDP no representa un problema toxicológico importante. Sin embargo, debido a la absorción en el SNC, para un uso más frecuente, por ejemplo en los métodos terapéuticos, la toxicidad acumulada de manganeso puede representar un problema neurotoxicológico grave (Crossgrove & Zheng, *NMR Biomed.* 2004; 17:544-53). Por lo tanto, para uso terapéutico más frecuente, se deben evitar los compuestos que disocian fácilmente el manganeso.

40 Para que el manganeso se distribuya desde la sangre hacia el tejido cerebral, debe atravesar ya sea la barrera hematoencefálica o la barrera sangre- fluido cefalorraquídeo. El mecanismo por el cual el cerebro absorbe el manganeso es poco conocido. Sin embargo, algunas referencias sugieren que el manganeso se absorbe como ion libre ($\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$) o como citrato de manganeso y respalda la hipótesis de que el transporte de manganeso es facilitado por un mecanismo activo o pasivo (Rabin *et al.*, *J. Neurochem.* 1993; 61: 509-517; Yokel, *Environ. Health Perspect.* 2002; 110 supl. 5:699-704). El manganeso también puede ser transportado al SNC unido a la transferrina. No obstante, en el caso de MnDPDP y sus equivalentes desfosforilados (además de otros derivados MnPLED), el manganeso probablemente debe disociarse de su correspondiente quelante DPDP, DPMP o PLED (u otros derivados PLED) para obtener acceso al cerebro.

45 El tratamiento con el EDTA quelante de metales en ratas que han estado expuestas sistémicamente al manganeso durante muchos días aumentó considerablemente la excreción urinaria de manganeso (Scheuhammer y Cherian, 1982). Efectos similares del EDTA también se han observado en la concentración de manganeso en la orina en soldados envenenados crónicamente (véase Crossgrove & Zheng, 2004). El tratamiento de ratas con cloruro de manganeso (II) (50 mg/kg de peso corporal, ip.) una vez al día durante 1 o 4 días condujo a aumentos en las concentraciones de manganeso de hasta 232, 523 y 427% en la corteza cerebral, globo pálido, y cerebelo, respectivamente. Estos cambios fueron acompañados por el desarrollo de cambios patológicos en la morfología glial. El tratamiento conjunto con el quelante de manganeso 1,2-ciclohexilendinitrilotetraacético (CDTA) bloqueó completamente esta patología (véase Hazell *et al.*, *Neurosci. Lett.* 2006; 396:167-71), aunque estos autores no informaron si este efecto de CDTA era debido a la inhibición directa de la absorción de manganeso en el cerebro.

55 El documento WO 2009/078794 A1 (PLEDPHARMA AB) se refiere a compuestos de agentes quelantes basados en dipiridoxilo tales como ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético o una de sus sales (DPDP) para uso en el tratamiento del cáncer.

60 El documento WO 97/49409 A1 (NYCOMED IMAGING A) se refiere al uso de agentes quelantes a base de dipiridoxilo y ácido aminopolicarboxílico y sus quelatos, especialmente ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético de manganeso, MnDPDP (mangafodipir), en la preparación de un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la profilaxis de afecciones que proceden de la presencia de radicales libres en el cuerpo animal humano o no humano. Dichos compuestos son especialmente eficaces en el alivio de los síntomas

relacionados con la reperusión del tejido isquémico y en el tratamiento o prevención de la lesión inducida por radiación.

El documento WO 02/087579 A1 (UNIV. PARIS DESCARTES) se refiere al uso de mangafodipir para obtener una medicina para tratamiento preventivo o curativo de insuficiencias hepatocelulares.

- 5 El documento US 6 310 051 B1 se refiere al uso de agentes quelantes a base de dipiridoxilo y ácido aminopolicarboxílico, quelatos metálicos y una de sus sales, en la preparación de un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la aterosclerosis y afecciones relacionadas en el cuerpo de animal humano o no humano.

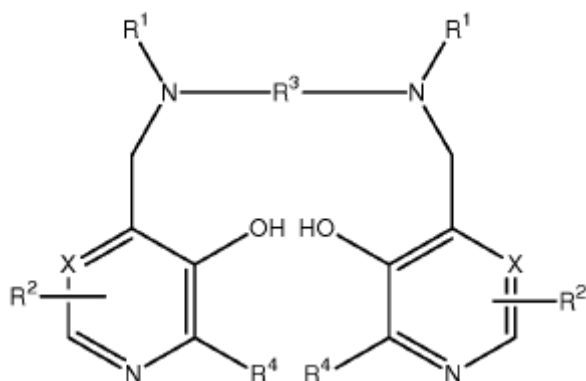
10 Por lo tanto, aunque se conocen compuestos complejos de manganeso para proporcionar efectos terapéuticos en diversos tratamientos, hay necesidad de desarrollar medios para obtener dichos efectos terapéuticos a la vez que se reducen los efectos secundarios indeseables relacionados con dichos tratamientos.

Compendio de la invención

15 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas mejoradas para su uso en la reducción de la absorción de manganeso en el cerebro de un paciente cuando un proceso patológico en un paciente producido por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno se trata mediante la administración de un complejo de manganeso de un compuesto. Las composiciones son para un paciente humano o no humano, y las composiciones farmacéuticas superan varios inconvenientes de la técnica anterior.

20 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de un estado patológico en un paciente, que comprende como primer componente, un complejo de manganeso de fórmula I, y, como segundo componente, un compuesto complejo sin manganeso de fórmula I, opcionalmente junto con uno o más portadores y/o excipientes fisiológicamente aceptables,

Fórmula I



en donde

X representa CH o N,

- 25 cada R¹ representa independientemente hidrógeno o -CH₂COR⁵;

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

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

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

- 30 R⁶ es un átomo de hidrógeno, COOR⁸, alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo o aralquilo, grupo opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de COOR⁸, CONR⁸, NR⁸, OR⁸, =NR⁸, =O, OP(O) (OR⁸)R⁷ y OSO₃M; R⁷ es hidroxilo, un grupo alquilo o aminoalquilo opcionalmente hidroxilado u opcionalmente alcoxilado;

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

M es un átomo de hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable;

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

40 cada R⁴ representa independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃, en donde el estado patológico se produce por la presencia de radicales libres procedentes del oxígeno, en donde el segundo componente está incluido en una cantidad de aproximadamente 1 a 20 μmol/kg de peso corporal de un paciente y en donde el primer y segundo componentes están incluidos en una relación molar de primer:segundo componente en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:10.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen ventajas sorprendentes, como se describe y se demuestra en la presente memoria. Por ejemplo, las composiciones pueden aumentar la cantidad de manganeso excretado, reducir la cantidad de manganeso libre en el paciente y/o aumentar la cantidad de metabolito terapéutico producido *in vivo*, en comparación con los efectos obtenidos por la administración del primer componente complejo de manganeso solamente, en ausencia del segundo componente que no contiene manganeso. Ventajas adicionales y realizaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención se entenderán más completamente a la vista de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada se comprenderá más completamente a la vista de los dibujos, en donde:

10 Las figs. 1A y 1B muestran el contenido de Mn en la orina de 0-24 h de ratas a las que se inyectó MnDPDP solo o con una combinación de MnDPDP y DPDP, expresadas como $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal (figura 1A) o como porcentaje de la dosis inyectada (fig. 1B); media \pm S.E.M. ; n = 7 en cada grupo.

15 La fig. 2 muestra el contenido de Mn en el cerebro en ratas a las que se inyectó MnDPDP solo o con una combinación de MnDPDP y DPDP, expresado como un aumento porcentual en el cerebro Mn/g p.p.; media \pm S.E.M.; n = 4 en cada grupo.

20 Las figs. 3A y 3B muestran el contenido de Mn en el cerebro en ratas inyectadas con MnDPDP solo o con una combinación de MnDPDP y DPDP, expresado como un aumento en μg Mn cerebral/g p.p. (fig. 3A) y como aumento en porcentaje en Mn cerebral (figura 3B); media \pm S.E.M.; n = 5 en cada grupo, y la figura 3C muestra el contenido de Zn cerebral en ratas inyectadas con MnDPDP solo o con MnDPDP más DPDP; media \pm S.E.M.; n = 3 en cada grupo.

Las figs. 4A y 4B muestran curvas de dosis-respuesta durante 0-24 h de excreción de Zn y Mn en ratas a dosis crecientes de DPDP (fig. 4A); media \pm S.E.M. (n = 10), y la excreción de 0-24 h de Zn inyectada con MnDPDP solo o con una combinación de MnDPDP y DPDP, expresada como $\mu\text{mol/kg}$ p.c. (fig. 4B); media \pm S.E.M.; n = 2 en cada grupo.

25 Las figs. 5A-5D muestran recuentos de células sanguíneas (recuento de glóbulos blancos (WBC), recuento absoluto de neutrófilos (ANC), monocitos y linfocitos, respectivamente) después del tratamiento con paclitaxel solo o en combinación con MnDPDP \pm DPDP; media \pm S.E.M. ; n = 3-5 en cada grupo.

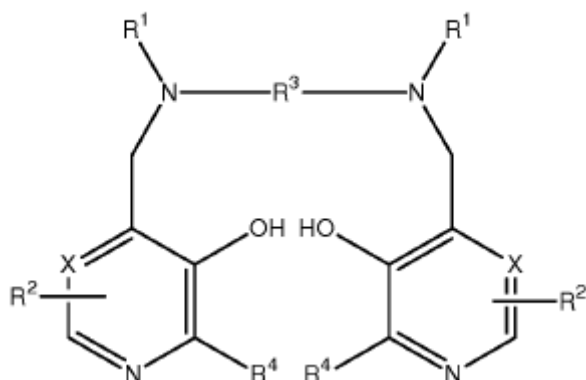
Los dibujos se comprenderán más completamente a la vista de los ejemplos.

Descripción detallada

30 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que emplean una combinación de, como primer componente, un complejo de manganeso de fórmula I como se indica en la presente memoria y, como segundo componente, un compuesto complejo sin manganeso de fórmula I. Los compuestos de fórmula I son compuestos de dipiridoxilo y se denominan en la presente memoria PLED derivados de (Piridoxil EtilDiamina) aunque se reconoce que los derivados también actúan como profármacos de PLED ya que pueden metabolizarse para formar PLED *in vivo*. Dichos compuestos en forma de complejos metálicos se denominan derivados de MetalPLED, es decir, derivados de MnPLED y quelantes de MetalPLED.

Las presentes composiciones farmacéuticas emplean, como primer componente, un complejo de manganeso de fórmula I, y, como segundo componente, un compuesto complejo que no es manganeso de fórmula I:

Fórmula I



40 en donde

X representa CH o N,

cada R¹ representa independientemente hidrógeno o -CH₂COR⁵;

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

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

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

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

R⁸ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente hidroxilado u opcionalmente alcoxlado;

M es un átomo de hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable;

- 10 R³ representa un grupo alquileo C₁₋₈, un 1,2-cicloalquileo o un 1,2-arileno, opcionalmente sustituido con R⁷; y cada R⁴ representa independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₃.

- 15 En una realización específica, R⁵ es hidroxilo, alcoxi C₁₋₈, etilenglicol, glicerol, amino o alquilamido C₁₋₈; Z es un enlace o un grupo seleccionado entre CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO y CH₂COCH₂; Y es un enlace; R⁶ es un grupo alquilo mono- o poli(hidroxilo o alcoxlado) o de fórmula OP(O) (OR⁸)R⁷; y R⁷ es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido. En una realización adicional, R³ es etileno y cada grupo R¹ representa -CH₂COR⁵ en el que R⁵ es hidroxilo. En todavía otras realizaciones, el primer componente es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato) -etilendiamin-N,N'-diacético de manganeso o una de sus sales (MnDPDP) y el segundo componente es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético (DPDP) o una sal o uno de sus complejos sin manganeso. En realizaciones más específicas, el segundo componente es DPDP, DPDP de calcio (CaDPDP) o DPDP de magnesio (MgDPDP), o una combinación de dos o más de los mismos.

- 20 En otras realizaciones de la invención, el primer componente tiene un valor de K_a en el intervalo de 10⁸ a 10²⁴. En otra realización, el segundo componente tiene un valor de K_a inferior para Mn²⁺ que el correspondiente valor de K_a para el cinc (Zn²⁺), por un factor de al menos 10.

- 25 El primer componente y el segundo componente se pueden emplear en cantidades variables como se expondrá con más detalle a continuación. Solo es necesario que exista un compuesto exento de manganeso, además del compuesto que contiene manganeso, es decir, un "excedente" del compuesto derivado no complejo, que el segundo componente se incluye en una cantidad de aproximadamente 1-20 μmol/kg de peso corporal de un paciente y que la relación molar de primer componente:segundo componente está comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:10, o 1:1 a 1:5. En una realización aún más específica, el primer componente y el segundo componente se incluyen en una relación molar de primer componente:segundo componente comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:2 a 3:4. En una realización específica, por ejemplo, para utilización en el tratamiento del cáncer, una cantidad del primer componente, por ejemplo MnDPDP, puede ser MnDPDP 10 mM, y la cantidad del segundo componente, por ejemplo DPDP, puede ser DPDP 50 mM, 0,2 ml/kg dará como resultado una dosis de 2 μmol/kg p.c. MnDPDP + 10 μmol/kg p.c. DPDP, proporcionando una relación molar de 1:5. En otras realizaciones, la dosis de compuesto que contiene Mn tal como MnDPDP puede reducirse. Si se reduce la dosis de MnDPDP, se puede emplear una relación menor de 1:5.

- 35 La liberación *in vivo* de manganeso de derivados de MnPLED, incluido el ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético de manganeso (MnDPDP), depende de la presencia de cinc libre o fácilmente disociable en el cuerpo. El cinc tiene una afinidad aproximadamente 1.000 veces mayor que el manganeso por DPDP o sus equivalentes desfosforilados (Rocklage *et al.*, 1989). Los estudios experimentales sugieren que la liberación de manganeso *in vivo* se satura cuando la dosis de MnDPDP aumenta de dos a cuatro veces la dosis para diagnóstico por la imagen de 5 a 10 μmol/kg (Southon *et al.*, *Acta Radiol.* 1997; 38:708-716). El diagnóstico por la imagen cardíaco y hepático con MnDPDP en voluntarios sanos indica una dosis de saturación de 10 a 20 μmol/kg en el hombre (Skjold *et al.*, *J. Magn. Reson. Imaging* 2004; 20:948-952, Toft *et al.*, 1997).

- 45 Se ha descubierto según la invención que, sorprendentemente, la adición de un exceso de derivado PLED que no contiene manganeso, por ejemplo DPDP, a un tratamiento derivado de MnPLED, por ejemplo tratamiento con MnDPDP, protege a MnDPDP de la liberación de manganeso neurotóxico. Aunque el mecanismo subyacente a la absorción de manganeso en el cerebro no se entiende completamente, como se señaló anteriormente, el exceso de derivado PLED que no contiene manganeso tal como DPDP administrado en combinación con el derivado PLED que contiene manganeso tal como MnDPDP reduce significativamente la absorción de manganeso en el cerebro. Los quelatos de manganeso de bajo peso molecular, como los derivados de MnPLED, y sus equivalentes de Zn se excretarán fácilmente por el riñón, regidos por la tasa de filtración glomerular (GFR), mientras que el manganeso no unido a un quelante de bajo peso molecular se conservará durante bastante tiempo en el cuerpo y se excretará lentamente y principalmente por vía biliar (Toft *et al.*, 1997). Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la combinación según la invención mantiene la forma quelante MnPLED, por lo que mayores cantidades de quelatos están disponibles para la excreción y la cantidad de Mn libre para la absorción en el cerebro se reduce.

En una realización de los métodos según la invención, la excreción de Mn, es decir, en la orina, se incrementa en al menos aproximadamente el 100% (véase el siguiente ejemplo 1), combinando la administración de un complejo de manganeso de un compuesto de dipiridoxilo, es decir, el primer componente, con la administración de un compuesto

de dipiridoxilo sin manganeso, es decir, el segundo componente. El ejemplo 1 demuestra que la excreción de manganeso en la orina aumenta de 1,41 $\mu\text{mol/kg}$ a 2,73 $\mu\text{mol/kg}$, es decir, aproximadamente 100%. Sin embargo, a dosis más bajas y quizás más relevantes terapéuticamente de MnDPDP (el estudio clínico sueco de viabilidad recientemente completado en pacientes con cáncer empleó 2 $\mu\text{mol/kg}$), a partir del ejemplo 4, cabe esperar que el aumento relativo sea considerablemente mayor. En algunas realizaciones, la excreción de Mn se incrementa en al menos aproximadamente 200% o en al menos 300%, todo sobre una base molar, combinando la administración de un complejo de manganeso de un compuesto de dipiridoxilo, es decir, el primer componente, con la administración de un compuesto de dipiridoxilo sin manganeso, es decir, el segundo componente. En otras realizaciones, la excreción de Mn se incrementa en al menos aproximadamente 400%, o en al menos aproximadamente 500%, todo sobre una base molar, combinando la administración de un complejo de manganeso de un compuesto de dipiridoxilo, es decir, el primer componente, con la administración de un compuesto de dipiridoxilo sin manganeso, es decir, el segundo componente. Por lo tanto, en una realización específica, la presente invención resuelve el problema neurotoxicológico de MnDPDP, o sus equivalentes desfosforilados, durante el uso más frecuente añadiendo un exceso de DPDP, o sus equivalentes desfosforilados, a la formulación.

Una ventaja adicional se obtiene a medida que la forma quelante terapéutica se mantiene a un nivel aumentado, de modo que se puede administrar una dosis menor del quelato en la combinación para obtener el mismo efecto terapéutico que una dosis mayor de quelato administrado solo, es decir, en ausencia del compuesto que no contiene manganeso.

Cuando se emplea una dosis clínica de derivado de MnPLED tal como MnDPDP (es decir, 5-10 $\mu\text{mol/kg}$ p.c., administración intravenosa) como agente de contraste de MRI en una persona, más del 80% del manganeso unido a DPDP es desplazado por el cinc (Toft *et al.*, 1997). A medida que se administran dosis más pequeñas de MnDPDP, el porcentaje de manganeso que se disocia será incluso mayor, como se expondrá a continuación. MnDPDP se comporta en esa perspectiva de una manera similar en ratas y perros (Hustvedt *et al.*, *Acta Radiol.* 1997; 38:690-699); sin embargo, casi la totalidad del manganeso en MnDPDP es desplazado por el cinc cuando el compuesto se administra a cerdos y, por lo tanto, no tiene efectos citoprotectores en los cerdos (Karlsson *et al.*, 2001). El desplazamiento de manganeso es un requisito previo y por lo tanto deseable para su empleo como agente de contraste de MRI, como se expuso anteriormente. Sin embargo, el derivado de MnPLED del complejo de manganeso intacto, por ejemplo MnDPDP y sus equivalentes desfosforilados, es necesario para obtener el efecto terapéutico, por ejemplo, contra diversas formas de estrés oxidativo (Brurok *et al.*, 1999; Karlsson *et al.*, 2001). Por ejemplo, mientras que la administración *in vivo* de MnDPDP protege contra diversos factores de estrés oxidativo, p. ej., isquemia-reperfusión, fármacos citotóxicos/ citostáticos y la intoxicación por acetaminofeno, no protege el corazón de cerdo contra el infarto de miocardio inducido por isquemia-reperfusión (Karlsson *et al.* 2001), de lo cual se puede concluir que los efectos citoprotectores *in vivo* de MnDPDP son una propiedad intrínseca del complejo de manganeso intacto.

La adición del compuesto complejo sin manganeso tal como DPDP para estabilizar un compuesto de manganeso tal como MnDPDP o sus equivalentes desfosforilados procedentes de la liberación de manganeso según la invención proporciona de este modo otra ventaja importante, concretamente una eficacia terapéutica incrementada. Por ejemplo, cuando se inyecta por vía intravenosa una dosis para diagnóstico por la imagen clínicamente relevante de MnDPDP (5-10 $\mu\text{mol/kg}$), se libera más del 80% del manganeso originalmente unido a DPDP, lo que contribuye a la eficacia del diagnóstico por la imagen. Por consiguiente, menos del 20% permanece unido a DPDP o sus equivalentes desfosforilados, lo que contribuye a la actividad terapéutica de MnDPDP. Cuando según la presente invención, como se ejemplifica en el ejemplo 1, se reduce la cantidad de manganeso que se libera del complejo, del 85% al 70% por adición de DPDP al MnDPDP administrado, aproximadamente el 30% de la dosis inyectada de MnDPDP contribuirá a la actividad terapéutica, duplicando de este modo la cantidad de quelato de Mn disponible para el efecto terapéutico. Cuando la liberación de manganeso se rige principalmente por el DPDP agregado, esto significa que la dosis de MnDPDP en presencia del DPDP agregado se puede reducir en un 50% para un efecto terapéutico potencialmente equipotente. Sin embargo, como se expone más adelante, a dosis más bajas y, en determinadas realizaciones, dosis relevantes más terapéuticas de MnDPDP, los efectos del DPDP añadido pueden acentuarse aún más. Esto a su vez significa que la adición de DPDP a MnDPDP tendrá un profundo efecto sobre el potencial toxicológico de MnDPDP.

El cinc está presente en todos los tejidos y fluidos del cuerpo. El contenido de cinc corporal total en personas se ha estimado en 2-3 g (Folin *et al.*, *BioMetals* 1994; 7:75-79). El cinc en el plasma representa aproximadamente el 0,1% del contenido total de cinc del cuerpo, y es principalmente esta pequeña fracción de cinc la que compite con el manganeso por la unión a DPDP o sus equivalentes desfosforilados, DPMP y PLED, después de la administración. El cuerpo humano tiene una capacidad muy alta para mantener la homeostasis del cinc mediante ajustes sinérgicos en la absorción y excreción gastrointestinal (King *et al.*, *J. Nutr.* 2000; 130:1360S-1366S). Por lo tanto, puede haber un riesgo nulo o muy bajo de que la inyección repetida de dosis clínicamente relevantes de MnDPDP, que contienen exceso de DPDP, induzca la insuficiencia de cinc. En caso de que exista alguna tendencia a la insuficiencia de cinc, dicho problema puede resolverse fácilmente mediante el suplemento alimentario de cinc entre las administraciones de MnDPDP.

A partir del trabajo preclínico (Southon *et al.*, 1997) y del trabajo clínico (Skjold *et al.*, 2004), es razonable suponer que el cuerpo contiene de 10 a 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal (p.c.) de cinc que es fácilmente intercambiable por manganeso en un derivado de MnPLED tal como MnDPDP. Esto se corresponde sustancialmente con el contenido

de cinc del plasma (véase anteriormente). Los derivados de PLED tales como DPDP contienen un punto de unión para manganeso/cinc por molécula. Por lo tanto, en vista de la afinidad 1.000 veces mayor para el cinc al quelante, en una realización de la invención, la adición del compuesto que no contiene manganeso tal como DPDP en una dosis de 1 a 100 $\mu\text{mol/kg}$ p.c. a una formulación con derivado de MnPLED tal como una formulación de MnDPDP protegerá de la liberación de manganeso después de la administración a un paciente.

El trabajo preclínico demuestra que las dosis administradas por vía intravenosa en un intervalo de 1 a 30 mol/kg p.c. de MnDPDP reducen la miocardiopatía inducida por doxorubicina en ratones y el infarto de miocardio en cerdos (véanse los documentos EP 0910360, US 6147094, EP 0936915, US 6258828, Karlsson *et al.*, 2001; Towart *et al.*, 1998). Otros derivados de MnPLED presentan eficacia en diferentes niveles de dosis, y dosis de 10 a 100 veces más bajas que el intervalo de dosis antes mencionado están dentro del alcance de las composiciones farmacéuticas de la presente invención (documentos EP 0910360, US 6147094). Teniendo en cuenta las diferencias entre especies, diferencias en la eficacia entre diversos derivados de MnPLED, diferencias en la superficie del cuerpo y diversas rutas de administración, una dosis adecuada para el primer componente según una realización específica de la invención, cuando se administra a un paciente estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 10 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, y una dosis adecuada para el segundo componente en una cantidad equimolar o mayor relativa al primer componente está comprendida en el intervalo de aproximadamente 1 a 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal. Todavía en una realización específica adicional, el primer componente se administra en una cantidad de aproximadamente 1 a 2 $\mu\text{mol/kg}$ p.c.

La composición farmacéutica puede ser una formulación lista para usar que contiene tanto el primer componente, es decir, el derivado de Mn-PLED como el segundo componente, es decir, el derivado de PLED, o la composición farmacéutica puede comprender el primer componente y el segundo componente en paquetes separados pero asociados para la administración en combinación. A este respecto, el primer componente y el segundo componente pueden administrarse en combinación o por separado, simultáneamente o sucesivamente.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir uno o más vehículos y/o excipientes fisiológicamente aceptables, de una manera bien conocida por los expertos en la técnica. En una realización, los compuestos de fórmula I pueden, por ejemplo, ponerse en suspensión o disolverse en un medio acuoso, opcionalmente con la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier excipiente de formulación farmacéutica o veterinaria convencional, incluidos, pero no limitados a, estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de osmolalidad, tampones, agentes de ajuste de pH, aglutinantes, cargas y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma adecuada para administración, incluidas, pero no limitadas a administración parenteral o enteral. En una realización específica, la composición está en una forma adecuada, por ejemplo, inyección o infusión. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en una forma de administración farmacéutica convencional tal como un comprimido, cápsula, polvo, solución, suspensión, dispersión, jarabe, supositorio o similar.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, por vía oral, transdérmica, rectal, intratecal, tópica o mediante inhalación o inyección, en particular inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravascular. También se pueden usar otras vías de administración, incluida la intratimpánica, y se prefieren las vías que aumentan la eficacia, la biodisponibilidad o la tolerancia de los productos. La vía más apropiada puede ser elegida por los expertos en la técnica según la formulación concreta que se utilice.

Como se indica, las composiciones pueden utilizarse para el tratamiento terapéutico de un estado patológico en un paciente, y particularmente en cualquier método en el que el complejo de Mn es conocido para su uso. En una realización específica, las composiciones pueden utilizarse para tratamiento terapéutico de un estado patológico en un paciente humano u otro mamífero. Según la invención, la composición se utiliza para el tratamiento de un estado patológico producido por la presencia de radicales libres procedentes del oxígeno, es decir, estrés oxidativo. En una realización, las composiciones farmacéuticas se emplean en tratamiento farmacológico citotóxico o citostático, en donde el derivado de MnPLED se utiliza para proporcionar protección contra los efectos secundarios desventajosos de los fármacos citotóxicos/citostáticos, por ejemplo, en pacientes con cáncer. En una realización más específica, el fármaco citotóxico o citostático comprende al menos uno de doxorubicina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo o paclitaxel. Las composiciones según la invención también pueden utilizarse para, pero no limitarse a, tratamiento de insuficiencia hepática inducida por acetaminofeno, cardiopatía isquémica, incluida la lesión inducida por isquemia-reperusión o lesión inducida por isquemia-reperusión miocárdica, ambas en una fase aguda así como también un entorno opcional, una afección relacionada con un tratamiento trombolítico, una derivación cardiopulmonar o angioplastia transluminal percutánea, o es el resultado de una intervención quirúrgica de trasplante cardíaco o de órganos, sobrecarga de hierro, por ejemplo, talasemia, anemia drepanocítica o hemosiderosis transfusional, cirrosis hepática inducida por hepatitis, lesión inducida por radiación, por ejemplo, como resultado de radioterapia, varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple.

Diversas realizaciones de los aspectos de las composiciones farmacéuticas de la invención se demuestran mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Este ejemplo mide la excreción urinaria de Mn en animales que reciben MnDPDP solo y en animales que reciben MnDPDP y DPDP.

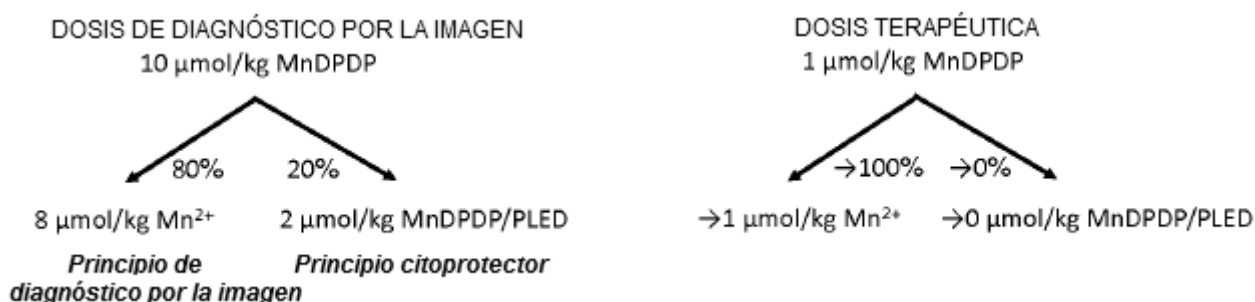
Método

5 A 14 ratas Wistar macho (aproximadamente 250 g) se las inyectó por vía intravenosa, por una de las venas de la cola, 0,25 ml de una formulación de MnDPDP 10 mM (Teslascan™, mangafodipir, GE Healthcare). Siete de estas ratas recibieron solo el MnDPDP (MnDPDP), mientras que otras 7 ratas recibieron, además de MnDPDP, 0,5 ml de una formulación de DPDP 10 mM (MnDPDP +DPDP). Después de la inyección, las ratas se colocaron inmediatamente en jaulas metabólicas para la recogida de orina durante un período de 0-24 horas. Para obtener el contenido basal de manganeso (Mn) en la orina, se colocaron dos ratas más (de referencia) en jaulas metabólicas para la recogida de orina durante el mismo período de tiempo. Las muestras de orina se almacenaron a -80°C hasta el análisis Mn. Antes del análisis, las muestras se descongelaron y se agitaron intensamente para obtener muestras homogéneas. Se tomó una alícuota de 5 ml de cada muestra y se añadieron 5 ml de ácido nítrico concentrado. Las muestras se resolvieron a continuación en un horno de microondas y después se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. El contenido de Mn de cada muestra se analizó por ICP-MS (espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo). Se retiró una muestra idéntica de MnDPDP a la inyectada en las ratas (es decir, 0,5 ml) y se inyectó en un tubo de ensayo. Esta muestra se trató de manera idéntica a la de las muestras de orina y se analizó su contenido de Mn. Los resultados se presentan como contenido total de Mn en orina de 0-24 h (expresado como $\mu\text{mol/kg} \pm \text{S.E.M.}$) y como porcentaje ($\pm \text{S.E.M.}$) de la dosis inyectada. La diferencia estadística entre los animales que reciben MnDPDP solo y los animales que reciben MnDPDP y DPDP, con respecto a la excreción de manganeso en la orina, se determinó mediante una prueba t de Student para datos independientes. Un valor p menor de 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

Los resultados se muestran en las Figs. 1A y 1B. La muestra de MnDPDP de 0,25 ml, equivalente a la dosis inyectada de MnDPDP, contenía 2,24 μmol de Mn, que corresponde a una dosis de 8,96 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal en una rata de 250 g La orina de 0-24 h de las 2 ratas de referencia contenía 0,49e5 y 0,357 μmol (Mn)/kg p. c., respectivamente (media = 0,426 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal). La orina de 0-24 h menos el nivel basal (0,426 $\mu\text{mol/kg}$ p. c.) de ratas inyectadas con MnDPDP solo contenía $1.41 \pm 0,10 \mu\text{mol/kg}$ p. ej. c., mientras que la orina de ratas inyectadas con MnDPDP más DPDP contenía una cantidad significativamente mayor de Mn, $2,73 \pm 0,18 \mu\text{mol/kg}$ p. c. (fig. 1A). Estos valores corresponden a $15,7 \pm 1,1\%$ y $30,5 \pm 2,0\%$ de excreción en la orina durante 0-24 h (fig. 1B). Por lo tanto, la adición de DPDP duplicó la excreción de Mn en la orina. El porcentaje de Mn excretado en la orina durante 0-24 h después de la inyección intravenosa de MnDPDP solo se corresponde muy bien con las cifras publicadas previamente en ratas (Hustvedt *et al.*, *Acta Radiol.* 1997; 38:690-699) y personas (Toft *et al.* 1997). Los presentes resultados demuestran que la adición de DPDP estabiliza MnDPDP en la liberación de Mn en condiciones *in vivo*. Esto proporciona varias ventajas significativas en el sentido de que la cantidad de Mn libre disponible para la absorción por el cerebro se reduce y el índice terapéutico de MnDPDP aumenta a medida que está disponible más del MnDPDP terapéutico *in vivo*. Por lo tanto, las composiciones y métodos de la invención hacen que el tratamiento derivado de MnPLED sea considerablemente menos tóxico y más eficaz.

El ejemplo 1 demuestra que la excreción de Mn aumenta desde aproximadamente el 15% (de la dosis dada de 10 $\mu\text{mol/kg}$ p.c. de MnDPDP) hasta aproximadamente el 30% por la adición de DPDP, que corresponde a aproximadamente un aumento del 100%. A una dosis menor de MnDPDP, por ejemplo, 2 $\mu\text{mol/kg}$ p. c., cabe esperar que el aumento relativo sea mucho mayor porque cabe esperar que un mayor porcentaje del Mn se desplace en ausencia de DPDP. Es decir, en una dosis de administración intravenosa de 10 $\mu\text{mol/kg}$ p. c., aproximadamente el 80% del manganeso unido a DPDP es desplazado por el cinc (Toft *et al.*, 1997). A medida que se administran dosis más pequeñas de MnDPDP, como 1-2 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, el porcentaje de manganeso que se disocia es aún mayor ya que el cinc del plasma está presente a una concentración relativa suficientemente alta para "desplazar" casi todo el Mn unido a DPDP a una dosis tan baja. Esta disociación se ilustra de la siguiente manera:



50 Por lo tanto, cabe esperar que el aumento relativo en la excreción de Mn obtenido por adición de DPDP sea mucho mayor que el 100%. Tal efecto potenciador de exceso de DPDP a dosis más bajas de MnDPDP es de hecho significativo y sorprendente. Este beneficio se realiza igualmente mediante la combinación de otros derivados de MnPLED y de PLED.

Ejemplo 2

Este ejemplo mide el contenido de Mn en animales que reciben MnDPDP solo y en animales que reciben MnDPDP y DPDP.

Método

5 Se inyectó a ocho ratas Wistar macho (aproximadamente 250 g) por vía intravenosa, por una de las venas de la cola, 0,25 ml de una formulación de MnDPDP 10 mM (Teslascann™). Cuatro de estas ratas recibieron solo MnDPDP (MnDPDP), mientras que otras 4 ratas recibieron, además de MnDPDP, 0,5 ml de una formulación de DPDP 10 nM (MnDPDP + DPDP). Para obtener el contenido basal de manganeso (Mn) en el cerebro de rata, se administró a dos ratas más (referencia) en paralelo. Se sacrificaron las ratas 24 horas después y los cerebros se diseccionaron y se almacenaron a -80°C hasta el análisis de Mn. Antes del análisis, cada cerebro se redisolvió en 5 ml de ácido nítrico concentrado más 3 ml de agua destilada en un horno de microondas, y después se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. El contenido de Mn de cada muestra se analizó por ICP-MS. Los resultados se expresan en µg/g de peso húmedo del cerebro y aumento porcentual en el contenido de Mn en el cerebro.

15 Resultados

Los resultados se indican en la figura 2. El contenido de Mn en el cerebro en las 2 ratas de referencia fue de 0,40 y 0,39 µg/g. de peso húmedo en el cerebro, respectivamente. El contenido de Mn en el cerebro de ratas que han recibido MnDPDP no enriquecido aumentó el 25,0%, mientras que el contenido de Mn en cerebro aumentó el 16,9% en ratas que habían recibido MnDPDP enriquecido con DPDP (fig. 2). La reducción en la absorción de Mn en el cerebro proporcionada por la presente invención es significativa y sorprendente.

Ejemplo 3

Este ejemplo mide el contenido de Mn y Zn en el cerebro en animales que reciben MnDPDP solo y en animales que reciben MnDPDP y DPDP.

Método

25 Se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a 10 ratas Wistar machos (aproximadamente 250 g) 0,25 ml de una formulación MnDPDP 10 mM (Teslascan™). Cinco de estas ratas recibieron solo MnDPDP (MnDPDP), mientras que otras 5 ratas recibieron, además de MnDPDP, 0,5 ml de una formulación de DPDP 10 mM (MnDPDP + DPDP). Para obtener el contenido basal de manganeso (Mn) en el cerebro de rata, se administró a dos ratas más (referencia) en paralelo en los experimentos descritos en el ejemplo 2. Se sacrificaron las ratas 24 horas después y los cerebros se diseccionaron y almacenaron a -80°C hasta el análisis Mn. En 3 de las ratas que recibieron MnDPDP solo y en 3 ratas que recibieron MnDPDP más DPDP, se analizó también el contenido de Zn en el cerebro. Antes del análisis, cada cerebro se redisolvió en 5 ml de ácido nítrico concentrado más 3 ml de agua destilada en un horno de microondas, y después se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. El contenido de Mn y Zn de cada muestra se analizó por ICP-MS. Los resultados se expresan en µg/g de peso húmedo de cerebro ± S.E.M. y aumento porcentual en el contenido de Mn en el cerebro. La diferencia estadística entre los animales que recibieron MnDPDP solo y los animales que recibieron MnDPDP más DPDP, con respecto al aumento en el contenido de Mn en el cerebro, se determinó mediante una prueba de la t de Student para datos independientes. Un valor p menor de 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

40 Los resultados se exponen en las Figs. 3A-3C. El contenido de Mn en el cerebro en las 2 ratas de referencia fue 0,40 y 0,39 µg/g p.p., respectivamente (del Ejemplo 2). El contenido de Mn en el cerebro de ratas que habían recibido MnDPDP aumentó solamente en $0,094 \pm 0,024$ µg/g p.p., mientras que el contenido aumentó en solo $0,022 \pm 0,01$ µg/g p.p. en ratas que habían recibido MnDPDP enriquecido con DPDP (fig. 3A), correspondiente a aumentos de 23,5 y 5,5%, respectivamente (fig. 3B). El contenido de Zn en el cerebro en ratas que reciben MnDPDP solo y en ratas que reciben MnDPDP + DPDP fue idéntico (fig. 3C). Los resultados actuales demuestran que la adición de un exceso de DPDP reduce la absorción de Mn en el cerebro en más del 75%.

Ejemplo 4

Este ejemplo mide la excreción en orina de Mn y Zn en animales que reciben dosis crecientes de DPDP y en animales que reciben MnDPDP solo o en combinación con DPDP.

50 Método

Se inyectó por vía intravenosa a 10 ratas Wistar machos (aproximadamente 250 g por una de las venas de la cola, con 0, 0,125, 0,250, 0,500 o 0,750 ml de una formulación DPDP 10 mM. correspondientes a 0, 5, 10, 20 y 30 µmol/kg p. c. Otras cuatro ratas recibieron por vía intravenosa 0,250 ml de MnDPDP (10 mM), correspondientes a 10 µmol/kg, solo o en combinación con 0,500 ml de DPDP (10 mM), correspondientes a 20 µmol/kg p. c.. Después de la inyección, las ratas se colocaron inmediatamente en jaulas metabólicas para la recogida de orina durante un período de 0-24 horas. Las muestras de orina se almacenaron a -80°C hasta los analizaron de Zn y Mn. Antes del análisis, las muestras se descongelaron y se agitaron intensamente para obtener muestras homogéneas. Se tomó una

alícuota de 5 ml de cada muestra y se añadieron 5 ml de ácido nítrico concentrado. Las muestras se redisolvieron luego en un horno de microondas y después se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. El contenido de cinc (Zn) y manganeso Mn de cada muestra se analizaron por ICP-MS. Los resultados se presentan como un contenido total en orina de 0-24 h de Zn y Mn (expresado en $\mu\text{mol/kg p. c.} \pm \text{S.E.M.}$).

5 Resultados

Los resultados se exponen en las figs. 4A y 4B. La excreción basal en 24 h de Zn en dos ratas que recibieron 0 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ se encontró que era 0,852 y 0,771 $\mu\text{mol/kg p. c.}$, respectivamente. La excreción de Zn en 0-24 h más o menos saturada fue de alrededor de 4 $\mu\text{mol/kg}$ de Zn a una dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ DPDP (fig. 4A). El aumento de las dosis de DPDP tuvo solo efectos menores sobre la excreción de Mn (fig. 4A). La excreción de Zn aumentó considerablemente en las 2 ratas que recibieron MnDPDP más DPDP en comparación con las 2 ratas que recibieron MnDPDP solo. Tomando en consideración la afinidad aproximadamente 1.000 veces mayor de Zn por DPDP, en comparación con Mn, y estudios tanto en ratas (Hustvedt *et al.*, *Acta Radiol.* 1997) como en personas (Toft *et al.*, 1997), la cantidad de DPDP necesaria para saturar la excreción de Zn es sorprendentemente baja. Además, el efecto relativamente pequeño de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de MnDPDP solo en la excreción de Zn también es un resultado sorprendente. Sin embargo, como es evidente a partir de las figs. 4A y 4B, DPDP solo o en combinación con MnDPDP es capaz de aumentar la excreción de Zn considerablemente, es decir, la adición de DPDP, que corresponde a aproximadamente 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$, a MnDPDP lo estabiliza de liberar Mn en condiciones *in vivo*.

El hecho de que solo el 20% o menos de manganeso procedente del quelante sale en la orina después de la administración intravenosa de MnDPDP, a una concentración de dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$, es bien conocido tanto en estudios en personas (Toft *et al.*, 1997) como en ratas (Hustvedt *et al.*, 1997). También se sabe que el quelante, principalmente después de ser desfosforilado a PLED, se elimina rápida y esencialmente en su totalidad del cuerpo a través de la excreción renal (mostrado por DPDP marcado con ^{14}C en ratas y perros; Hustvedt *et al.*, 1997), con una eliminación plasmática cercana a GFR. Además, se supone que es principalmente el cinc del plasma el que rige el llamado proceso de transmetalación (Toft *et al.*, 1997), en este caso, el intercambio de manganeso por cinc. En el mejor de los casos, cabría esperar por consiguiente que cerca del 80% de una dosis dada de MnDPDP (aproximadamente 8 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ referido a una concentración de dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) saldría en la orina en forma de un metabolito de cinc, principalmente como ZnPLED. Sin embargo, como se muestra en el ejemplo 4, la cantidad de cinc en la orina hasta 24 horas después de la administración de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de MnDPDP corresponde a solo aproximadamente 2 $\mu\text{mol/kg p. c.}$, es decir, mucho menos del 80% sale en la orina como metabolitos de cinc. Un recálculo aproximado de los datos farmacocinéticos humanos presentados por Toft y colaboradores (fig. 8 en Toft *et al.*, 1997) indica una cifra algo mayor pero igualmente baja (aproximadamente 3 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) para la excreción renal de cinc en personas después de la administración de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$, es decir, aproximadamente la mitad del quelante que se origina a partir de la sustancia madre MnDPDP tiene que ser excretada por la excreción renal en una forma distinta de cinc pero desconocida. Toft *et al.* no exponen la forma "ausente", pero el hecho de que relativamente menos cinc y relativamente más manganeso se excreta a través del riñón cuando la dosis aumenta de 5 a 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ se explica por la disponibilidad limitada de cinc libre o unido ligeramente en el plasma. Debe destacarse que la transmetalación en condiciones *in vivo* puede ser un proceso complejo en el que pueden estar implicados varios equilibrios entre el cinc y el manganeso con quelantes de bajo y alto peso molecular (Toft *et al.*, 1997). Sin embargo, teniendo en cuenta que el cinc tiene una afinidad más de 1000 veces mayor por DPDP o su metabolito PLED y el hecho de que la mayor parte del manganeso (más del 80% a una dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de MnDPDP) se disocia del quelante, los presentes resultados en el ejemplo 4 como se muestra en la fig. 4B que la administración de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de DPDP duplica la excreción de cinc, en comparación con la misma dosis de MnDPDP, es un resultado inesperado.

Los experimentos de ESR *in vitro* (Schmidt *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007; 7:241-248) pueden sugerir que la forma "ausente" es CaPLED y en menor medida MgPLED. Schmidt *et al.* también señalaron la constante de estabilidad entre DPDP y el calcio era alrededor de 10^9 , e indirectamente puede concluirse a partir de ese artículo que la constante de estabilidad correspondiente entre el magnesio y DPDP es algo menor. En caso de que la forma ausente sea CaPLED y MgPLED, podría considerarse agregar el exceso de DPDP a la composición, parcial o totalmente, en forma de Ca/MgDPDP. Dicha estrategia puede evitar posiblemente eliminación aguda de calcio y magnesio tras la administración rápida de altas dosis, que pueden aumentar, p. ej., la seguridad cardiovascular. Además, es difícil ver cómo el Ca/MgDPDP añadido tendría algún efecto negativo importante en la estabilidad de MnDPDP, en comparación con DPDP solo. Sin embargo, si CaPLED y MgPLED se excretan realmente a través del riñón una vez que la administración de MnDPDP continúa mostrándose. Otro candidato para la forma ausente podría ser una forma ligada al hierro, ya que el hierro tiene una afinidad muy alta tanto por DPDP como por PLED. Sin embargo, no se informó ningún efecto sobre la hemoglobina una vez se ha descrito la toxicidad a dosis repetidas en ratas, perros o monos (Larsen & Grant, *Acta Radiol.* 1997; 38:770-779), lo que indirectamente anula dicho candidato.

Ejemplo 5

Este ejemplo prueba la eficacia terapéutica de una combinación de MnDPDP y DPDP en combinación con un fármaco citotóxico (paclitaxel).

60 Método

Para probar la eficacia terapéutica, se realizaron experimentos iniciales en ratones hembra BALB/c (15-20 g), descritos por Alexandre *et al.*, JNCI 2006; 98:236-244). En resumen, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal vehículo solo (PBS, grupo 1); con paclitaxel solo (grupo 2), MnDPDP (Teslascan™) solo o en combinación con DPDP en exceso (grupos 3-5), de la forma siguiente:

- 5 1. PBS (Referencia)
2. Paclitaxel (20 mg/kg p. c.)
3. Paclitaxel (20 mg/kg p. c.) + MnDPDP (1 mg/kg p. c.)
4. Paclitaxel (20 mg/kg p. c.) + MnDPDP (1 mg/kg p. c.) + DPDP (10 mg/kg p. c.)
5. Paclitaxel (20 mg/kg p. c.) + MnDPDP (5 mg/kg p.c.)

10 Se trataron cinco ratones en cada grupo. Se administró Paclitaxel los días 0, 2 y 4.

Los días 0, 2, 4 y 7, se administró a los ratones MnDPDP ± DPDP. Diez días después de la primera inyección, los ratones se anestesiaron y se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca en tubos EDTA y se hizo el recuento de células sanguíneas (incluido el recuento de glóbulos blancos (WBC); recuento absoluto de neutrófilos (ANC), recuento de monocitos y linfocitos) se realizó en un analizador CELL-DYN Sapphire, una vez las muestras de
15 sangre se hubieran diluido 1:1. Algunas muestras tuvieron que descartarse debido a la coagulación, pero todos los grupos incluyeron al menos sangre de 3 animales.

Resultados

Los resultados se muestran en las figs. 5A-5D. Paclitaxel redujo los diversos glóbulos blancos en casi un 50% y 1 mg/kg p. c. de MnDPDP (correspondiente a aproximadamente 1,5 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) en combinación con 10 mg/kg p. c. de DPDP parece ser tan eficaz como 5 mg/kg p. c. de MnDPDP solo para restaurar los diversos glóbulos blancos (fig. 5A). Los presentes resultados demuestran que el excedente de DPDP (en este caso aproximadamente 15 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) hacen a MnDPDP sorprendentemente eficaz.

La mielosupresión, en especial la leucopenia, es un episodio adverso grave y limitante de la dosis común durante el tratamiento del cáncer con fármacos citostáticos/citotóxicos, incluido, entre otros, paclitaxel. Alexander *et al.* (2006) ha demostrado recientemente que 10 mg/kg p. c. de MnDPDP (Teslascan™) protege eficazmente a los ratones contra la leucopenia inducida por paclitaxel. Utilizando el mismo modelo de ratones mielosupresores que Alexander *et al.*, el ejemplo 5 demuestra que 1 mg/kg p. c. de MnDPDP (correspondiente a aproximadamente 1,5 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) en combinación con 10 mg/kg p. c. de DPDP (correspondiente a aproximadamente 15 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) es tan eficaz como 5 mg/kg p. c. de MnDPDP solo. Sobre todo, esta eficacia terapéutica mejorada de MnDPDP es aplicable para cada indicación cuando MnDPDP o su metabolito MnPLED puede mostrar eficacia, p. ej., otros tratamientos citostáticos/citotóxicos distintos de paclitaxel, radioterapia y lesión por isquemia-reperfusión del miocardio aguda, entre otros.

Tomados en conjunto, la presente invención muestra cómo una cantidad relativamente pequeña de DPDP añadido hace que MnDPDP sea terapéuticamente mucho más eficaz y menos neurotóxico. La cantidad de DPDP necesaria (correspondiente a una dosis de aproximadamente 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$) se correlaciona más con la dosis de diagnóstico por la imagen de 5 a 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de MnDPDP. La composición mejorada, con respecto a la eficacia terapéutica aumentada y la neurotoxicidad disminuida, se puede considerar, por lo tanto, como un complejo quelante metálico que contiene carencia del metal.

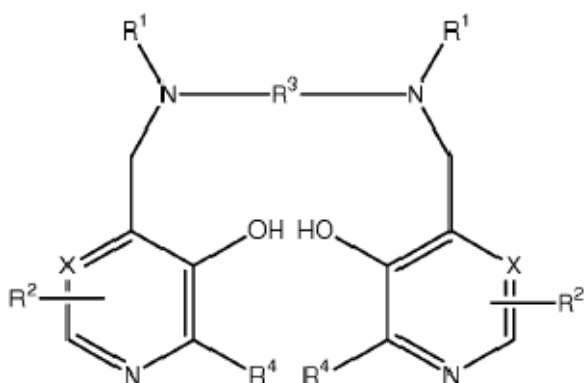
Del ejemplo 1 se puede concluir que la adición de DPDP duplica la estabilidad *in vivo* de MnDPDP/MnPLED a un nivel de dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$. Sin embargo, los presentes ejemplos y la exposición anterior en torno a la transmetalación dirigida por cinc de MnDPDP/MnPLED sugieren que la inestabilidad *in vivo* de MnDPDP se correlaciona recíprocamente con la dosis de MnDPDP, es decir, relativamente más manganeso se intercambiará por cinc a niveles de dosis más bajos. Por lo tanto, se concluye que un excedente añadido de DPDP hace a MnDPDP mucho más eficaz que lo que sugiere el ejemplo 1. Como se ha indicado en otra parte, MnDPDP probablemente tiene que metabolizarse en MnPLED antes de que pueda ejercer efectos citoprotectores. Los datos anteriores (p. ej., Karlsson *et al.*, 2001, EP 0910360, US 6147094) han demostrado que MnPLED es mucho más eficaz que MnDPDP, incluso después de que se haya tenido en cuenta la corrección metabólica, anticipando que aproximadamente 1/3 de MnDPDP se metaboliza en MnPLED, como sugieren Toft *et al.*, 1997. Esta anticipación se realiza a partir de datos farmacocinéticos a un nivel de dosis de 10 $\mu\text{mol/kg p. c.}$ de MnDPDP. Por otra parte, a un nivel de dosis menor, probablemente habrá suficiente cinc disponible para intercambiar manganeso más o menos por completo, lo que dará como resultado muy poco o nada de MnPLED. Esto a su vez puede explicar por qué el exceso agregado de DPDP aumenta la eficacia terapéutica de MnDPDP mucho más de lo que sugiere el ejemplo 1.

Los ejemplos y realizaciones específicas expuestos en la presente memoria son de naturaleza ilustrativa solamente y no se debe considerar que limitan el alcance de la invención definida por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la reducción de la absorción de manganeso en el cerebro de un paciente cuando un estado patológico en un paciente causado por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno se trata por administración de un complejo de manganeso de un compuesto de fórmula I, en una cantidad eficaz para tratar el estado patológico, comprendiendo la composición farmacéutica, como primer componente, el complejo de manganeso de un compuesto de fórmula I, en una cantidad eficaz para tratar el estado patológico, y como segundo componente, un compuesto de fórmula I o un complejo metálico sin manganeso de un compuesto de fórmula I, en una cantidad eficaz para reducir la absorción de manganeso en el cerebro del paciente en comparación con la administración del primer componente en ausencia del segundo componente, en donde el segundo componente está incluido en una cantidad de aproximadamente 1 a 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal de un paciente, en donde el primer componente y el segundo componente están incluidos en una relación molar de primer componente:segundo componente comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:10, y en donde el primer componente y/o el segundo componente están opcionalmente juntos con uno o más vehículos y/o excipientes fisiológicamente aceptables,

Fórmula I



- en donde
 X representa CH o N,
 cada R^1 representa independientemente hidrógeno o $-\text{CH}_2\text{COR}^5$;
 R^5 representa hidroxilo, etilenglicol, glicerol, alcoxi opcionalmente hidroxilado, amino o alquilamido;
 cada R^2 representa independientemente ZYR⁶ en donde Z representa un enlace, CO o un grupo alquileo C_{1-3} o un grupo oxoalquileo opcionalmente sustituido por R^7 ;
 Y representa un enlace, un átomo de oxígeno o NR^6 ;
 R^6 es un átomo de hidrógeno, COOR^8 , alquilo, alqueno, cicloalquilo, arilo o aralquilo, grupo opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de COOR^8 , CONR^8 , NR^8 , OR^8 , $=\text{NR}^8$, $=\text{O}$, $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)\text{R}^7$ y OSO_3M ; R^7 es hidroxilo, un grupo alquilo o aminoalquilo opcionalmente hidroxilado u opcionalmente alcoxilado;
 R^8 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente hidroxilado u opcionalmente alcoxilado;
 M es un átomo de hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable;
 R^3 representa un grupo alquileo C_{1-8} , un 1,2-cicloalquileo o un 1,2-arileno, opcionalmente sustituido con R^7 ; y cada R^4 representa independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} .
2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que R^5 es hidroxilo, alcoxi C_{1-8} , etilenglicol, glicerol, amino o alquilamido C_{1-8} ; Z es un enlace o un grupo seleccionado de CH_2 , $(\text{CH}_2)_2$, CO, CH_2CO , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ y CH_2COCH_2 ; Y es un enlace; R^6 es un grupo alquilo mono o poli (hidroxilo o alcoxilado) o de la fórmula $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)\text{R}^7$; y R^7 es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido.
3. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde R^3 es etileno y cada grupo R^1 representa $-\text{CH}_2\text{COR}^5$ en el que R^5 es hidroxilo.
4. Una composición farmacéutica de acuerdo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el primer componente tiene un valor de K_a comprendido en el intervalo de 10^8 a 10^{24} .
5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el segundo componente tiene un valor de K_a inferior para Mn^{2+} que el correspondiente valor de K_a para cinc (Zn^{2+}), por un factor de al menos 10.
6. Una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el primer componente y el segundo componente se incluyen en una relación molar de primer componente: segundo componente en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:5 o 1:2 a 3:4.

- 5 7. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el primer componente es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamin-N,N'-diacético de manganeso (MnDPDP) o una de sus sales y el segundo componente es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato) -etilendiamin-N,N'-diacético (DPDP), una sal o complejo no de manganeso del mismo.
8. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el segundo componente es DPDP, DPDP de calcio o DPDP de magnesio, o una combinación de dos o más de los mismos.
- 10 9. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho estado es una lesión por fármaco citotóxico o citostático, preferiblemente una lesión por fármaco para el tratamiento del cáncer, más preferiblemente al menos una de las lesiones por tratamiento con doxorrubicina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo o paclitaxel.
- 15 10. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho estado es una lesión inducida por isquemia-reperusión, preferiblemente una lesión inducida por isquemia-reperusión miocárdica.
- 20 11. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho estado está relacionado con un tratamiento trombolítico, una derivación cardiopulmonar o angioplastia transluminal percutánea, es el resultado de una intervención quirúrgica de trasplante cardíaco o de órganos o es una lesión inducida por radiación.
- 25 12. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho estado es una insuficiencia hepática aguda inducida por acetaminofeno, un estado patológico del hierro, preferiblemente talasemia, anemia drepanocítica, hemosiderosis transfusional o cirrosis hepática inducida por hepatitis.
13. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el primer componente y el segundo componente están en una formulación para administración simultánea.
- 30 14. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el primer componente y el segundo componente están en una formulación para administración secuencial.
- 35 15. Una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el primer componente y el segundo componente están incluidos en una relación molar primer componente:segundo componente de aproximadamente 1:5.

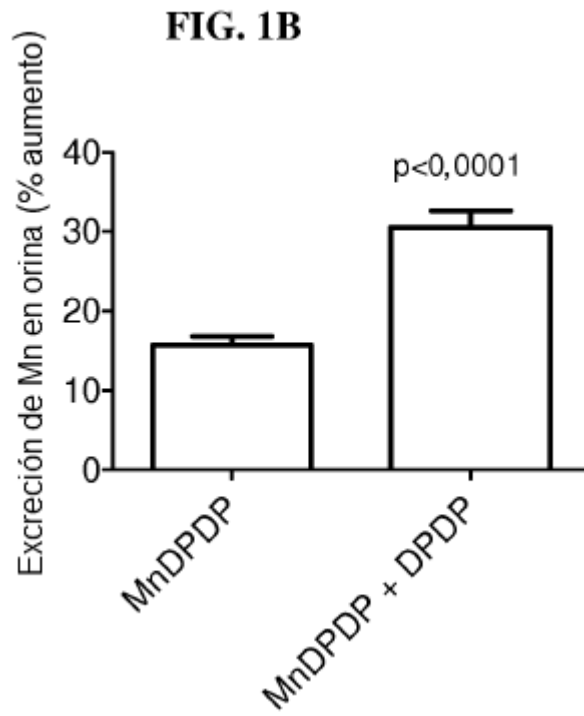
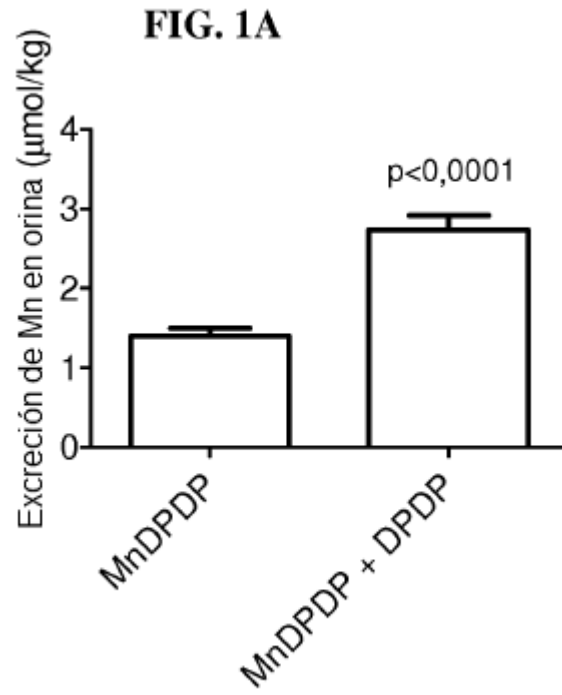


FIG. 2

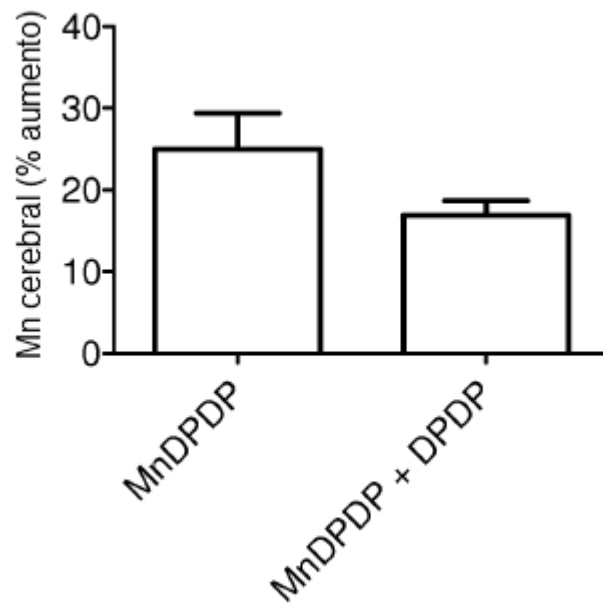


FIG. 3A

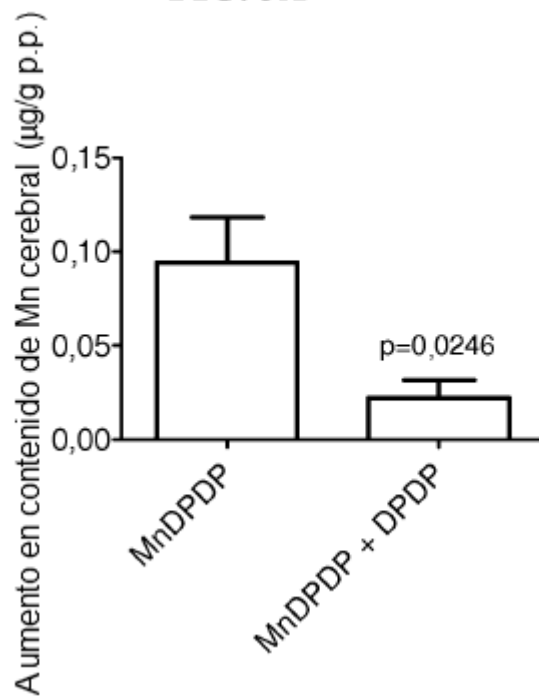


FIG. 3B

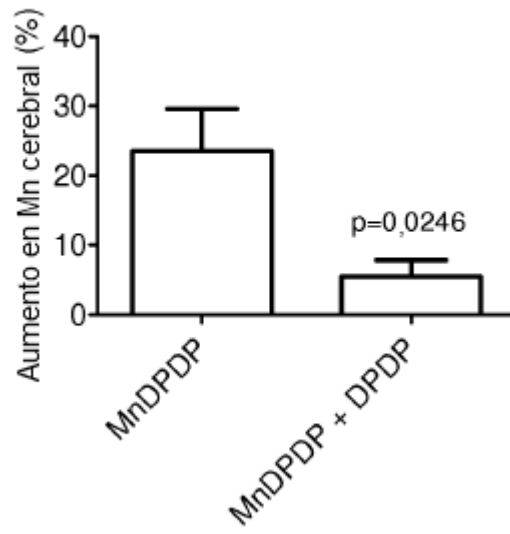


FIG. 3C

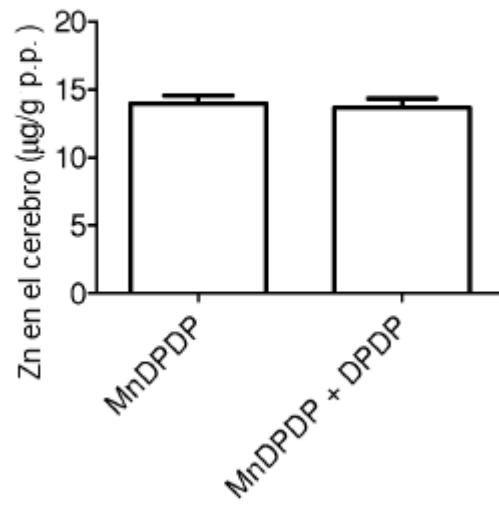


FIG. 4A

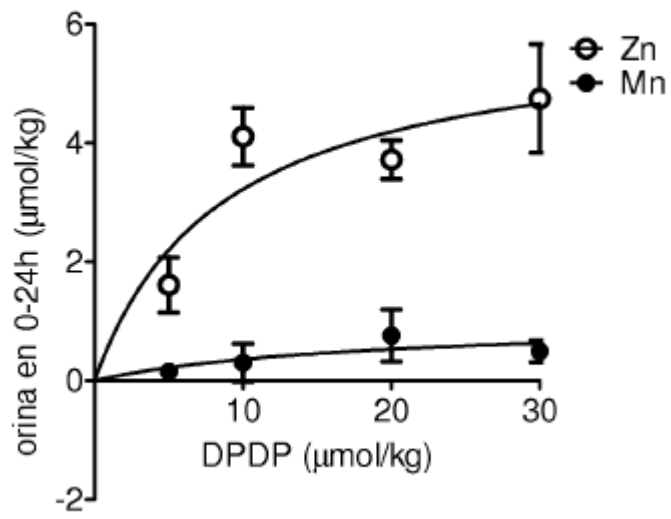


FIG. 4B

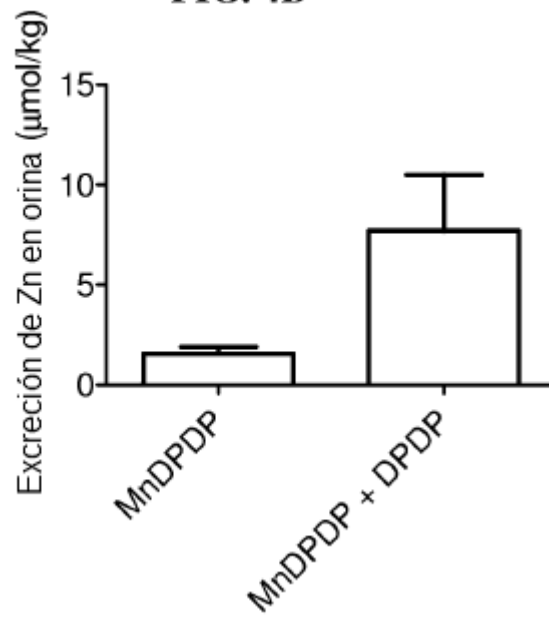


FIG. 5A

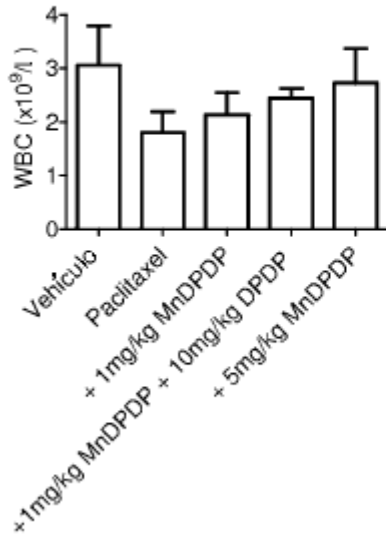


FIG. 5B

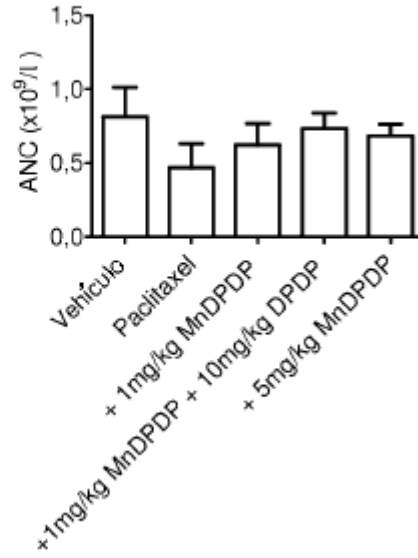


FIG. 5C

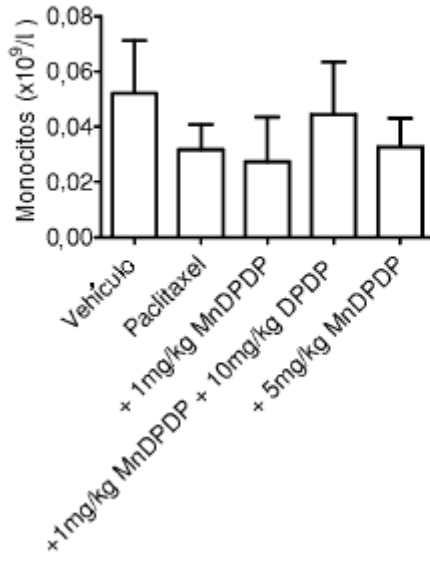


FIG. 5D

