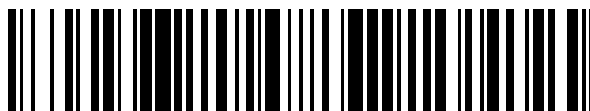


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 038**

51 Int. Cl.:

**C07F 19/00** (2006.01)

**A61K 33/32** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2012 PCT/IB2012/056959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13102806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2012 E 12815799 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2800755**

54 Título: **Calmangafodipir, una nueva entidad química, y otros complejos metálicos mixtos, métodos de preparación, composiciones y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

**05.01.2012 US 201261583377 P**

**06.06.2012 US 201261656178 P**

**06.07.2012 US 201261668679 P**

**02.11.2012 US 201261721575 P**

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

**24.09.2018**

73 Titular/es:

**PLEDPHARMA AB (100.0%)  
Grev Turegatan 11C 3rd Floor  
114 46 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON, JAN OLOF;  
REINEKE, KARL;  
KURZ, TINO;  
ANDERSSON, ROLF;  
HALL, MICHAEL;  
MCLAUGHLIN, CHRISTINA;  
JACOBSSON, SVEN y  
NÄSTRÖM, JACQUES**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 683 038 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

Calmangafodipir, una nueva entidad química, y otros complejos metálicos mixtos, métodos de preparación, composiciones y métodos de tratamiento

**Campo de la invención**

5 La presente invención está dirigida a un complejo metálico mixto de un compuesto de dipiridoxilo, por ejemplo, ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (DPDP o fodipir) u otros compuestos de Fórmula I (en adelante derivados de Piridoxil EtilDiamina o derivados de PLED), en donde los metales mezclados comprenden un metal de transición del Grupo III-XII y un metal del Grupo II. En realizaciones específicas, el complejo metálico mixto es un complejo de calcio y manganeso. La presente invención está dirigida también a composiciones que contienen dicho complejo metálico mixto, métodos para preparar dicho complejo metálico mixto, por ejemplo, en una cristalización de etapa única. Se describen métodos de tratamiento que emplean dicho complejo metálico mixto. Dichos métodos de tratamiento incluyen métodos que emplean de forma convencional complejos de manganeso-DPDP por el efecto terapéutico. En una realización específica, las composiciones pueden usarse en el tratamiento de procesos patológicos provocados por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno en el cuerpo, es decir, estrés oxidativo. Los complejos metálicos mixtos, y particularmente el complejo mixto de calcio-manganeso calmangafodipir descrito en esta memoria, constituyen nuevas entidades químicas.

**Antecedentes de la invención**

El estrés oxidativo empieza con la generación de especies de oxígeno reactivo (EOR) y especies de nitrógeno reactivo (ENR) como una parte de la función celular normal. Hay múltiples fuentes celulares de generación de EOR aunque las más significativas son los complejos I y III de transporte de electrones de la mitocondria, las enzimas P450 en el retículo endoplasmático, y NADPH oxidasa unida a la membrana. La producción de EOR por cada una de estas fuentes puede estimularse mediante citoquinas, inflamación, proteínas víricas y otros mecanismos, como fármacos para quimioterapia, isquemia-reperusión y sobrecarga de hierro y cobre. De forma importante, estos procesos generan inicialmente el radical libre superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) que se reduce secuencialmente para formar peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y en última instancia, agua. Bajo condiciones de alto estrés oxidativo y por consiguiente alta producción de superóxido, estos intermedios reactivos, sin embargo, interactúan fácilmente con otras moléculas para formar EOR nocivo secundario, tales como productos de peroxidación de lípidos y peroxinitrito (Singal et al., *Liver Int.* 2011; 31:1432-1448). Esto indica la importancia de mantener la cantidad celular de superóxido bajo un estrecho control. Bajo condiciones normales esto se consigue mediante las superóxido dismutasas (SODs). Aunque las SODs tienen la velocidad de reacción más rápida de las enzimas conocidas, bajo condiciones de alto estrés oxidativo, estas enzimas puede ser superadas e incluso inactivadas de forma irreversible por EOR y ENR. Esto a su vez, abre el uso terapéutico de fármacos de bajo peso molecular que mimetizan las enzimas SOD, es decir, los denominados miméticos de SOD, para combatir el estrés oxidativo patológico.

Se ha sabido desde hace mucho que los radicales libres derivados de oxígeno de vida corta pero altamente reactivos participan en el daño tisular patológico, especialmente durante el tratamiento con citotóxicos/citostáticos y radioterapia en pacientes de 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, Citrin et al, *Oncologist*, 2010; 15:360-371, Kurz et al., *Transl Oncol* 2012; 5:252-259), fallo hepático inducido por acetaminofeno (Bedda et al., *J Hepatol* 2003; 39:765-772; Karlsson, *J Hepatol* 2004; 40:872-873), en enfermedad cardíaca isquémica (Cuzzocrea et al., *Pharmacol Rev* 2001; 53:135-159) y en varias enfermedades neurodegenerativas, que incluyen enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, y esclerosis múltiple (Knight, *Ann Clin Lab Sci.* 1997; 27:11-25). La sobreproducción de radicales libres derivados de oxígeno también está implicada en procesos patológicos de sobrecarga de hierro (Rachmilewitz et al., *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1054:118-23), por ejemplo, en la talasemia, anemia de células falciformes 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 oído inducida por el ruido (Wong et al., *Hear Res* 2010; 260:81-88).

El uso de agentes quelantes basados en dipiridoxilo y sus quelatos metálicos y ciertos compuestos que contienen manganeso, en particular quelatos de manganeso, se conoce en medicina. Véanse los documentos EP 0910360, US 6147094, EP 0936915, US 6258828, EP 1054670, US 6310051, EP 1060174 y US 6391895, por ejemplo, que describen que ciertos agentes quelantes, en particular agentes quelantes de dipiridoxilo, y sus quelatos metálicos, son efectivos en el tratamiento o prevención de cardiotoxicidad inducida por antraciclina, toxicidad inducida por radiación, lesiones inducidas por isquemia-reperusión, y fallo hepático inducido por paracetamol (acetaminofeno), o desde un punto de vista más general, cada proceso patológico provocado por la presencia de radicales libres derivados del oxígeno, es decir, estrés oxidativo, en seres humanos y animales. Además, se ha encontrado que el compuesto de dipiridoxilo mangafodipir (MnDPDP) además y sorprendentemente posee efectos citotóxicos contra las células cancerígenas (documento EP 16944338). Sin embargo, como se describe en el documento WO 2009/078794 Aland en Kurz et al., 2012, esta es una propiedad inherente del fodipir (DPDP) solo o sus contrapartes desfosforiladas, DPMP y PLED, y no del complejo metálico MnDPDP o sus contrapartes desfosforiladas, MnDPMP y MnPLED.

Uno de los derivados de MnPLED, específicamente el manganeso ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (Manganeso DiPiridoxil DiFosfato; MnDPDP), también conocido como mangafodipir, está aprobado para usar como un agente de contraste de IRM diagnóstico en seres humanos. Eriksen, documento US 2009/0155184 A1, también describe el uso de complejos de manganeso para IRM, especialmente para la detección temprana de isquemia de miocardio. Se ejemplifica TeslascanTM, un producto comercial de MnDPDP, mientras que también se describen otros ligandos, que incluyen PLED, DT-PABMA, EDTABMA, TPP y HPTA, y sales de calcio de complejos de manganeso con varios de estos ligandos. De forma interesante, también se ha mostrado que mangafodipir protege a los ratones frente a serios efectos secundarios de varios fármacos citotóxicos/citostáticos (doxorubicina, oxaliplatina, 5-fluorouracilo y paclitaxel), sin interferir de forma negativa con los efectos anti-cancerígenos de estos fármacos (Towart et al., 1998, Laurent et al., 2005, Karlsson et al., 2006, Alexandre et al., 2006, Doroshov, 2006, Kurz et al., 2012). El mangafodipir se ha probado en un paciente de cáncer de colon que atravesaba un tratamiento paliativo con una combinación de folinato, 5-fluorouracilo y oxaliplatina (Yri et al., Acta Oncol. 2009; 48:633-635). Los datos preclínicos y los resultados de este único paciente fueron tan prometedores que ha comenzado el ensayo clínico en pacientes de cáncer. Cuando se llega al efecto secundario más problemático de la oxaliplatina, específicamente la neurotoxicidad sensorial inducida por oxaliplatina, no existen datos preclínicos, hasta donde se sabe, que muestren efectos protectores del mangafodipir (Karlsson et al, Transl Oncol. 2012; 5:32-38). Yri et al., 2009, describió que el paciente recibió 15 dosis completas de "Nordic FLOX". En 14 de los ciclos, el paciente recibió pretratamiento con mangafodipir. El paciente recibió una dosis acumulada de 1275 mg/m<sup>2</sup> de oxaliplatina, que es una dosis probable para dar síntomas neurotóxicos. No se detectaron síntomas neurotóxicos, excepto durante el quinto ciclo cuando el mangafodipir se abandonó deliberadamente y el paciente experimentó neuropatía sensorial periférica. Esto sugiere que el mangafodipir puede proteger frente a la neurotoxicidad periférica. Después de cinco ciclos, el estado de rendimiento para el paciente se mejoró drásticamente, y la demanda de analgésicos se redujo significativamente. La neutropenia no se dio durante ninguno de los ciclos de quimioterapia.

Un primer estudio de viabilidad (MANFOL I) se ha completado y se han presentado resultados positivos, que incluyen efectos mieloprotectores, a la Agencia Médica Sueca y se han publicado (Karlsson et al., 2012).

También se ha descrito que el mangafodipir protege a los ratones contra el fallo hepático agudo inducido por acetaminofeno en ratones (FHA) (Bedda et al., 2003; Karlsson, 2004). El FHA se caracteriza por la masiva muerte celular de hepatocitos, un proceso provocado por la disminución de glutatión, radicales libres derivados de oxígeno y el daño mitocondrial.

El mangafodipir es un pro-fármaco en el sentido de que probablemente tiene que metabolizarse en ácido N,N'-dipiridoxil-etilendiamina-N,N'-diacético (MnPLED) antes de que pueda ejercer los efectos citoprotectores durante las condiciones in vivo (por ejemplo, véase Karlsson et al., Acta Radiol 2001; 42:540-547; Kurz et al., 2012). El manganeso es un metal esencial además de potencialmente neurotóxico. Se ha sabido durante muchos años que bajo condiciones de exposición crónica a altos niveles de manganeso, un síndrome de disfunción extrapiramidal similar al síndrome de Parkinson, aunque clínicamente una diferente entidad de enfermedad, se da frecuentemente (véase Scheuhammer y Cherian, Arch Environm Contam Toxicol 1982; 11:515-520). Cuando una dosis de formación de imágenes de RM diagnóstica de mangafodipir se inyecta de forma intravenosa en seres humanos, aproximadamente el 80% del manganeso administrado se libera (Toft et al., Acta Radiol 1997; 38:677-689). La liberación de manganeso paramagnético es de hecho un prerrequisito para las propiedades de formación de imágenes de RM diagnóstica del mangafodipir (Wendland, NMR Biomed 2004; 17:581-594). Elizondo et al., 1991 (Radiology 1991; 178:73-78) afirmó que el resto fodipir se une al receptor de piridoxil 5' fosfato en los hepatocitos y asegura una alta concentración intracelular de mangafodipir en el hígado. Esta hipótesis se sugirió también recientemente en un artículo por Coriat et al., (PLoS One 2011; 6:1-6, e27005). Esta es una bonita hipótesis pero desafortunadamente una no probada y muy improbable, que pasó de moda poco después de que se hubiera presentado. Cuando el mangafodipir se inyecta de forma intravenosa (i.v.) aproximadamente el 80% del complejo metálico se desecha (Toft et al., Radiol 1997), y a cada dosis de Mn equimolar, el MnCl<sub>2</sub> tiene una eficacia de contraste de formación de imágenes de RM del hígado igual o mejor que el mangafodipir (Southon et al., Acta Radiol 1997). Además, después de la inyección de mangafodipir casi todo el fodipir se recupera en la orina (la parte principal de él como PLED), mientras que la mayoría de manganeso se recupera en las heces (Hustvedt et al., Acta Radiol 1997; 38:690-699). Por otro lado, los efectos terapéuticos del mangafodipir (MnDPDP) y sus contrapartes 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).

Los derivados de PLED imitan a la enzima mitocondrial manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) (Brurok et al., 1999). La MnSOD protege a la célula de los mamíferos del radical superóxido, un subproducto del metabolismo del oxígeno, que se produce en cantidades más o menos altas durante las condiciones aeróbicas normales; los mamíferos no sobreviven sin una MnSOD funcional. La MnSOD tiene el número de reemplazo 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 reemplazo cercanas a las de la MnSOD nativa (Cuzzocrea et al., 2001). De forma interesante, los tampones fisiológicos que contienen metales de transición como manganeso pueden tener números de reemplazo altos similares (Culotta et al., Biochim Biophys Acta. 2006; 1763:747-758). Sin embargo, la importancia de las enzimas SOD nativas es coherente con un proceso de selección que favorece a los organismos que elaboran un medio para localizar el catalizador de metal de transición para la

dismutación del superóxido a partes de la célula donde hay una alta necesidad de dicha dismutación, por ejemplo, mitocondria. Además, los resultados de la isquemia de miocardio-reperusión en cerdos anestesiados muestran de forma inevitable que el MnPLED intacto, aunque no el manganeso per se, protege frente al estrés oxidativo, visto como la reducción en el tamaño del infarto (Karlsson et al., 2001). La inactivación efectiva del superóxido es esencial en la prevención de 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 para la inactivación. Además, el superóxido estimula la producción de peroxinitrito que nitra la MnSOD endógena. Esta proteína se nitra mediante el peroxinitrito en Tyr-34 (Radi, Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:4003-4008). Una vez nitrada, la MnSOD pierde su actividad enzimática, un suceso que favorece la acumulación de superóxido y el daño conducido por el superóxido (Muscoli et al., Br J Pharmacol 2003; 140:445-460).

Recientes resultados indican que la inactivación de MnSOD por nitración es un suceso temprano en la toxicidad hepática inducida por paracetamol (Agarwal et al., J Pharmacol Exp Ther 2011; 337:110-116). Los viejos resultados, además, indican que la nitración y la inactivación de MnSOD están implicadas en el rechazo crónico de riñones trasplantados en seres humanos (MacMillan-Crow et al., Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:11853-11858. También puede ser relevante anotar que la actina, que puede constituir el 5% o más de la proteína celular, está fuertemente nitrada en la anemia de células falciformes y que la extensión de la nitración observada es suficiente para inducir la polimerización citoesquelética (Radi, 2004). Los niveles circulantes de 3-nitrotirosina pueden además servir como un biomarcador para evaluar los riesgos de aterosclerosis. Es más, además de la aterosclerosis, se cree que el peroxinitrito y la 3-nitrotirosina están implicadas en la isquemia de miocardio, pulmón séptico y distresado, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis lateral amiotrófica (Beckman et al., Am J Physiol 1996; 271:C1424-C1437) y diabetes (Fönstermann et al, Br J Pharmacol. 2011; 164:213-223).

Los mecanismos de defensa antioxidante dañados, que incluyen la actividad SOD reducida, y una producción aumentada posteriormente de peroxinitrito, pueden ser un factor importante en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Koruk et al., Ann Clin Lab Sci. 2004; 34:57-62). Una asociación epidemiológica y clínica principal entre las infecciones víricas de hepatitis B o hepatitis C y el desarrollo de hepatitis crónica y la aparición de carcinoma hepatocelular es evidente. De forma interesante, la nitración de tirosina inducida por peroxinitrito se aumenta notablemente en pacientes con hepatitis vírica crónica (García-Monzón et al., J Hepatol. 2000; 32:331-338). Actualmente, el mecanismo citado generalmente de desarrollo de patología en la enfermedad de Wilson implica el daño oxidativo debido a la sobrecarga de cobre. La generación de especies de oxígeno reactivo (EOR) además de la oxidación lipídica y el daño de ADN se han detectado en el hígado, particularmente en las etapas avanzadas de esta enfermedad (Burkhead et al., Biometals 2011; 24:455-466).

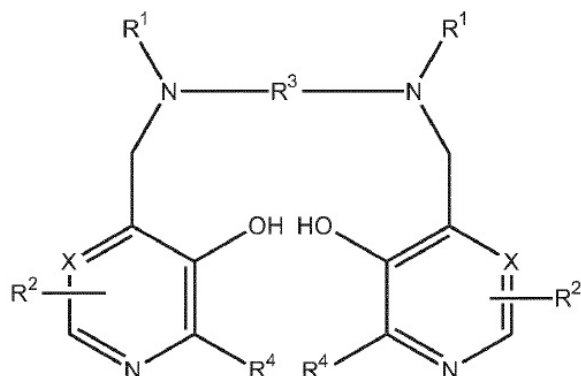
Los derivados de MnPLED no son objetivos para el peroxinitrito y la adición de derivados de MnPLED exógeno puede en dichas situaciones restablecer el potencial protector. Los derivados de PLED son además fuertes aglutinantes de hierro, como se describe en los documentos EP 1054670, US 6310051 y por Rocklage et al., (Inorg Chem 1989; 28:477-485), y algunos derivados de MnPLED pueden tener actividades catalasa y glutatión reductasa (Laurent et al., 2005), que pueden además aumentar su capacidad antioxidante.

Para el uso de formación de imágenes diagnósticas y otro uso esporádico, la disociación de manganeso a partir de mangafodipir no presenta un problema toxicológico principal. Debido a la absorción en el SNC, sin embargo, para el uso más frecuente, por ejemplo en métodos terapéuticos, la toxicidad del manganeso acumulado puede representar un problema neurotoxicológico serio (Crossgrove et al., NMR Biomed. 2004; 17:544-53). Por consiguiente, para el uso terapéutico más frecuente, los compuestos que disocian manganeso fácilmente deberían evitarse y hay una necesidad de desarrollar medios para obtener efectos terapéuticos deseables mientras se reducen los efectos secundarios indeseables asociados con dicho uso terapéutico. El documento WO 2011/004325 A1 de PledPharma AB demuestra que administrar fodipir (DPDP) con mangafodipir (MnDPDP) estabiliza al mangafodipir de la liberación de manganeso después de la administración y reduce así la absorción de manganeso al cerebro y disminuye el potencial neurotóxico de mangafodipir de forma considerable.

### Compendio de la invención

El asunto de la presente invención se define en las reivindicaciones 1-16 como están adjuntas. Las realizaciones descritas en esta memoria que no están cubiertas por las reivindicaciones sirven meramente para ilustrar el contexto técnico de la presente invención. Los complejos, composiciones y métodos de la presente invención proporcionan mejoras en la preparación y uso de los complejos metálicos de los derivados de PLED. En una realización, la invención se dirige a un complejo metálico mixto de un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, en donde los metales mezclados comprenden calcio y manganeso, en donde la relación molar de calcio a manganeso es 1-10:

Fórmula I



En donde

X representa CH o N,

Cada R<sup>1</sup> representa independientemente -CH<sub>2</sub>COR<sup>5</sup>;

5 R<sup>5</sup> representa hidroxilo;

Cada R<sup>2</sup> representa independientemente ZYR<sup>6</sup> en donde Z representa un enlace o un grupo seleccionado de CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, CO, CH<sub>2</sub>CO, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO y CH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>;

Y representa un enlace;

R<sup>6</sup> es un grupo alquilo mono- o poli(hidroxilo o alcoxilado) o de la fórmula OP(O)(OR<sup>8</sup>)R<sup>7</sup>;

10 R<sup>7</sup> es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido;

R<sup>8</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;

R<sup>3</sup> representa etileno; y

Cada R<sup>4</sup> representa independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>.

15 En otra realización, la invención está dirigida a un complejo de calcio y manganeso de un compuesto de Fórmula I. Los complejos metálicos mixtos, y particularmente el complejo de calcio-manganeso mixto calmangafodipir descrito en esta memoria, constituyen nuevas entidades químicas.

La presente invención está dirigida también a métodos de producción de un complejo metálico mixto que comprende una cristalización de una etapa a partir de una disolución de calcio, manganeso y un compuesto de Fórmula I.

20 En otra realización, la invención está dirigida a una composición farmacéutica para un tratamiento de un proceso patológico en un paciente.

Los complejos según la invención reducen los efectos tóxicos asociados con el uso de complejos de metales de transición de los Grupos III-XII anteriores, por ejemplo, derivados de MnPLED tales como mangafodipir. Los complejos de la invención pueden mostrar también el tratamiento de y/o protección mejorados frente a procesos patológicos, particularmente los provocados por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno, es decir, estrés oxidativo.

25 Las mejoras y ventajas adicionales de la presente invención serán más evidentes en vista de la Descripción Detallada presentada a continuación.

### Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada se entenderá más completamente en vista de los dibujos, en donde:

30 La Fig. 1 muestra patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) para tres formas cristalinas de un complejo de calcio y manganeso de fodipir (DPDP) que tienen una relación molar de Ca:Mn aproximado de aproximadamente 4:1, denominados en esta memoria como "calmangafodipir", obtenidos en un método de cristalización en una etapa según la invención, como se describe en el Ejemplo 1.

35 La Fig. 2 muestra patrones de XRPD de mezclas de calcio fodipir (calfodipir) y manganeso fodipir (mangafodipir), más que un complejo según la invención; estos patrones de XRPD indican que todos los productos eran amorfos y se mostró que absorben agua rápidamente, como se describe en el Ejemplo 2.

La Fig. 3 muestra el espectro de absorción infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) de calmangafodipir, lote núm. 7755-C-R0-01-30-01, con las bandas de absorción infrarrojas características (número de onda) y las correspondientes asignaciones descritas en el Ejemplo 3.

5 Las Figs. 4A y 4B muestran el espectro de masas (Fig. 4A) y el espectro de masas expandido (Fig. 4B) de calmangafodipir, lote núm. 7755-C-R0-01-30-01 (660-850 m/z), como se describe en el Ejemplo 3.

La Fig. 5 muestra la estructura química de calmangafodipir, como se describe en el Ejemplo 3.

10 La Fig. 6A muestra el aumento en el contenido de manganeso (Mn) en 0-24 h de orina, expresado como el contenido total de Mn menos el contenido basal de Mn, de ratas inyectadas con mangafodipir o calmangafodipir que contienen 2,59  $\mu$ moles y 2,52  $\mu$ moles de Mn, respectivamente. La Fig. 6B muestra el aumento en el contenido de orina de Mn expresado como porcentaje de la dosis inyectada. La Fig. 6C muestra el aumento en el contenido de zinc en 24 h de orina en los mismos animales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=4 en cada grupo. Estas figuras se describen más completamente en el Ejemplo 4.

15 Las Figs. 7A-7D muestran los efectos mielosupresores en los glóbulos blancos (WBC), linfocitos (LYM), neutrófilos (NEU) y plaquetas (PLC), respectivamente, de una única inyección intravenosa de dosis crecientes (7,5, 10,0 y 12,5 mg/kg) de oxaliplatina a los 3 y 6 días después de la inyección. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 5.

Las Figs. 8A-8D muestran WBC, LYM, NEU y PLC, respectivamente después del tratamiento de oxaliplatina sola o en combinación con calmangafodipir o mangafodipir en ratones balb/c. Los controles recibieron solo tratamiento de vehículo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, n=5 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 5.

20 Las Figs. 9A-9B muestran la actividad citotóxica de varios derivados de PLED y  $\text{CaCl}_2$  a concentraciones crecientes en células CT26 de cáncer de colon. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE; n=3), como se describe en el Ejemplo 6.

25 La Fig. 10A muestra el efecto antitumoral de una alta dosis de oxaliplatina (20 mg/kg) en ratones balb/c singénicos CT26 en ausencia y presencia de una dosis relativamente alta de calmangafodipir (50 mg/kg). La Fig. 10B muestra el efecto antitumoral de una baja dosis de oxaliplatina (10 mg/kg) en ausencia y presencia de una dosis relativamente baja de calmangafodipir. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=10 en los grupos de vehículo y oxaliplatina 20 mg/kg en la Fig. 10A; n=5 en todos los demás grupos), como se describe en el Ejemplo 7.

30 Las Figs. 11A-11C muestran el contenido en Mn del cerebro, páncreas e hígado, respectivamente, después de 39 dosis o bien de NaCl (controles), mangafodipir o calmangafodipir (que corresponde en ambos casos a una dosis acumulada de 2800  $\mu$ mol/kg de manganeso). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=17-18 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 8.

35 Las Figs. 12A-12D muestran los efectos mielosupresores en los glóbulos blancos (WBC), linfocitos (LYM), neutrófilos (NEU) y plaquetas (PLC), respectivamente, de una única inyección intravenosa de dosis crecientes (75, 100 y 125 mg/kg) de carboplatina a 3 y 6 días después de la inyección. Los resultados expresados como media  $\pm$  EEM; n=5 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 9.

Las Figs. 13A-13D muestran WBC, LYM, NEU y PLC, respectivamente después de carboplatina en combinación con calmangafodipir en ratones balb/c. Los controles recibieron solo tratamiento con vehículo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 9.

40 La Fig. 14 muestra el efecto antitumoral de una baja dosis de oxaliplatina (10 mg/kg) en ratones balb/c inmunocompetentes que portan CT26 y en ratones balb/c desnudos inmunodeficientes (nu/nu) en ausencia y presencia de una dosis relativamente baja de calmangafodipir. Los resultados se expresan como  $\pm$  EEM; n=5 en cada grupo, como se describe en el Ejemplo 10.

45 Las Figs. 15A y 15B muestran la actividad citotóxica de calmangafodipir y mangafodipir en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas U1810 y LLC1, respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE; n=3, como se describe en el Ejemplo 11.

Los dibujos se entenderán más completamente en vista de los Ejemplos.

### Descripción detallada

50 Los complejos, composiciones y métodos de la presente invención proporcionan mejoras en la preparación y uso de complejos metálicos de derivados de PLED, es decir, derivados de Piridoxil EtilDiamina, aunque se reconoce que los derivados también actúan como pro-fármacos de PLED ya que pueden metabolizarse para formar PLED in vivo.

El documento WO 2011/004325 A1 demuestra como un exceso añadido de fodipir (DPDP) a mangafodipir (MnDPDP) lo estabiliza de la liberación de manganeso después de la administración y por consiguiente reduce la absorción al

SNC, y por consiguiente disminuye el potencial neurotóxico del mangafodipir considerablemente. Como es el complejo intacto que contiene manganeso el que ejerce los efectos miméticos de SOD y citoprotectores, un exceso de fodipir no solo disminuirá por tanto el potencial neurotóxico sino que también aumentará la eficacia citoprotectora considerablemente.

5 La liberación in vivo de manganeso a partir de derivados de MnPLED, que incluyen ácido manganeso N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (mangafodipir), depende de la presencia de zinc libre o fácilmente disociable en el cuerpo. El zinc tiene aproximadamente 1000 veces mayor afinidad que el manganeso por el fodipir o sus contrapartes desfosforiladas (Rocklage et al., 1989). Los estudios experimentales sugieren que la liberación de manganeso in vivo a partir de mangafodipir satura a dosis que exceden los 5  $\mu\text{mol/kg}$  (Southon et al., 1997). La  
10 formación de imágenes cardíacas y hepáticas con mangafodipir en voluntarios sanos indica una dosis de saturación similar en el hombre (Skjold et al., J. Magn. Reson. Imaging 2004; 20:948-952, Toft et al., 1997).

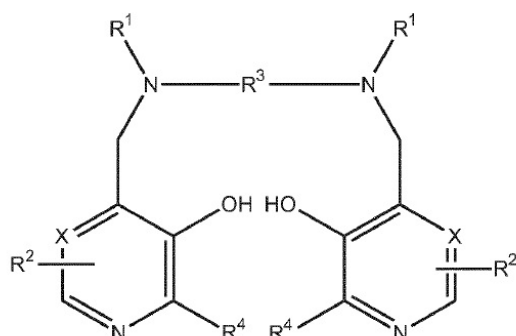
En la invención descrita en el documento WO 2011/004325 A1, se asumió que la composición terapéutica particular se obtuvo mezclando dos ingredientes farmacéuticos activos (IFAs), por ejemplo, mangafodipir y fodipir, en una disolución lista para usar o administrándolas de forma separada. Se demostró que el fodipir a un nivel de dosis de  
15 alrededor de 5 a 10  $\mu\text{mol/kg}$  tenía un considerable efecto estabilizador in vivo en el mangafodipir. Las primeras experiencias clínicas (Yri et al., 2009 y Karlsson et al., 2011) muestran que el mangafodipir es terapéuticamente eficaz a un nivel de dosis en alguna cantidad entre 2 y 10  $\mu\text{mol/kg}$  en el hombre. Tomando en consideración la mayor eficacia de mangafodipir más fodipir, es razonable presumir que el mangafodipir sería terapéuticamente eficaz en pacientes a un nivel de dosis cerca de 1  $\mu\text{mol/kg}$ . Esto, a su vez, nos enseña que una relación de (fodipir +  
20 mangafodipir)/mangafodipir cerca de 5, es decir, una formulación lista para usar que contiene 4 veces más fodipir que mangafodipir, debería ser eficaz. Esto sugiere además una formulación lista para usar que contiene fodipir 40 mM y mangafodipir 10 mM – administración de 0,1 a 0,2 ml de esta formulación por kg de peso corporal – daría por resultado una dosis de 1 a 2  $\mu\text{mol/kg}$  de mangafodipir y 4 a 8  $\mu\text{mol/kg}$  de fodipir.

El calcio tiene aproximadamente  $10^9$  veces menos afinidad por el fodipir que el zinc y aproximadamente  $10^6$  veces  
25 menos afinidad por el fodipir que el manganeso. Sin embargo, teniendo en consideración que el calcio está presente en concentraciones extracelulares mucho mayores que el zinc y el manganeso, la administración del bolo intravenoso rápido de fodipir puede inducir la reducción aguda en las concentración extracelular del calcio libre. Como el corazón es absolutamente dependiente del calcio extracelular para su actividad de bombeo de sangre, la reducción en el contenido extracelular del calcio libre puede a su vez inducir el fallo cardíaco agudo. Sin embargo, como se trata en el  
30 documento WO 2011/004325 A1 este problema puede resolverse fácilmente haciendo uso del DPDP complejoado con calcio, es decir, CaDPDP.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el CaDPDP puede emplearse en un complejo con manganeso en derivados de PLED. Además, sorprendentemente, los complejos de calcio y manganeso, por ejemplo, calmangafodipir, y los complejos de otros metales del Grupo II y metales de transición de los Grupos III-XII, pueden obtenerse.

35 Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto, la invención está dirigida a un complejo metálico mixto de un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, en donde los metales mezclados comprenden un metal de transición del Grupo III-XII y un metal del Grupo II:

Fórmula I



40 En donde

X representa CH o N,

Cada R<sup>1</sup> representa de forma independiente hidrógeno o -CH<sub>2</sub>COR<sup>5</sup>;

R<sup>5</sup> representa hidroxilo, opcionalmente alcoxi, amino o alquilamido hidroxilado;

Cada  $R^2$  represente independientemente  $ZYR^6$  en donde Z representa un enlace o un grupo alquileo u oxoalquileo  $C_{1-3}$ , opcionalmente sustituido por  $R^7$ ;

Y representa un enlace, un átomo de oxígeno o  $NR^6$ ;

5  $R^6$  es un átomo de hidrógeno, grupo  $COOR^8$ , alquilo, alquienilo, cicloalquilo, arilo o aralquilo, opcionalmente sustituido por uno o más grupos seleccionados de  $COOR^8$ ,  $CONR^8_2$ ,  $NR^8_2$ ,  $OR^8$ ,  $=NR^8$ ,  $=O$ ,  $OP(O)(OR^8)R^7$  y  $OSO_3M$ ;

$R^7$  es un grupo hidroxilo, alquilo o aminoalquilo opcionalmente hidroxilado, opcionalmente alcoxilado;

$R^8$  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;

$R^3$  representa un alquileo  $C_{1-8}$ , un 1,2-cicloalquileo, o un grupo 1,2-arileno, opcionalmente sustituido con  $R^7$ ; y

10 Cada  $R^4$  representa independientemente hidrógeno o alquilo  $C_{1-3}$ .

15 Como se usan en esta memoria los términos "alquilo" y "alquileo" incluyen hidrocarburos de cadena lineal y ramificada, saturados e insaturados. El término "1,2-cicloalquileo" incluye grupos cicloalquileo y grupos cicloalquileo sustituidos con alquilo tanto cis como trans que tienen de 5-8 átomos de carbono. El término "1,2-arileno" incluye grupos fenilo y naftilo y derivados sustituidos con alquilo de los mismos que tienen de 6 a 10 átomos de carbono. A menos que se especifique otra cosa, cualquier resto alquilo, alquileo o alquienilo puede contener de forma conveniente de 1 a 20, más específicamente 1-8, más específicamente 1-6, e incluso más específicamente, 1-4 átomos de carbono. Los restos cicloalquilo pueden contener de forma conveniente 3-18 átomos anulares, específicamente 5-12 átomos anulares, e incluso más específicamente 5-8 átomos anulares. Se prefieren los restos arilo que comprenden grupos fenilo o naftilo. Como grupos aralquilo, se prefieren fenilo alquilo  $C_{1-8}$ , especialmente bencilo. Donde los grupos pueden estar opcionalmente sustituidos por grupos hidroxilo, esto puede ser monosustitución o polisustitución y, en el caso de polisustitución, los sustituyentes alcoxi y/o hidroxilo pueden portarse por sustituyentes alcoxi.

20

25 El compuesto de Fórmula I puede tener los mismos o diferentes grupos  $R^2$  en los dos anillos piridilo y estos pueden estar unidos a las mismas o diferentes posiciones anulares. En una realización específica, la sustitución está en las posiciones 5 y 6, o más específicamente, la posición 6, es decir, para el grupo hidroxilo. En una realización específica, los grupos  $R^2$  son idénticos y están posicionados idénticamente, y más específicamente están en las posiciones 6,6'. En realizaciones aún más específicas, cada  $R^6$  es un grupo alquilo mono- o poli(hidroxilo o alcoxilado) o un grupo de la fórmula  $OP(O)(OR^8)R^7$ .

30 En otra realización, la invención está dirigida a un complejo de calcio y manganeso de un compuesto de Fórmula I. En una realización,  $R^5$  es hidroxilo, alcoxi  $C_{1-8}$ , etilenglicol, glicerol, amino o alquil  $C_{1-8}$  amido; Z es un enlace o un grupo seleccionado de  $CH_2$ ,  $(CH_2)_2$ , CO,  $CH_2CO$ ,  $CH_2CH_2CO$  y  $CH_2COCH_2$ ; Y es un enlace;  $R^6$  es un grupo alquilo mono- o poli(hidroxilo o alcoxilado) o de la fórmula  $OP(O)(OR^8)R^7$ ; y  $R^7$  es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido. En una realización más específica,  $R^3$  es etileno y cada grupo  $R^1$  representa  $-CH_2COR^5$  en que  $R^5$  es hidroxilo. En una realización adicional, el compuesto de Fórmula I es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (DPDP), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En aún más realizaciones, el material farmacéutico es un complejo mixto de manganeso y calcio de ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético, o una sal del mismo.

35

40 El complejo metálico mixto puede incluir cualquier combinación de metales de los Grupos indicados. En una realización específica, el metal de transición del Grupo III-XII es  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y/o  $Ni^{2+}$  y el metal del Grupo II es  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$ . En una realización más específica, el metal de transición del Grupo III-XII es  $Mn^{2+}$  y el metal del Grupo II es  $Ca^{2+}$  o una mezcla de  $Ca^{2+}$  y  $Mg$ . En realizaciones más específicas, el metal del Grupo II es una mezcla de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  en una relación molar de  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  de aproximadamente 0,1-50, más específicamente aproximadamente 0,1-10.

45 En realizaciones adicionales, el complejo metálico mixto contiene una relación molar de metal de Grupo II a metal de transición del Grupo III-XII de aproximadamente 1-10. En una realización específica, el metal de transición del Grupo III-XII es  $Mn^{2+}$  y el metal del Grupo II es  $Ca^{2+}$  y la relación molar de  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  es aproximadamente 4. En una realización adicional, el metal de transición del Grupo III-XII es  $Mn^{2+}$  y el metal del Grupo II es  $Ca^{2+}$  y la relación molar de  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  es aproximadamente 4, y el compuesto de Fórmula I es DPDP, es decir, el complejo es el compuesto calmangafodipir como se describe en esta memoria.

50 En otro aspecto, la invención está dirigida a un método de producción de un complejo metálico mixto de la invención, en una etapa de preparación/cristalización. El método comprende una cristalización de una etapa desde una disolución del metal de transición del Grupo III-XII, el metal del Grupo II, y un compuesto de Fórmula I. En una realización específica, se realiza una cristalización de una etapa a partir de una disolución de manganeso, calcio y un compuesto de Fórmula I. En una realización más específica, la disolución tiene una relación de  $(Ca+Mn)/Mn$  cercana a  $(4+1)/1=5$ , es decir, con una composición estequiométrica cercana a  $Ca_4Mn(DPDP)_5$ .

La difracción de rayos X en polvo (XRPD) es la más ampliamente usada en la identificación y caracterización de sólidos cristalinos, cada uno de los cuales produce un patrón de difracción distintivo. Tanto las posiciones (que corresponden a los espaciados de la estructura) como la intensidad relativa de las líneas son indicativas de una fase y material particulares, que proporcionan una "huella dactilar" para la comparación. Como se muestra en los Ejemplos, un análisis de XRPD de calmangafodipir demuestra sin duda que el calmangafodipir es una entidad química, es decir, un complejo, más que una simple mezcla, véase el Ejemplo 1. La Fig. 1 muestra una representación apilada de las tres formas cristalinas de calmangafodipir que se interconvierten según la humedad ambiental. El análisis de XRPD a humedad variable demostró que la Forma B es estable por encima del 40% de humedad relativa (HR), la Forma A es estable a 0-10% de HR, y la Forma C es estable entre 6-36% de HR. Se observaron mezclas de Formas B y C entre 38-44% de HR, y se observó que se daban conversiones de forma dentro de las 3 horas en una escala de 10 mg.

La preparación de una etapa puede realizarse con o sin siembra, pero la siembra (como se ejemplifica en el Ejemplo 1) permite un mejor control de la cristalización.

La preparación de una etapa mencionada brevemente antes es superior a la de la mezcla de complejos metálicos individuales. Por consiguiente, en una realización específica, el complejo de calcio y manganeso es un material cristalino y fácilmente distinguible de una mezcla sencilla de mangafodipir (MnDPDP) y calfodipir (CaDPDP) en las cantidades deseables, como se muestra en el Ejemplo 2.

Los Ejemplos también muestran mejoras y ventajas de los complejos según la invención, como se representa por el complejo de calcio-manganeso calmangafodipir. Respecto a la estabilidad del manganeso in vivo, el calmangafodipir es al menos tan estable como una mezcla real de mangafodipir y fodipir, como se demuestra en el Ejemplo 4. Esto dará por resultado significativamente menos retención de manganeso en el cerebro, como se demuestra en el Ejemplo 8. Como la eficacia citoprotectora depende principalmente del complejo de manganeso intacto mangafodipir o sus contrapartes desfosforiladas, MnDPMP y MnPLED, la eficacia de calmangafodipir es superior a la de mangafodipir, como se ejemplifica en el Ejemplo 5. Además, se ha encontrado sorprendentemente que el mangafodipir posee efectos citotóxicos frente a las células cancerígenas, por ejemplo, células CT26 (Laurent et al., 2005; Alexandre et al., 2006; documento EP 16944338). Sin embargo, como se describe en el documento WO 2009/078794 A1 y en Kurz et al., 2012, esta es una propiedad inherente al fodipir solo o de sus contrapartes desfosforiladas, DPMP y PLED, y no del complejo metálico intacto mangafodipir o sus contrapartes desfosforiladas, MnDPMP y MnPLED. En el Ejemplo 6 se muestra que el fodipir es aproximadamente 20 veces más eficaz que el mangafodipir en matar células de cáncer de colon CT26, y el Ejemplo 11 muestra que el calmangafodipir es aproximadamente 28 veces más eficaz que el mangafodipir en matar células de cáncer de pulmón de células no pequeñas U1810. La disociación en algún grado de manganeso del fodipir, bajo condiciones in vitro, es lo que explica más probablemente la eficacia de matar el cáncer del mangafodipir. El calmangafodipir como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3, en comparación con el mangafodipir a concentraciones equimolares de manganeso, es por otro lado tan eficaz como el fodipir solo, es decir, la eficacia de matar del calmangafodipir es mucho mayor que la del mangafodipir a concentraciones de manganeso equimolar. Este descubrimiento sugiere dos propiedades importantes. En primer lugar, el PLED desfosforilado es probablemente tan eficaz como su contraparte fosforilada fodipir con respecto a su capacidad de matar células cancerígenas, y en segundo lugar, la menor estabilidad de MnPLED en comparación con la del mangafodipir (Rocklage et al., 1989) probablemente explica la mayor eficacia de MnPLED. La falta de cualquier actividad citotóxica de ZnDPDP y ZnPLED es debido a la estabilidad 1000 veces mayor de estos complejos en comparación con sus contrapartes de manganeso (Rocklage et al., 1989).

Durante el desarrollo del mangafodipir como un agente de contraste de IRM, se descubrió que el MnDPDP provocaba anomalías esqueléticas fetales en ratas pero no en conejos. De manera importante, este efecto teratogénico visto en ratas no está provocado por el mangafodipir intacto per se sino por el manganeso disociado (Grant et al., Acta Radiol. 1997; 38:759-769). Aunque es incierto si el manganeso provocará anomalías esqueléticas en el feto humano, es por supuesto esencial proteger a las mujeres potencialmente embarazadas de exponerse al mangafodipir. Esto representa un problema menor para la mayoría de aplicaciones químicas pero un problema ocupacional principal, en particular durante la producción donde tienen que tomarse medidas de forma costosa para proteger a las mujeres fértiles y potencialmente embarazadas de la exposición al mangafodipir. De manera importante, el hecho de que el calmangafodipir liberará el manganeso en un grado mucho menor que el mangafodipir después de absorberse de forma accidental en el cuerpo reducirá por supuesto el riesgo considerablemente de que un feto desarrolle malformaciones esqueléticas. En segundo lugar, como el calmangafodipir es significativamente más eficaz que el mangafodipir a dosis equimolares de manganeso, la necesidad de manganeso se reduce considerablemente para cada dosis de calmangafodipir producido, que dará por resultado menos exposición al manganeso durante la producción.

Además, la preparación de un único ingrediente farmacéutico activo reduce el coste de fabricación de una dosis de tratamiento. Además, la necesidad de dosificación de un único material reduce la posibilidad de errores en la formulación del producto. En las pruebas de estabilidad, la estabilidad del producto cristalino se ha mostrado que es superior al material amorfo, tal como el formado secando por pulverizado una mezcla de los dos IFAs. Como se ilustra en el Ejemplo 2, el material amorfo obtenido a partir del secado por pulverización se mostró que absorbía agua rápidamente, formando partículas condensadas y/o sólidos pegajosos en las 24 h de exposición a 25°C/60% de HR y

40°C/ 75% de HR. En contraste, el calmangafodipir cristalino permaneció como un sólido fluido libre incluso después de 7 días bajo las mismas condiciones de exposición.

Se ha descubierto, como se describe en el documento WO 2011/004325 A1, que la adición de exceso de derivado de PLED que no contiene manganeso, por ejemplo, DPDP, a la terapia derivada de MnPLED, protege al mangafodipir de liberar manganeso neurotóxico in vivo. Aunque el mecanismo detrás de la absorción de manganeso en el cerebro no se entiende totalmente, un exceso del derivado de PLED que no contiene manganeso tal como fodipir administrado en combinación con el derivado de PLED que contiene manganeso tal como mangafodipir reduce significativamente la absorción de manganeso al cerebro. Sin desear estar atado por la teoría, se cree que la combinación según la invención del documento WO 2011/004325 A1 mantiene la forma quelante del MnPLED, por lo que están disponibles cantidades crecientes de quelatos para la excreción y la cantidad de Mn libre para absorberse por el cerebro y otros órganos se reduce. Los quelatos de manganeso de bajo peso molecular, como derivados de MnPLED, y sus contrapartes de Zn se excretarán fácilmente a través del riñón, dirigido por la tasa de filtrado glomerular (TFG), mientras que el manganeso no unido a un quelante de bajo peso molecular se retendrá durante bastante tiempo en el cuerpo y se excretará lentamente y principalmente por medio de la ruta biliar (Toft et al., 1997). Como se muestra en el siguiente Ejemplo 8 en esta memoria, inyecciones intravenosas repetidas (39 veces durante 3 meses) de una alta dosis (36 veces la dosis asumida clínica asumida) de calmangafodipir en ratas provocó significativamente menos retención de manganeso en el cerebro, en comparación con la que provoca el mangafodipir. La dosis total en ambos casos correspondió a aproximadamente 2800  $\mu\text{mol/kg}$  de manganeso. Este ejemplo también muestra que el páncreas absorbe y retiene manganeso disociado en un grado relativamente largo, una propiedad descrita anteriormente por Ni et al. (Acta Radiol 1997; 38:700-707) y utilizada como un método de IRM diagnóstico prometedor del páncreas (Ahlström et al, Acta Radiol 1997; 38:660-664). El nivel de manganeso significativamente más bajo en el páncreas de ratas tratadas con calmangafodipir en comparación con las tratadas con mangafodipir confirma adicionalmente el perfil toxicológico mejorado del calmangafodipir. Aunque el contenido de Mn del hígado estaba significativamente elevado en el grupo de mangafodipir, la elevación relativa fue mucho menor que las del cerebro y el páncreas. Una única dosis diagnóstica de mangafodipir (5  $\mu\text{mol/kg}$  de p.c.) se sabe que provoca un rápido aumento en el contenido de Mn tanto del páncreas como el hígado de las ratas – después de 2 horas el contenido de Mn del páncreas fue aproximadamente 10 veces mayor que el valor basal, y el correspondiente valor del hígado se aumentó aproximadamente 2 veces (Ni et al., 1997). Mientras que Ni et al encontraron el contenido de Mn aún elevado después de 24 horas en el páncreas (aproximadamente 5 veces el valor basal), había vuelto a la base en el hígado a ese punto temporal. Esto refleja presumiblemente la alta capacidad del hígado para manejar el manganeso y su importante papel fisiológico en la homeostasis del manganeso. Esto está soportado además por los actuales resultados que muestran solo un modesto aumento en el Mn hepático después de una fuerte exposición a mangafodipir. El perfil toxicológico mejorado de calmangafodipir se ilustra claramente por el Ejemplo 8 en esta memoria.

Cuando una dosis clínica de un derivado de MnPLED tal como mangafodipir (es decir, 5-10  $\mu\text{mol/kg}$  de p.c., administración intravenosa) se usa como un agente de contraste de IRM en un ser humano, aproximadamente el 80% del manganeso unido a fodipir (DPDP) se intercambia con zinc (Toft et al., 1997). Cuando se administran dosis más pequeñas de mangafodipir, el porcentaje de manganeso que se disocia será incluso mayor. El mangafodipir se comporta desde ese punto de vista de una manera similar en ratas y perros (Hustvedt et al., 1997); sin embargo, casi todo el manganeso en el mangafodipir se intercambia por zinc cuando el compuesto se administra en cerdos y está por tanto sin efectos citoprotectores en los cerdos (Karlsson et al., 2001). Por otro lado, la administración de dosis bajas de MnPLED provoca profundos efectos citoprotectores en los cerdos, visto como un tamaño de infarto de miocardio significativamente reducido tras la isquemia-reperusión. Aunque la constante estabilidad presentada entre  $\text{Mn}^{2+}$  y PLED es considerablemente menor que la correspondiente figura para  $\text{Mn}^{2+}$  y fodipir (Rocklage et al., 1989), MnPLED por alguna razón desconocida escapa del intercambio metálico. El desplazamiento del manganeso es un prerrequisito y por lo tanto es deseable para el uso como un agente de contraste de IRM, por ejemplo, por propósitos diagnósticos del hígado y páncreas. Sin embargo, el efecto terapéutico mimético de SOD frente a diversas formas de estrés oxidativo depende totalmente del complejo derivado de PLED manganeso (Brurok et al., 1999; Karlsson et al., 2001). Por ejemplo, mientras la administración in vivo del mangafodipir protege frente a diversos estresantes oxidativos, por ejemplo, isquemia-reperusión, fármacos citotóxicos/citostáticos e intoxicación por acetaminofeno, no protege al corazón del cerdo frente al infarto de miocardio inducido por isquemia-reperusión (Karlsson et al., 2001), a partir de cuyos resultados puede concluirse que los efectos citoprotectores in vivo de los derivados de MnPLED son una propiedad inherente del complejo de manganeso intacto.

La presencia de Ca en un exceso de aproximadamente 4 veces al Mn, como en calmangafodipir, estabiliza profundamente el complejo o sus contrapartes desfosforiladas de la liberación de manganeso después de las inyecciones y por lo tanto proporciona otra ventaja importante, específicamente eficacia terapéutica aumentada. Por ejemplo, cuando una dosis de formación de imagen clínicamente relevante de MnDPDP (5-10  $\mu\text{mol/kg}$ ) se inyecta de forma intravenosa, aproximadamente el 80% del manganeso unido originalmente a DPDP se libera, contribuyendo a la eficacia de la formación de imagen. Por consiguiente menos del 20% permanece unido al DPDP o sus contrapartes desfosforiladas, lo que contribuye a la actividad terapéutica del MnDPDP. Como la liberación del manganeso del complejo puede reducirse de forma efectiva mediante un exceso de aproximadamente 4 veces de Ca en comparación con el Mn, en el calmangafodipir, esto significa que el manganeso puede reducirse considerablemente para un efecto terapéutico equipotente, como claramente se ejemplifica en la presente invención. A dosis menores y, en ciertas realizaciones, más relevantes terapéuticamente, el efecto estabilizante del Ca estará incluso más acentuado. Esto, a

su vez, significa que el uso de calmangafodipir en comparación con mangafodipir tendrá profundos efectos en el potencial neurotóxico – tanto como un resultado de un efecto estabilizador in vivo como un resultado de la eficacia terapéutica aumentada de la nueva materia farmacéutica calmangafodipir, con una composición estequiométrica cercana a  $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$ .

5 El zinc está presente en todos los tejidos y fluidos corporales. El contenido en zinc corporal total en seres humanos se ha estimado que es 2-3 g (Folin et al., *BioMetals* 1994; 7:75-79). El zinc en plasma representa aproximadamente el 0,1% del contenido en zinc corporal total, y es principalmente esta pequeña fracción de zinc la que compite con el manganeso para unirse al fodipir o sus contrapartes desfosforiladas, DPMP y PLED, después de la administración. El cuerpo humano tiene una capacidad muy alta para mantener la homeostasis del zinc a través de ajustes sinérgicos en la absorción gastrointestinal y la excreción (King et al., *J Nutr* 2000; 130:1360S-1366S).

10 Aunque sin desear estar atados por la teoría, a partir de trabajo preclínico (Southon et al., 1997) y a partir de trabajo clínico (Skjold et al., 2004), puede ser razonable asumir que el cuerpo contiene de 5 a 10  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal (p.c.) de zinc que es fácilmente intercambiable por manganeso en un derivado de MnPLED tal como mangafodipir. Esto corresponde esencialmente al contenido en zinc del plasma como se describe anteriormente. Los derivados de PLED tales como fodipir contienen un sitio de unión para manganeso/zinc por molécula. Por consiguiente, en vista de la afinidad 1000 veces mayor por el zinc al quelante, la presencia de calcio en calmangafodipir en una relación de alrededor de 4 en comparación con el manganeso protegerá frente a la liberación de manganeso después de la administración parenteral a un paciente.

15 Se describen métodos para el tratamiento de un proceso patológico en un paciente, que incluyen, aunque no están limitados a, un proceso patológico provocado por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno, es decir, estrés oxidativo, mediante la administración del complejo. En una realización específica, el proceso patológico está provocado por superóxido que da por resultado la posterior peroxidación lipídica y/o nitración de proteína. En una realización específica, el complejo puede administrarse para el tratamiento terapéutico de dicho proceso patológico en un paciente humano u otro mamífero. En otra realización específica, un complejo según la invención se administra para el tratamiento de un proceso patológico provocado por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno, es decir, estrés oxidativo, en un mamífero.

20 En una realización, el complejo se emplea en el tratamiento con fármaco citotóxico o citostático, en donde el complejo se administra para proporcionar protección de los efectos secundarios desventajosos de los fármacos citotóxicos/citostáticos, por ejemplo, uno o más fármacos para el cáncer en pacientes con cáncer. En una realización más específica, el fármaco citotóxico o citostático comprende al menos uno de doxorubicina, epirubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, 5-fluorouracilo, docetaxel o paclitaxel. En realizaciones adicionales, el proceso patológico es mielosupresión o neurotoxicidad, o ambas.

25 Los métodos pueden incluir además, aunque no estar limitados a, tratamiento de fallo hepático inducido por acetaminofeno, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hepatitis crónica inducida por virus, enfermedad de Wilson, diabetes, enfermedad cardíaca isquémica, que incluye lesión inducida por isquemia-reperusión, o lesión inducida por isquemia de miocardio-reperusión, tanto en una configuración aguda además de electiva, un proceso asociado con un tratamiento trombolítico, un bypass cardiopulmonar, o angioplastia transluminal percutánea, o es un resultado de cirugía cardíaca o de trasplante de órganos o ictus. En realizaciones adicionales, los métodos pueden incluir también el tratamiento de procesos relacionados con hierro, que incluyen sobrecarga de hierro, por ejemplo, talasemia, anemia de células falciformes o hemosiderosis transfusional, cirrosis hepática inducida por hepatitis, lesión inducida por radiación, por ejemplo, que resulta de terapia de radiación, diversas enfermedades neurodegenerativas, que incluyen enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, y similares.

30 En realizaciones aún adicionales, los métodos se administran como terapia de sustitución para un proceso patológico de baja actividad de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), tal como se da en varias formas de cáncer (Buettnner, *Anticancer Agents Med Chem.* 2011; 11:341-346). Por consiguiente, en una realización, la descripción se dirige a un método para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas administrando el complejo de la invención, o, más específicamente, calmangafodipir. En realizaciones adicionales, la descripción se dirige a un método para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas o melanoma maligno, administrando el complejo de la invención, o, más específicamente, calmangafodipir.

35 Una propiedad interesante y probablemente importante para el efecto antitumoral de mangafodipir puede ser su propiedad de protección de linfocitos, como se muestra en el Ejemplo 5, y por Laurent et al., 2005 y Alexandre et al., 2006. Aunque los procesos inflamatorios secundarios a la tensión oxidativa dañan el tejido normal, pueden de hecho ser beneficiosos para el tejido tumoral creando un microentorno rico en factor de crecimiento y promoviendo el crecimiento de clones cancerosos (Anscher, *Oncologist* 2010; 15:350-359; Kareva, *Transl Oncol* 2011; 4:266-270; Kerkar et al., *Cancer Res* 2012; 72:3125-3130). Un sorprendente ejemplo es la existencia de macrófagos asociados con el tumor que se acumulan preferentemente en regiones pobremente vascularizadas de tumores y secretan citoquinas que realmente promueven el crecimiento tumoral. Además, no solo pueden estas citoquinas promover el crecimiento celular sino que también se ha mostrado que suprimen la activación de los linfocitos T CD8+ que son los más eficientes en la eliminación tumoral. De hecho, hay un interés creciente por la importancia de la respuesta inmune

mediada por linfocitos T para el resultado de la quimioterapia del cáncer (Zitvogel et al., Nat Rev Clin Oncol 2011; 8:151-160; Kerkar et al., 2012). Se sabe que la linfopenia severa (<1000 células/ $\mu$ l) afecta de forma negativa a la respuesta a la quimioterapia. Una colección de cánceres de ratón, que incluyen cáncer de colon CT26, fibrosarcomas MCA205, cánceres de mama de la línea celular TSA, osteosarcomas de la línea celular GOS y timomas EL4, responden a la quimioterapia con doxorubicina y oxaliplatina de forma mucho más eficiente cuando están implantadas en ratones inmunocompetentes singénicos que en huéspedes inmunodeficientes, es decir, ratones desnudos (Zitvogel et al., 2011). Esto está en línea con los estudios clínicos que revelan que los linfocitos T CD8+ que producen IFN- $\gamma$  son potentes efectores inmunes del cáncer. Además, una alta relación neutrófilo/linfocito está asociada con una baja supervivencia total para pacientes con cáncer colorrectal avanzado (Chua et al., Br J Cancer 2011; 104:1288-1295). Tomando en consideración que el mangafodipir y en particular calmangafodipir son agentes protectores de linfocitos altamente eficientes durante la quimioterapia, es plausible que esta propiedad sea de particular importancia durante las condiciones in vivo.

Para ser clínicamente útil, un protector de quimioterapia o un protector de radioterapia usado en pacientes de cáncer debería cumplir tres criterios: (i) el agente debería proteger el tejido normal de la toxicidad inducida por quimioterapia/radioterapia pero no proteger al tejido tumoral (al menos no en un mayor grado) – de otra forma no se obtendrá beneficio; (ii) el agente debería distribuirse con relativa facilidad y con mínima toxicidad; y (iii) el agente debería proteger los tejidos normales frente a toxicidades que limitan la dosis o las responsables de la reducción significativa en la calidad de vida (Citrin et al., 2010). Los compuestos de la invención, y calmangafodipir en particular, cumplen todos estos criterios, como los ejemplos en esta memoria demuestran. La razón por la que mangafodipir y calmangafodipir protegen a las células no malignas pero dañan a las células cancerígenas es aparentemente una paradoja. Aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser, sin embargo, que la protección de células no malignas y las acciones citotóxicas contra las células cancerígenas sean solo dos lados de la misma moneda. Un estado oxidativo elevado es indispensable para la estimulación mitogénica en las células transformadas (Irani et al., Science 1997; 275:1649-1652). Un número de estudios han informado que las especies de oxígeno reactivo (EOR) juegan un importante papel en la promoción de la metástasis tumoral (por ejemplo, Behrend et al., Mol Cell Biol 2005; 25:7758-7769). Estos datos son coherentes con una gran colección de bibliografía que sugiere que el equilibrio redox de muchas células tumorales epiteliales favorece un punto de equilibrio oxidante elevado (Doroshov, 2006), que incluye células CT26 (Laurent et al., 2005; Alexandre et al., 2006). La MnSOD suprime el crecimiento celular en una variedad de líneas celulares cancerígenas y en los modelos de ratón. Además, la sobreexpresión de MnSOD indujo la detención del crecimiento en la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116 y aumentó la senescencia que necesitó la inducción de p53 (Behrend et al., 2005). La introducción del gen de MnSOD normal en células cancerígenas altera el fenotipo y las células pierden su capacidad para formar colonias en el cultivo y tumores en los ratones desnudos (Church et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:3113-3117). El estado oxidativo elevado visto en células cancerígenas lleva típicamente a la producción aumentada de  $\bullet\text{O}_2^-$  que reacciona fácilmente con  $\bullet\text{NO}$  para formar ONOO $^-$  altamente tóxico que da por resultado la nitración de tirosina, el lado “feo” de  $\bullet\text{NO}$  (Beckman et al., 1996; Radi, 2004). De forma interesante, la evidencia convincente sugiere que la nitración de tirosina está implicada en la supresión descrita anteriormente de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos CD8+ en los tumores de (Bronte et al., J Exp Med 2005; 201, 1257-1268; Molon et al., J Exp Med 2011; 208:1949-1962). Puede ser que el calmangafodipir a través de su actividad mimética SOD inhiba la producción de ONOO $^-$  y por tanto la supresión inmunológica, lo que explica el efecto antitumoral aumentado visto en ratones inmunocompetentes pero no en ratones inmunoincompetentes, como se demuestra por el Ejemplo 10. El peroxinitrito no es capaz de la nitración de proteína directamente sino que necesita típicamente un metal de transición activo redox como hierro o cobre (e incluso el manganeso puede cumplir esta necesidad) (Radi, 2004). El fodipir y sus metabolitos desfosforilados tienen una afinidad extremadamente alta por el  $\text{Fe}^{3+}$  (Rocklage et al., 1989). Esta propiedad puede, además de la actividad mimética de SOD del calmangafodipir, ser de una importancia particular para la actividad antitumoral. Además de la acción dependiente del linfocito T, la acción inmuno-independiente directa de DPDP y PLED, puede ser debida a la inhibición de la topoisomerasa II, como un artículo reciente de Kurz (2012) puede sugerir.

El complejo puede administrarse en una composición farmacéutica. 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, el complejo puede suspenderse por ejemplo, o disolverse en un medio líquido, opcionalmente con la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables. Excipientes adecuados para las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier excipiente de formulación farmacéutica o veterinaria convencional, que incluyen, aunque no están limitados a, estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones, agentes de ajuste de pH, aglutinantes, cargas y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma adecuada para la administración, que incluye la administración tanto parenteral como enteral. En una realización específica, la composición está en una forma adecuada por ejemplo inyección o infusión. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en una forma de administración farmacéutica convencional tal como un comprimido, cápsula, polvo, disolución, suspensión, dispersión, jarabe, supositorio, aerosol, pomada, apósito o similares. En una realización adicional, el complejo está en forma seca por congelación y, si se desea, puede reconstituirse antes de la administración. El complejo seco por congelación puede estar en una composición seca por congelación que contiene uno o más estabilizadores, y/u otros excipientes conocidos para usar en el secado por congelación.

Dichas composiciones según la presente invención pueden administrarse por varias rutas, por ejemplo, de forma oral, transdérmica, rectal, intratecal, tópica o por medio de inhalación o inyección, en particular inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravascular. Otras rutas de administración pueden usarse también, incluyendo intratimpánica e intranasal, y se prefieren las rutas que aumentan la efectividad, la biodisponibilidad o la tolerancia de los productos. La ruta más apropiada puede elegirse por los expertos en la técnica según la formulación particular que se use. Las dosis adecuadas serán evidentes respecto al tratamiento seleccionado. En una realización, el método de tratamiento según la invención comprende administrar aproximadamente 0,01 a 50  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal del complejo metálico mixto. En realizaciones más específicas, el método de tratamiento según la invención comprende administrar aproximadamente 0,1 a 10  $\mu\text{mol/kg}$ , o aproximadamente 0,1 a 5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal del complejo metálico mixto.

Los siguientes ejemplos demuestran varias realizaciones y aspectos de la invención.

#### Ejemplo 1

##### Método

Un reactor de 100 L con camisa – soplado con  $\text{N}_2$ – se cargó con fodipir (DPDP) (4,0 kg de base anhidra, 6,27 moles, 1 equiv) y agua desionizada (DI) (19,2 L, 4,88 vol). El pH de la carga se ajustó a 5,7 con NaOH diluido (8,9 L totales, 17,5 moles de NaOH, 2,8 equiv; preparado a partir de 1,41 kg de NaOH al 50% en peso y 8,0 L de agua DI) durante 35 min (21,0-23,3°C; enfriamiento externo). La lechada se agitó durante 1 h a 20-25°C durante cuyo tiempo se formó una disolución. A esta se cargó secuencialmente  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (361,1 g, 4,87 moles, 0,78 equiv.), ácido L-ascórbico (55,1 g, 0,313 moles, 5% en moles), y MnO (80 g, 1,13 moles, 0,18 equiv.). Después de la adición de cada reactivo la carga se agitó durante 30-60 min a 20-25°C y el pH se midió (después de Ca = 6,24, amarillo claro ligeramente turbio a óxido; después de ascórbico = 6,28 óxido menos turbio; después de Mn = 6,38, óxido turbio a amarillo verdoso). La carga turbia se agitó durante 16 h a 20-25°C, el pH se midió (6,36) y la carga se filtró a través de un filtro en línea de 0,3  $\mu$  en un reactor de 100 L limpio. Mientras, una disolución de etanol (EtOH) 23A se preparó con acetona (5,9 L, 1,47 vol) y EtOH (74 L, 18,5 vol). Una parte de la disolución de EtOH 23A (8,0 L, 2 vol) se cargó a la carga durante 30 minutos a 20-25°C durante cuyo tiempo la disolución se puso turbia. La carga se sembró con calmangafodipir (40 g, 1% en peso) y se agitó durante 30 min a 20-25°C para asegurar que los sólidos se mantienen.

La temperatura de la carga se ajustó a 15°C durante el curso de 1 h y después se envejeció durante 30 min a 13,8-15,5°C. A la carga se cargó EtOH 23A (56 L, 14 vol) durante 10 h (11-14°C). La lechada se mezcló durante 13 h a 5-10°C y después se filtró para recoger los sólidos. El reactor y los sólidos se enjuagaron con EtOH 23A (14 L, 3,5 vol) frío (0-10°C), los sólidos se acondicionaron durante 2 h y después se secaron en un horno de vacío a 45°C durante 72 h para dar 4,819 kg (93% de rendimiento ajustado por contenido de agua) de calmangafodipir (lote núm. 11AK0105B) como un sólido amarillo. El análisis de HPLC mostró una pureza de 98,8%. El análisis de Karl Fisher en horno (@ 170°C) mostró 10,1% de agua. El análisis ICP indicó 4,27% de Ca, 1,37% de Mn, 8,64% de Na para una relación de Ca/Mn de 4,27, es decir, con una composición estequiométrica cercana a  $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$ .

##### Resultados

El análisis de XRPD (Difracción de rayos X en polvo) se realizó y los patrones resultantes se muestran en la Fig. 1. Los patrones de XRPD demuestran que el calmangafodipir es una única entidad química más que una mezcla sencilla. La Fig. 1 muestra una representación apilada de las tres formas cristalinas conocidas de calmangafodipir que se interconvierten según la humedad del ambiente. El análisis de XRPD con humedad variable demostró que la Forma B es estable por encima de 40% de HR, la Forma A a 0-10% de HR y la Forma C es estable entre 6-36% de HR. Las mezclas de las Formas B y C se observaron entre 38-44% de HR, y se observó que ocurrían conversiones de forma dentro de las 3 horas en una escala de 10 mg.

##### Conclusión

La XRPD demostró sorprendentemente que el calmangafodipir es una entidad química más que una simple mezcla (Fig. 1).

#### Ejemplo 2

##### Método

En una relación de 4:1 aproximadamente 200 mg de calfodipir ( $\text{CaDPDP}$ ) y 50 mg de mangafodipir ( $\text{MnDPDP}$ ) se pesaron en un vial de 40 mL y se disolvieron en 40 mL de agua DI a temperatura ambiente para generar una disolución amarilla. La disolución acuosa amarilla se secó por pulverizado usando un Mini-Secador por pulverizado B-290 Buchi mientras estaba unido al deshumidificador B-296 Buchi como un acondicionador de aire permitiendo la entrada de aire del laboratorio. Los experimentos de optimización del secado por pulverizado se realizaron a elevadas temperaturas de entrada (220°C) con velocidades de alimentación variables (20, 30, 40, 50 y 60%). La recuperación de producto osciló de 180-230 mg.

##### Resultados

Los materiales resultantes se analizaron por XRPD (Figura 2) que indicó que todos los productos eran amorfos y se mostró que absorben agua rápidamente, formando partículas condensadas y/o sólidos pegajosos en las 24 h de exposición a 25°C/60% de HR y 40°C/75% de HR.

### Ejemplo 3

- 5 Este ejemplo elucida la estructura de la nueva entidad química calmangafodipir haciendo uso de: espectroscopia de absorción infrarroja; espectroscopia de masas; y análisis elemental. El análisis RMN no puede utilizarse para el análisis de calmangafodipir debido a la naturaleza paramagnética del Mn.

### Métodos

- 10 Los análisis descritos en este ejemplo se realizaron en un producto producido según el método de una etapa descrito en esta memoria. El producto se identifica como lote núm. 7755-C-R0-01-30-01, y se preparó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Una parte de este producto se ha certificado como un patrón de referencia para el calmangafodipir.

- 15 Espectroscopia de absorción infrarroja. El espectro de absorción infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) del calmangafodipir, lote núm. 7755-C-R0-01-30-01 se obtuvo usando reflexión total atenuada (RTA) en un espectrómetro Thermo-Nicolet Avatar 370.

Espectroscopia de masas. El espectro de masas del calmangafodipir, lote núm. 7755-C-R0-01-30-01, se adquirió en un sistema Micro MS/MS Q-ToF Waters. La ionización por electropulverizado (IEP) (modo polaridad de ión positivo) se eligió para el análisis MS. La muestra se disolvió en una disolución de acetonitrilo/agua 50:50 + ácido fórmico al 0,1% a una concentración de 10 µg/mL. La disolución se infundió directamente en la fuente a una velocidad de 10 µL/minuto.

- 20 Análisis elemental. El calmangafodipir lote núm. 7755-C-R0-01-30-01 se fabricó usando una relación molar de Ca/Mn de 4,26 y 2,8 moles de Na/mol de fodipir. El contenido de metales teórico del complejo con esta composición es 1,41% de Mn, 4,38% de Ca y 8,69% de Na.

### Resultados

- 25 El espectro de absorción infrarroja se muestra en la Fig. 3, y las bandas de absorción infrarroja características (número de onda) y las asignaciones correspondientes son como sigue:

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3250	N-H
3027 – 2848	C-H
1581	C=O
1528	C=C
1471, 1437	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
1383	CH <sub>3</sub>
1277	P=O
1092	P-OH
1038, 977, 933, 913	P-O-C
827, 813, 770, 751	C-H aromático

- 30 El espectro de masas y un espectro de masas expandido de la muestra se muestran en las Figs. 4A y 4B, respectivamente. El espectro presenta como los de calfodipir y mangafodipir superpuestos el uno con el otro. La masa exacta de calfodipir totalmente protonado es 676 y se observa una masa de 677 para [M+1]. Las masas exactas para monosodio, disodio, trisodio y tetrasodio son 698, 720, 742 y 764, respectivamente. El espectro muestra [M+1] para cada especie a 699, 721, 743 y 765, respectivamente. La masa exacta de mangafodipir totalmente protonado es 691, con las correspondientes especies de monosodio, disodio trisodio, trisodio y tetrasodio a 713, 735, 757 y 779, respectivamente. El espectro muestra masas a 692, 714, 736, 758 y 780 para [M+1] para cada especie.

Los resultados del contenido de metales para el lote núm. 7755-C-R0-01-30-01 fueron 1,48% de Mn, 4,44% de Ca y 8,56% de Na y están de acuerdo con los valores esperados, confirmando que tanto el manganeso como el calcio están complejados, con sodio como contraión, y que poco o nada del calcio está presente simplemente como un contraión.

#### Conclusión

- 5 Estos resultados son coherentes con la estructura mostrada en la Fig. 5. La Fig. 5 muestra la relación ideal y genérica de Ca/Mn 4:1 con 3 Na como contraiones, que da el peso molecular de 745,43 mostrado en la Fig. 5. El peso molecular promedio para el material preparado como se describe y se estudia en este Ejemplo tiene una relación de Ca/Mn de 4,26 y 2,8 Na como contraiones, que tiene un peso molecular de 740,89.

#### Ejemplo 4

- 10 Este ejemplo midió la excreción de manganeso (Mn) y zinc (Zn) de orina en animales que reciben calmangafodipir o mangafodipir, a dosis equimolares de Mn.

#### Método

- 15 Ocho ratas Wistar macho (aproximadamente 250 g) se inyectaron de forma intravenosa, por medio de una de las venas de la cola, con 0,25 ml de una disolución de calmangafodipir 50 mM (lote núm. 11AK0105B), que contenía aproximadamente Mn 10 mM y Ca 40 mM, o 0,25 ml de mangafodipir 10 mM (lote núm. 02090106), que contenía Mn 10 mM. Después de la inyección, las ratas se colocaron inmediatamente en jaulas metabólicas para la recogida de orina durante un periodo de 0-24 horas. Para obtener el contenido basal de manganeso (Mn) y zinc (Zn) en la orina, dos ratas adicionales (control) recibieron 0,25 ml de solución salina y se colocaron en jaulas metabólicas para la recogida de orina durante el mismo periodo de tiempo. Las muestras de orina se almacenaron entonces a -80°C hasta el análisis de Mn. Antes de análisis, las muestras se descongelaron y se agitaron extensamente para obtener muestras homogéneas. Una alícuota de cinco ml se tomó de cada muestra y se añadieron 5 ml de ácido nítrico concentrado. Las muestras se resolvieron después en un horno microondas y a partir de ahí se diluyeron con agua destilada a un volumen final de 50 ml. El contenido en Mn de cada muestra se analizó por ICP-MS (espectrometría de masas con plasma acoplado de forma inductiva). Muestras idénticas de calmangafodipir y mangafodipir como las inyectadas en las ratas (es decir, 0,25 ml) se retiraron y se inyectaron en tubos de ensayo. Estas muestras se trataron de forma idéntica a las de las muestras de orina y se analizaron por su contenido en Mn. Los resultados se presentan como contenido de Mn en orina de 0-24 h total (expresado como  $\mu\text{mol/kg} \pm \text{EEM}$ ) y como porcentaje ( $\pm \text{EEM}$ ) de la dosis inyectada. La diferencia estadística entre los animales que recibieron calmangafodipir y mangafodipir, con respecto a la excreción de manganeso en la orina, se ensayó mediante un ensayo t de Student no pareado. Un valor p menor que 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.
- 20  
25  
30

#### Resultados

- Los resultados se presentan en las Figs. 6A, 6B y 6C. Veinticuatro horas después de la inyección iv de 0,25 ml de mangafodipir 10 mM que contenía 2,59  $\mu\text{moles}$  de manganeso (Mn), se recuperaron  $0,60 \pm 0,04$   $\mu\text{moles}$  de Mn en la orina (Fig. 6A), que correspondió a  $23,1 \pm 1,4\%$  de la dosis inyectada (después de que la excreción basal de 0,035  $\mu\text{moles}$  se ha restado, Fig. 6B). La correspondiente figura después de la inyección de 0,25 ml de calmangafodipir 50 mM que contenía 2,52  $\mu\text{moles}$  de Mn fue  $1,27 \pm 0,07$   $\mu\text{moles}$  de Mn (Fig. 6A), que correspondía a  $50,5 \pm 2,6\%$  de la dosis inyectada (Fig. 6B). La diferencia entre mangafodipir y calmangafodipir fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ). La diferencia en la excreción de Mn renal se reflejó más o menos en la diferencia en la excreción renal de zinc (Zn); expresada como excreción de Zn aumentada, es decir, la excreción de 24 h basal (0,068  $\mu\text{moles}$ ) se resta (Fig. 6C).
- 35  
40

#### Conclusión

- Por consiguiente, a una dosis equivalente de Mn, el calmangafodipir dobló la excreción de Mn en la orina en comparación con el mangafodipir. El porcentaje de Mn excretado en la orina durante 0-24 h después de la inyección intravenosa de mangafodipir corresponde muy bien con las figuras presentadas anteriormente en ratas (Hustvedt et al., 1997) y seres humanos (Toft et al., 1997). Los presentes resultados demuestran que el calmangafodipir libera mucho menos Mn en condiciones in vivo que el mangafodipir. Esto proporciona ventajas significativas en que la cantidad de Mn libre disponible para la absorción por el cerebro y otros órganos se reduce y que el índice terapéutico se aumenta significativamente ya que más del mangafodipir terapéutico o sus contrapartes desfosforiladas, MnDPMP y MnPLED, están disponibles in vivo. Por consiguiente, el calmangafodipir da un tratamiento terapéutico considerablemente menos tóxico y mucho más eficaz que el del mangafodipir.
- 45  
50

#### Ejemplo 5

Este ejemplo compara el efecto citoprotector del calmangafodipir con el del mangafodipir y MnPLED con respecto a los efectos mielosupresores de la oxaliplatina en ratones balb/c.

#### Método

En una primera serie de experimentos, 3 grupos en que cada uno consistía en 5 ratones balb/c hembras se trataron una vez de forma intraperitoneal con oxaliplatina a 7,5, 10,0 y 12,5 mg/kg de oxaliplatina, respectivamente. Un día antes (línea base) además de 3 y 6 días después del tratamiento de oxaliplatina se tomaron 50 µl de muestras de sangre EDTA desde el plexo venoso orbital con un capilar de vidrio. Las muestras de sangre se analizaron usando el sistema automatizado CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics) para el contenido de glóbulos blancos (WBC), linfocitos (LYM), neutrófilos (NEU) y plaquetas (PLC). A partir de los resultados (Figs. 7A-7D) se concluyó que deberían realizarse experimentos adicionales que prueben los efectos mieloprotectores del calmangafodipir, mangafodipir y MnPLED a 12,5 mg/kg de oxaliplatina y que los análisis de la muestra de células sanguíneas debería realizarse el día antes y 6 días después de la administración de oxaliplatina en cada ratón. Treinta minutos antes de la administración de oxaliplatina (12,5 mg/kg) y 24 horas después, los ratones recibieron solución salina, calmangafodipir (5 mg/kg; lote núm. 11AK0105B), mangafodipir (1 y 10 mg/kg; lote núm. 02090106) o MnPLED (1 mg/kg), de forma intravenosa (5 ratones en cada grupo). Una dosis de 5 mg/kg de calmangafodipir contenía la misma cantidad de manganeso que la de 1 mg/kg de mangafodipir, es decir, 1,3 µmoles; 1 mg/kg de MnPLED contenía algo más manganeso (aproximadamente 2 µmoles). Un grupo de control recibió en vez de oxaliplatina vehículo (5% de glucosa) y solución salina. Los resultados se presentan en gráficos como cambios relativos de la línea base para los diversos tratamientos y células sanguíneas ( $\pm$  EEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento, donde sea apropiado, se ensayaron mediante un ensayo t de Student no pareado. Un valor p menor que 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

#### Resultados

Los resultados se presentan en las Figuras 8A-8D. A una dosis de manganeso equivalente, es decir, 5 mg/kg de calmangafodipir fue estadísticamente significativa más eficaz que 1 mg/kg de mangafodipir para proteger a los ratones de la caída inducida por oxaliplatina en el número total de glóbulos blancos (WBC) (Fig. 8A). Una única dosis de 12,5 mg/kg de oxaliplatina provocó que los WBC cayeran más del 80%, mientras que la caída en animales tratados con calmangafodipir fue solo de aproximadamente 25%. La caída correspondiente en ratones tratados con 1 o 10 mg/kg de mangafodipir fue alrededor del 50%. Estos resultados presumiblemente sugieren también que el MnDPDP tiene que desfosforilarse en MnPLED antes de que pueda ejercer efectos mieloprotectores; 1 mg/kg de MnPLED era, como el calmangafodipir, significativamente más eficaz que 1 y 10 mg/kg de mangafodipir protegiendo los WBC. Se vieron caídas similares en los linfocitos (LYM; Fig. 8B) y en los neutrófilos (NEU; Fig. 8C) después del tratamiento de oxaliplatina. También se obtuvieron resultados cualitativamente similares cuando se analizaron los neutrófilos (NEU) (Fig. 8C). Con relación a las plaquetas (PLC; Figs. 7D y 8D, en comparación con los WBC, LYM y NEU) difirieron tanto en la sensibilidad hacia la oxaliplatina como en los efectos citoprotectores de las sustancias de ensayo.

#### Conclusión

El calmangafodipir era a una dosis de manganeso equimolar significativamente más potente que el mangafodipir para proteger ratones balb/c frente a los efectos mielosupresores del fármaco anticancerígeno oxaliplatina.

#### Ejemplo 6

La actividad citotóxica en células de cáncer de colon murinas de calmangafodipir se comparó con la del mangafodipir, fodipir, MnPLED, ZnPLED, ZnDPDP, calfodipir (CaDPDP), PLED y CaCl<sub>2</sub>.

#### Método

La viabilidad de las células se midió usando el ensayo MTT. Brevemente, 8.000 células CT26 (carcinoma de colon de ratón) se sembraron por pocillo en un plato de 96 pocillos y se dejaron crecer durante la noche en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en aire humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se expusieron entonces durante 48 h a calmangafodipir 1-1.000 µM (lote núm. 11AK0105B), fodipir (DPDP: lote núm. RDL02090206), PLED (lote núm. KER-AO-122(2)), calfodipir (CaDPDP), mangafodipir (lote núm. 02090106), MnPLED, ZnPLED ZnDPMP y CaCl<sub>2</sub> a 37°C. La viabilidad de las células se evaluó entonces añadiendo 5 mg/ml de metiltiazoltetrazolio (MTT) a una concentración final de 0,5 mg/ml e incubando células durante unas 4 h más a 37°C. El formazán azul que se forma mediante deshidrogenasas mitocondriales de células viables se disolvió entonces durante la noche a 37°C añadiendo SDS al 10% y HCl 10 mM a una concentración final de SDS al 5% y HCl 5 mM. Finalmente, la absorbancia de la disolución se leyó a 570 nm con una referencia a 670 nm en un lector de microplato Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) conectado a un ordenador Apple Macintosh que ejecuta el programa Softmax Pro V1.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

#### Resultados

La actividad citotóxica de fodipir, PLED, calfodipir o calmangafodipir fue aproximadamente 20 veces mayor que la del mangafodipir (Figs. 9A y 9B). El MnPLED fue casi 10 veces más potente que el mangafodipir en su capacidad para matar células cancerígenas CT26 (Fig. 9A). Ni ZnDPDP, ZnPLED ni CaCl<sub>2</sub> presentaron ninguna actividad citotóxica en absoluto a las concentraciones usadas (Figs. 9A y 9B).

## Conclusión

5 Cuando se compararon calmangafodipir y mangafodipir, se encontró que el calmangafodipir era aproximadamente 20 veces más potente que el mangafodipir para matar células cancerígenas CT26. La disociación de manganeso en algún grado desde fodipir probablemente explica la eficacia de la muerte del cáncer del mangafodipir. El calmangafodipir como se define en los Ejemplos 1 y 3, a concentraciones equimolares de manganeso, es por otro lado tan eficaz como el fodipir solo, es decir, la eficacia de la muerte del calmangafodipir es mucho mayor que la del mangafodipir a concentraciones equimolares de manganeso. Este descubrimiento sugiere dos propiedades importantes. En primer lugar, el PLED desfosforilado es probablemente tan eficaz como su contraparte fosforilada fodipir con respecto a su capacidad de matar células cancerígenas, y en segundo lugar, la menor estabilidad del MnPLED en comparación con la del mangafodipir (Rocklage et al., 1989) probablemente explica la mayor eficacia de MnPLED. La falta de cualquier actividad citotóxica de ZnDPDP y ZnPLED es presumible debido a la estabilidad 1000 veces mayor de estos complejos en comparación con sus contrapartes de manganeso (Rocklage et al., 1989).

## Ejemplo 7

15 Este ejemplo compara la actividad antitumoral de la oxaliplatina en un modelo de ratón que lleva cáncer de colon murino (CT26) en presencia y ausencia de calmangafodipir.

## Método

20 Las células CT26 se cultivaron en matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en aire humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células alcanzaron ~50% de confluencia se cosecharon por tripsinización. Brevemente, las células se lavaron con solución salina basada en fosfato (PBS) (pH 7,3) y se expusieron a 0,05% de tripsina/EDTA 0,53 mM a 37°C durante ~5 min. La tripsinización se paró añadiendo medio de cultivo RPMI 1640. Las células se contaron y se centrifugaron a 200xg durante 5 min. A partir de ahí, se lavaron en PBS, se centrifugaron de nuevo y se suspendieron de nuevo en PBS a una concentración de 2x10<sup>6</sup>/350 µl por inyección en ratones. Se usaron ratones hembra balb/c de entre 6 y 8 semanas de edad, como se describe por Laurent et al., 2005. Brevemente, cada ratón se inyectó de forma subcutánea en la parte de atrás del cuello con 2 x 10<sup>6</sup> de células CT26 en el día 0. Después de 7 días (día 7) cuando los tumores eran detectables, el tamaño del tumor se determinó con un calibrador y los ratones se agruparon (5 en cada grupo) de manera que los tamaños de los tumores no eran estadísticamente diferentes por grupo. Se inyectó oxaliplatina ± calmangafodipir (lote núm. 11AK0105B) y un grupo de ratones recibió solo tratamiento con vehículo (solución salina al 0,9% + glucosa al 5%). En una primera serie de experimentos, los ratones se inyectaron i.v. con solución salina o 50 mg/kg de calmangafodipir 30 minutos antes de la administración i.p. de 20 mg/kg de oxaliplatina (diluida en glucosa al 5%) o glucosa al 5%. Estos ratones recibieron además solución salina o 50 mg/kg de calmangafodipir 24 horas después (día 8). En otra serie de experimentos, los ratones se inyectaron i.v. con solución salina o 5 mg/kg de calmangafodipir 30 minutos 10 mg/kg de oxaliplatina (diluida en glucosa al 5%) o glucosa al 5%, y solución salina o 5 mg/kg de calmangafodipir 24 horas después (día 8). Los ratones se sacrificaron en el día 10 y los tumores se extirparon y se determinaron los pesos húmedos. Las diferencias estadísticas entre grupos de tratamiento, donde sea apropiado, se ensayaron mediante un ensayo t de Student no pareado. Un valor p menor que 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

## Resultados

40 Los resultados se describen en las Figs. 10A y 10B. En la primera serie del experimento los ratones recibieron 20 mg/kg de oxaliplatina, que está cerca de la mayor dosis tolerada. El tratamiento único con oxaliplatina dio por resultado una reducción estadísticamente significativa y mayor que 50% en el peso tumoral. El tratamiento con calmangafodipir (50 mg/kg) no tuvo ninguna influencia negativa en el efecto antitumoral de la oxaliplatina a una dosis alta (Fig. 10A). Sin embargo, en una segunda serie de experimentos en que se usaron 10 mg/kg de oxaliplatina, el tratamiento con una dosis relativamente baja de calmangafodipir (5 mg/kg) dio por resultado un efecto antitumoral mejor estadísticamente significativo (Fig. 10B); el efecto combinado de 10 mg/kg de oxaliplatina más 5 mg/kg de calmangafodipir fue casi tan eficaz como 20 mg/kg de oxaliplatina sola.

## Conclusión

50 El calmangafodipir no interfirió de forma negativa con la actividad antitumoral de la oxaliplatina, y, por el contrario, a una dosis relativamente baja de oxaliplatina (10 mg/kg), el calmangafodipir en realidad aumentó la eficacia antitumoral.

## Ejemplo 8

Este ejemplo compara los niveles de manganeso después de repetidas inyecciones intravenosas de calmangafodipir y mangafodipir (39 veces durante 33 semanas) en el cerebro, páncreas e hígado de rata.

## Método

5 Ratas macho y hembra Wistar se inyectaron de forma intravenosa con o bien NaCl al 0,9%, 72,0  $\mu$ moles/kg de mangafodipir (lote núm. 02090106; que corresponde a 72  $\mu$ moles/kg de manganeso) o 374,4  $\mu$ moles/kg de calmangafodipir (lote núm. 11AK0105B; que corresponde a 72  $\mu$ moles/kg de manganeso) 3 veces a la semana durante 13 semanas (cada grupo de tratamiento consistió en 9 machos + 9 hembras). Cada dosis de calmangafodipir correspondió a aproximadamente 36 veces la dosis clínica asumida (DCA). Después del periodo de administración de 13 semanas, las ratas se sacrificaron y los cerebros y páncreas se diseccionaron y aproximadamente 0,5 g de muestras se almacenaron congeladas hasta el análisis de Mn. El contenido de Mn de cada muestra se analizó por ICP-MS. Los resultados se expresan como  $\mu$ g/g de peso húmedo  $\pm$  EEM. La diferencia estadística entre el grupo de mangafodipir y el grupo de calmangafodipir, con respecto al contenido de Mn, se ensayó mediante un ensayo de t de Student no pareado. Un valor de p menor de 0,05 se consideraba como una diferencia estadísticamente significativa.

## Resultados

15 Los resultados se describen en las Figs. 11A-C. El contenido en el cerebro de Mn en ratas de control tratadas con NaCl, ratas tratadas con mangafodipir y ratas tratadas con calmangafodipir fue  $0,38 \pm 0,01$ ,  $0,99 \pm 0,02$  y  $0,74 \pm 0,01$   $\mu$ g/g p.p., respectivamente. El contenido de Mn correspondiente en el páncreas fue  $1,66 \pm 0,06$ ,  $5,54 \pm 0,45$  y  $3,35 \pm 0,19$   $\mu$ moles/kg, respectivamente. Sin embargo, el contenido en Mn del hígado estaba significativamente elevado de forma estadística en el grupo (Fig. 11C), la elevación relativa fue mucho menor que las vistas en el cerebro y el páncreas.

## Conclusión

20 La administración de una dosis alta acumulada de calmangafodipir en ratas da por resultado la retención menos significativa de manganeso en el cerebro y el páncreas en comparación con mangafodipir (la dosis total en ambos casos correspondió a aproximadamente 2800  $\mu$ moles/kg de manganeso). Estos resultados demuestran el perfil toxicológico mejorado de calmangafodipir en comparación con el del mangafodipir.

## Ejemplo 9

25 Este ejemplo muestra el efecto citoprotector del calmangafodipir con respecto a los efectos mielosupresores de la carboplatina en ratones balb/c.

## Método

30 En una primera serie de experimentos, 3 grupos, cada uno que consiste en 5 ratones balb/c hembra, se trataron una vez de forma intraperitoneal con carboplatina a 75, 100 y 125 mg/kg de carboplatina, respectivamente. Un día antes (línea base), además de 3 y 6 días después, el tratamiento de carboplatina, se tomaron muestras de sangre 50  $\mu$ l de EDTA sangre del plexo venoso orbital con un vidrio capilar. Las muestras de sangre se analizaron usando el sistema automatizado CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics) para el contenido de glóbulos blancos (WBC), linfocitos (LYM), neutrófilos (NEU) y plaquetas (PLC). A partir de los resultados (Figs. 12A-12D), se concluyó que deberían realizarse más experimentos que prueben el efecto mieloprotector del calmangafodipir a 125 mg/kg de carboplatina y que, en caso de WBC, NEU y LYM, deberían realizarse análisis de células sanguíneas el día antes y 3 días después de la administración de carboplatina, y, en caso de PLC, el análisis de la muestra de células sanguíneas debería realizarse el día antes y 6 días después de la administración de carboplatina. Treinta minutos antes de la administración de carboplatina (125 mg/kg) y 24 horas después, los ratones recibieron solución salina de calmangafodipir (1, 3, 10 o 30 mg/kg; lote núm. 11AK0105B). Un grupo de control recibió vehículo (solución salina) y solución salina en vez de carboplatina. Los resultados se presentan en gráficos como cambios relativos desde la línea base para los diversos tratamientos (media  $\pm$  EEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento, donde sean apropiadas, se ensayaron mediante una prueba de t de Student no pareado. Un valor p menor que 0,05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

## Resultados

45 Los resultados se describen en las Figs. 13A-13D. La carboplatina (125 mg/kg) provocó una disminución de aproximadamente 50% en WBC, además de en NEU y LYM. El tratamiento con calmangafodipir a una dosis de 3 mg/kg abolió estas disminuciones. La respuesta a la dosis de calmangafodipir presentó una apariencia en forma de campana en cada caso, de una forma similar a como se describió previamente para el mangafodipir con respecto a su efecto cardioprotector frente a la doxorubicina en ratones CD (Kurz et al., Transl Oncol 2012; 5:252-259).

50 Respecto a las plaquetas (PLC, Figs. 12D y 13D), en comparación con WBC, LYM y NEU, difieren en la sensibilidad frente a la carboplatina.

## Conclusión

El calmangafodipir protege profundamente a los ratones balb/c frente a los efectos mielosupresores del fármaco anticancerígeno carboplatina.

## Ejemplo 10

Este ejemplo compara la actividad antitumoral de la oxaliplatina en ratones balb/c inmunocompetentes que portan cáncer de colon (CT26) y ratones balb/c desnudos inmunodeficientes (nu/nu) en presencia y ausencia de calmangafodipir.

## 5 Método

Las células CT26 se cultivaron en matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en aire humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células alcanzaron la confluencia al ~50% se cosecharon por tripsinización. Brevemente, las células se lavaron con PBS (pH 7,3) y se expusieron a tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM a 37°C durante ~5 min. La tripsinización se paró añadiendo medio de cultivo RPMI 1640. Las células se contaron y se centrifugaron a 200xg durante 5 min. A partir de ahí, se lavaron en PBS, se centrifugaron de nuevo y se suspendieron de nuevo en PBS a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup>/350 µl para la inyección en el ratón. Se usaron ratones hembra balb/c inmunocompetentes (balb/c) y ratones balb/c hembra desnudos inmunoincompetentes (balb/c nu/nu) de entre 6 y 8 semanas de edad, como se describe por Laurent et al., 2005. Brevemente, cada ratón se inyectó de forma subcutánea en la parte trasera del cuello con 2x10<sup>6</sup> de células CT26 en el día 0. Después de 7 días (día 7) cuando los tumores fueron detectables, el tamaño del tumor se determinó con un calibrador y los ratones se agruparon (5 en cada grupo) de manera que los tamaños de los tumores no eran diferentes estadísticamente por grupo. Los grupos de ratones (5 en cada grupo, como se ilustra en la Fig. 14) se inyectaron i.v. con solución salina o 5 mg/kg de calmangafodipir (lote núm. 11AK0105B) 30 minutos antes de la administración i.p. de 10 mg/kg de oxaliplatina (diluida en glucosa al 5%) o glucosa al 5%. Los ratones recibieron además solución salina o 5 mg/kg de calmangafodipir 24 horas más tarde (día 8). Los ratones se sacrificaron en el día 10 y los tumores se extirparon y se determinaron los pesos húmedos. Los resultados se presentan en un gráfico para los diversos tratamientos (media ± EEM). Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento, donde era apropiado, se probaron mediante un ensayo de t de Student no pareado. Un valor p menor que 0,05 se consideró una diferencia estadísticamente significativa.

## 25 Resultados

Los resultados se describen en la Fig. 14. Hubo una clara tendencia a que los tumores crecieran más grandes en los ratones balb/c inmunodeficientes que en ratones nu/nu balb/c inmunocompetentes pero esta diferencia no alcanzó significación estadística (p=0,0870). Un único tratamiento con 10 mg/kg de oxaliplatina dio por resultado una reducción de 20 a 30% estadísticamente insignificante en pesos tumorales en ratones balb/c inmunocompetentes e inmunodeficientes. El tratamiento con 5 mg/kg de calmangafodipir no tuvieron ninguna influencia negativa en el efecto antitumoral de oxaliplatina ni en los ratones inmunocompetentes ni en los inmunoincompetente. De hecho el peso tumoral medio se redujo estadísticamente de forma significativa en los ratones inmunocompetentes tratados con 5 mg/kg de calmangafodipir en comparación con los controles. Sin embargo, no se vio dicha reducción en los ratones inmunodeficientes.

## 35 Conclusión

El calmangafodipir no interfirió de forma negativa con la actividad antitumoral de la oxaliplatina ni en los ratones inmunocompetentes ni en los inmunodeficientes pero fue solo en los ratones inmunocompetentes que el calmangafodipir aumentó de hecho la eficacia antitumoral.

## Ejemplo 11

40 La actividad citotóxica del calmangafodipir hacia las células U1810 de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas murina (LLC1) se comparó con la del mangafodipir.

## Métodos

La viabilidad de las células se midió usando el ensayo MTT. Brevemente, 8.000 células de CPCNP U1810 o CPCNP LLC1 humanas se sembraron por pocillo en un plato de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en aire humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se expusieron entonces durante 48 h a calmangafodipir 1-1.000 µM (lote núm. 11AK0105B) o mangafodipir (lote núm. 02090106). La viabilidad de las células se evaluó después añadiendo 5 mg/ml de metiltiazoltetrazolio (MTT) a una concentración final de 0,5 mg/ml e incubando células durante una 4 h más a 37°C. El formazán azul que está formado por deshidrogenasas mitocondriales de células viables se disolvió entonces toda la noche a 37°C añadiendo SDS al 10% y HCl 10 mM a una concentración fina de SDS al 5% y HCl 5 mM. Finalmente, la absorbancia de la disolución se leyó a 570 nm con una referencia a 670 nm en un lector de microplato Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) conectado con un ordenador Apple Macintosh que ejecuta el programa Softmax Pro V1.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La viabilidad de las células U1810 o LLC1 en presencia de concentraciones crecientes de calmangafodipir o mangafodipir se presenta como curvas de respuesta a la concentración (media ± EEM). Las curvas individuales se ajustan a la ecuación logística de respuesta con pendiente variable sigmoidal

(Graphpad Prism, versión 5.02). A partir de este análisis se calcularon las concentraciones que provocan una inhibición del 50% ( $CI_{50}$ ) de las sustancias de ensayo.

#### Resultados

5 La actividad citotóxica del calmangafodipir y mangafodipir hacia células CPCNP U1810 y LLC1 se muestra en las Figs. 15A y 15B. La relación  $CI_{50}$  calculada entre mangafodipir y calmangafodipir (0,0006329/0,0002274) mostró que el calmangafodipir era aproximadamente 28 veces más potente que el mangafodipir para matar células U1810 (Fig. 15A). Aunque el calmangafodipir era significativamente más potentes que el mangafodipir para matar células LLC1, por la apariencia ambigua de la curva de mangafodipir (Fig. 15B) no fue significativo para calcular una relación de  $CI_{50}$  entre mangafodipir y calmangafodipir.

#### 10 Conclusiones

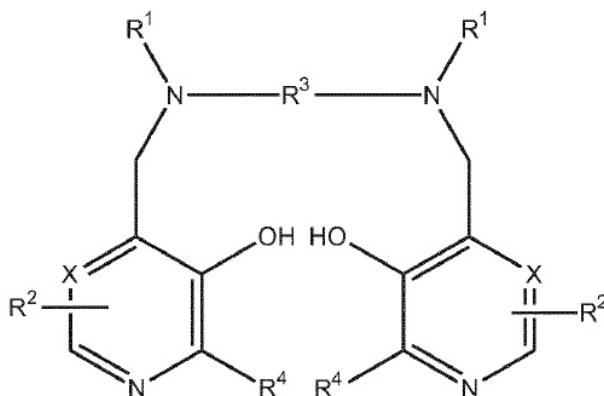
Los resultados demuestran que la eficacia superior del calmangafodipir en comparación con el mangafodipir para matar células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, U1810 y LLC1.

15 Los ejemplos y realizaciones específicas descritas en esta memoria son ilustrativos por naturaleza solo y no se van a tomar como limitantes del alcance de la invención definida por las siguientes reivindicaciones. Realizaciones específicas y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la presente descripción y están dentro del alcance de la invención reivindicada.

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo metálico mixto de un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, en donde los metales mezclados comprenden calcio y manganeso, en donde la relación molar de calcio a manganeso es 1-10:

Fórmula I



5

En donde

X representa CH o N,

Cada R¹ representa independientemente -CH₂COR⁵;

R⁵ representa hidroxilo;

10 Cada R² representa independientemente ZYR⁶ en donde Z representa un enlace o un grupo seleccionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO y CH₂COCH₂;

Y representa un enlace;

R⁶ es un grupo alquilo mono- o poli(hidroxilo o alcoxilado) o de la fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷;

R⁷ es hidroxilo, o un grupo alquilo o aminoalquilo no sustituido;

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

R³ representa etileno; y

Cada R⁴ representa independientemente hidrógeno o alquilo C₁-₃.

20 2. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 1, en donde el compuesto de Fórmula I es ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (DPDP) o ácido N,N'-dipiridoxiletildiamina-N,N'-diacético (PLED), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 1 o 2, que tiene una relación molar de Ca²⁺/Mn²⁺ de 4.

4. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 1, en donde el complejo metálico mixto es un complejo metálico mixto de una sal sódica de ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilendiamina-N,N'-diacético (DPDP) y en donde la relación molar de calcio a manganeso es 4:1.

25 5. Una composición farmacéutica formada suspendiendo o disolviendo un complejo metálico mixto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en un medio líquido, opcionalmente con uno o más excipientes fisiológicamente aceptables.

6. Un método de producción de un complejo metálico mixto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una cristalización de una etapa a partir de una disolución de calcio, manganeso y un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo.

30 7. Un complejo metálico mixto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para usar como un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de un proceso patológico.

8. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 7, en donde el proceso patológico está provocado por la presencia de radicales libres derivados de oxígeno o por superóxido que da por resultado la posterior peroxidación lipídica y/o nitración de proteína.

9. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 7, en donde el proceso patológico es una lesión relacionada con el tratamiento con fármaco citotóxico o citostático, preferiblemente una lesión con fármaco para tratamiento del cáncer, más preferiblemente una lesión por fármaco de al menos uno de doxorubicina, epirubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, 5-fluorouracilo, docetaxel o paclitaxel.
- 5 10. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 7, en donde el proceso patológico es mielosupresión o neurotoxicidad o ambas, una lesión inducida por isquemia-reperfusión, asociada con la aterosclerosis y/o diabetes, o asociada con un tratamiento trombolítico, un bypass cardiopulmonar, o angioplastia transluminal percutánea, o un resultado de cirugía cardíaca o de trasplante de órganos, o ictus.
- 10 11. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 7, en donde el proceso patológico es fallo hepático agudo inducido por acetaminofeno, un proceso patológico de hierro o cobre, talasemia, anemia falciforme, hemosiderosis transfusional, enfermedad de Wilson, cirrosis hepática inducida por hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hepatitis crónica inducida por virus, una lesión inducida por radiación o baja actividad de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD).
- 15 12. Un complejo metálico mixto según la reivindicación 7, en donde el proceso patológico es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de páncreas o melanoma maligno.
13. Un complejo metálico mixto según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, para usar como un medicamento en una cantidad de 0,01 a 50  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal.
- 20 14. Un complejo metálico mixto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-12, en donde el complejo metálico mixto se seca por congelación.
15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, para usar como un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de un proceso patológico.
- 25 16. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15, en donde el proceso patológico es una lesión relacionada con el tratamiento con fármaco citotóxico o citostático, preferiblemente una lesión por fármaco para el tratamiento del cáncer, más preferiblemente una lesión por fármaco de al menos uno de doxorubicina, epirubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, 5-fluorouracilo, docetaxel o paclitaxel, o el proceso patológico es fallo hepático agudo inducido por acetaminofeno.

Fig. 1

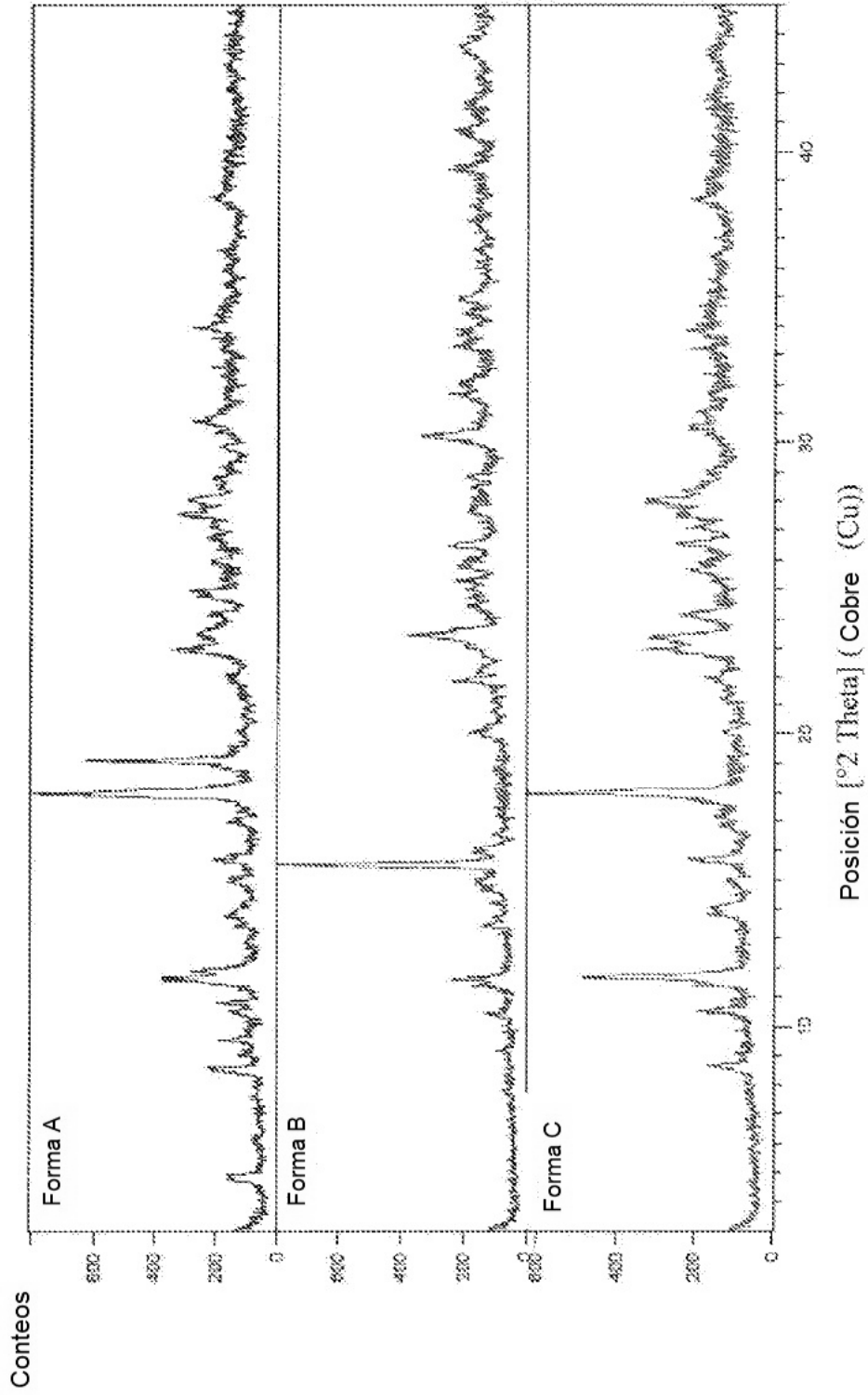


Fig. 2

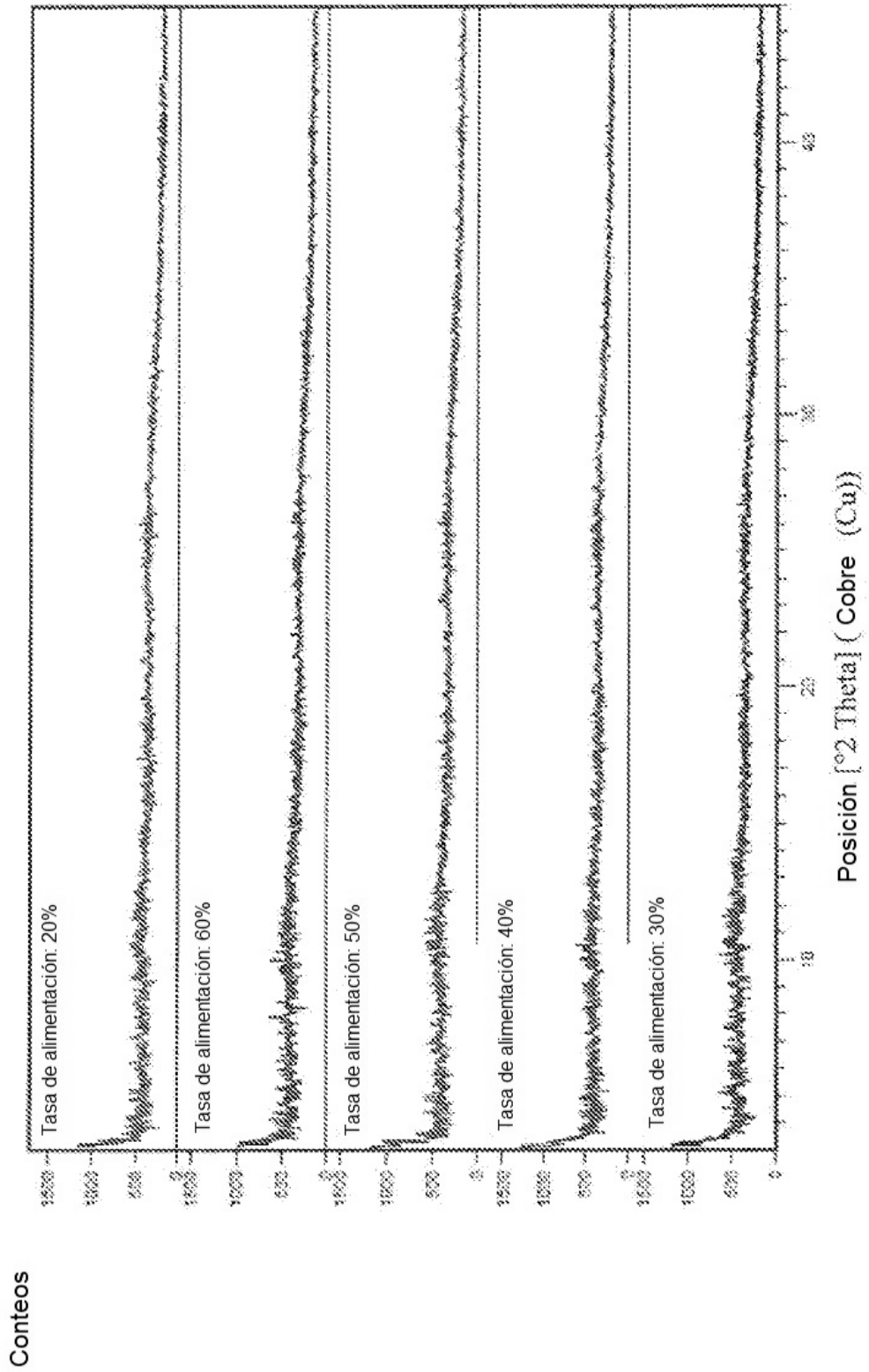


FIG. 3

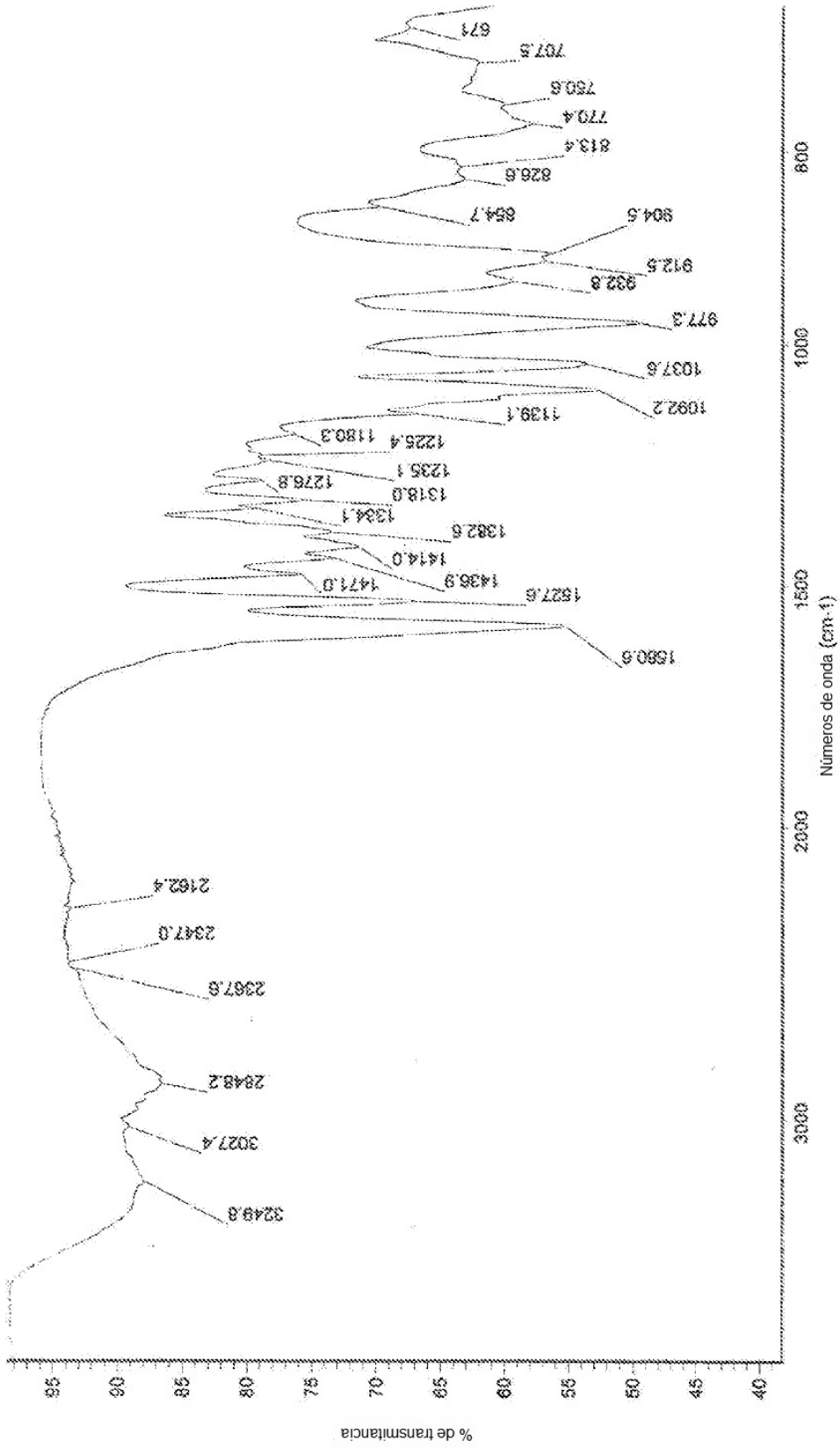


FIG. 4A



FIG. 4B

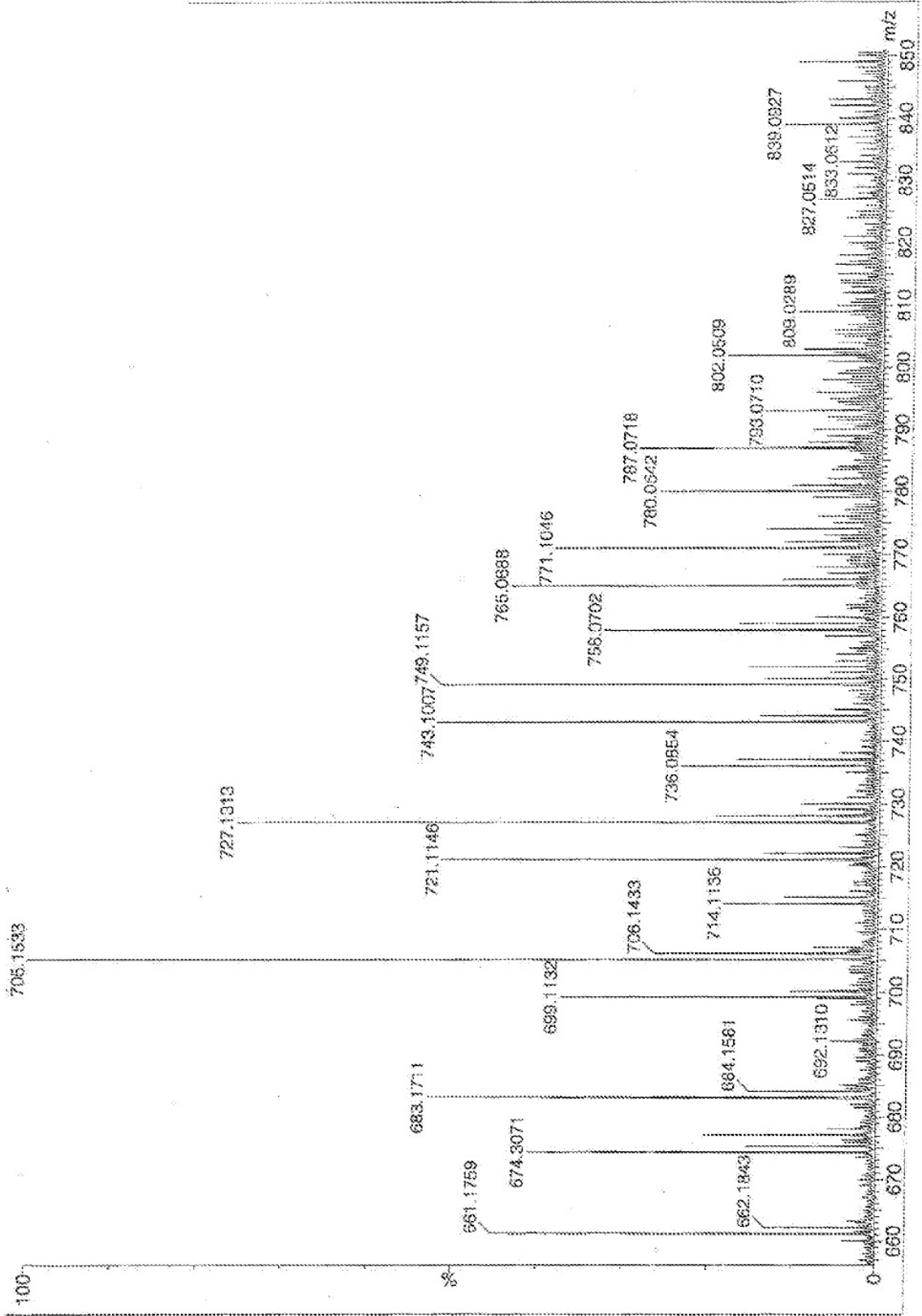
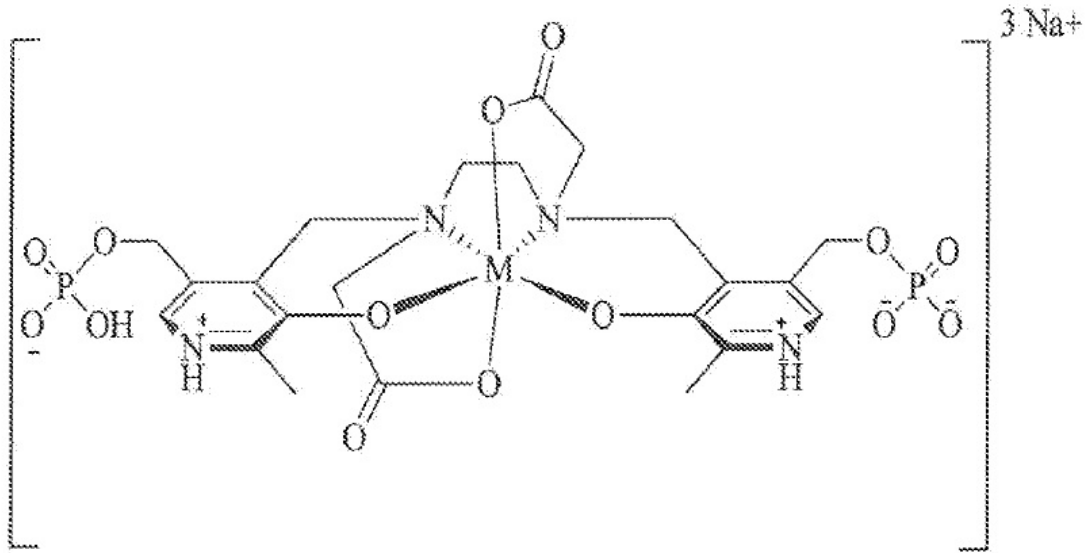


FIG. 5



M = 0.8 Ca : 0.2 Mn

$C_{22}H_{27}MN_4Na_3O_{14}P_2$

fw: 745.43

Fig. 6A

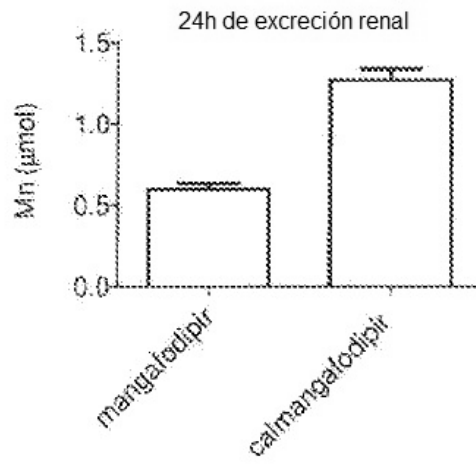


Fig. 6B

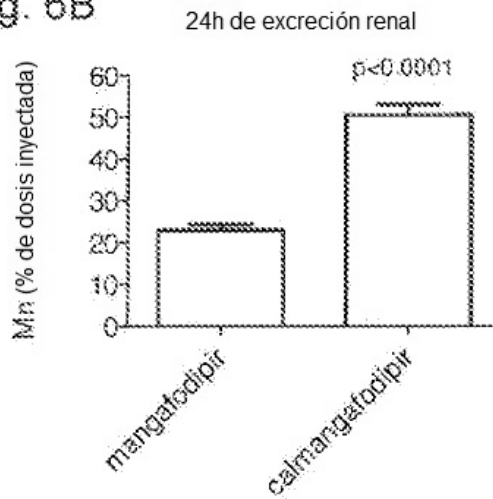


Fig. 6C

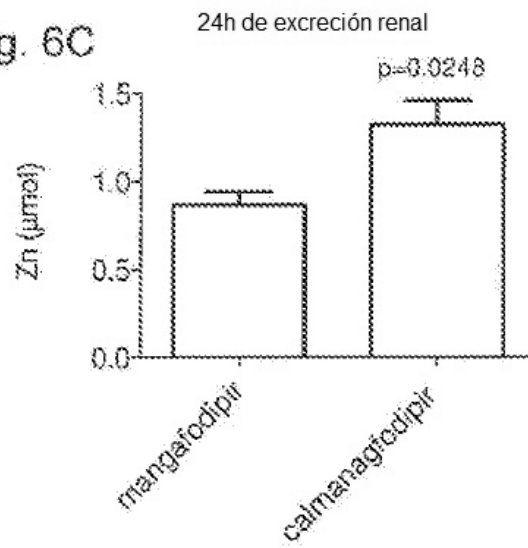


Fig. 7A

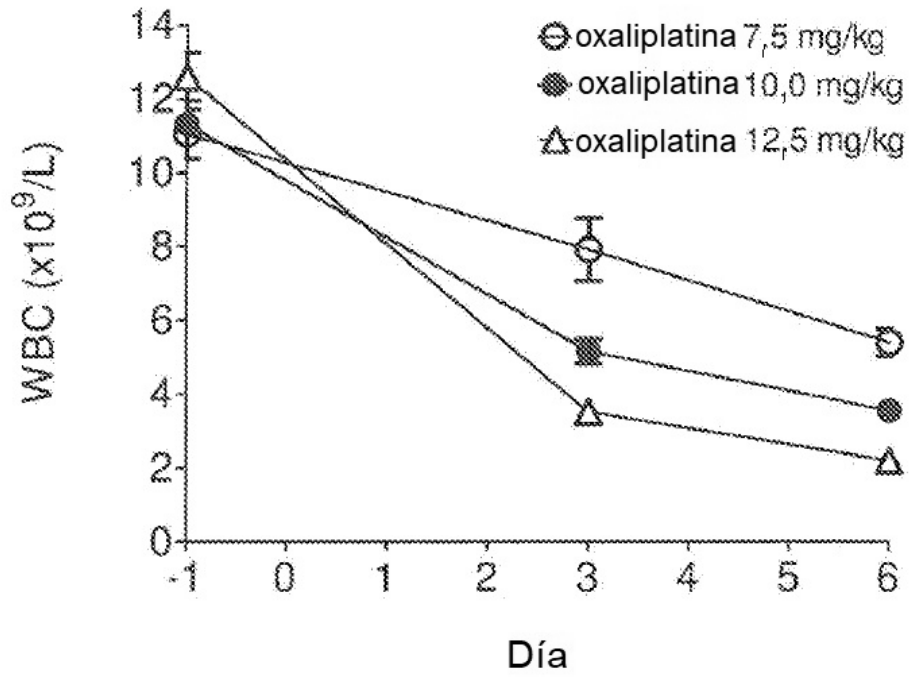


Fig. 7B

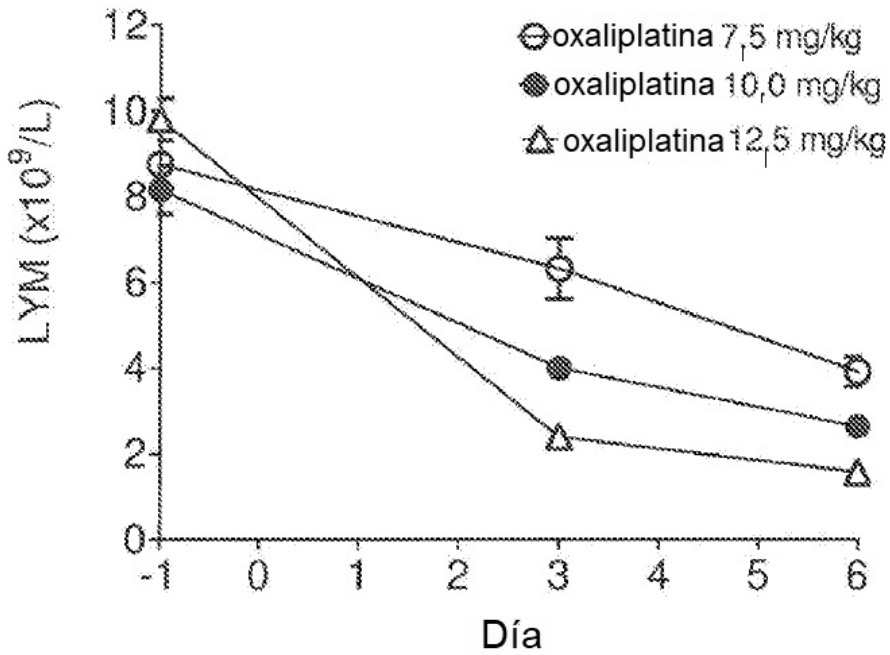


Fig. 7C

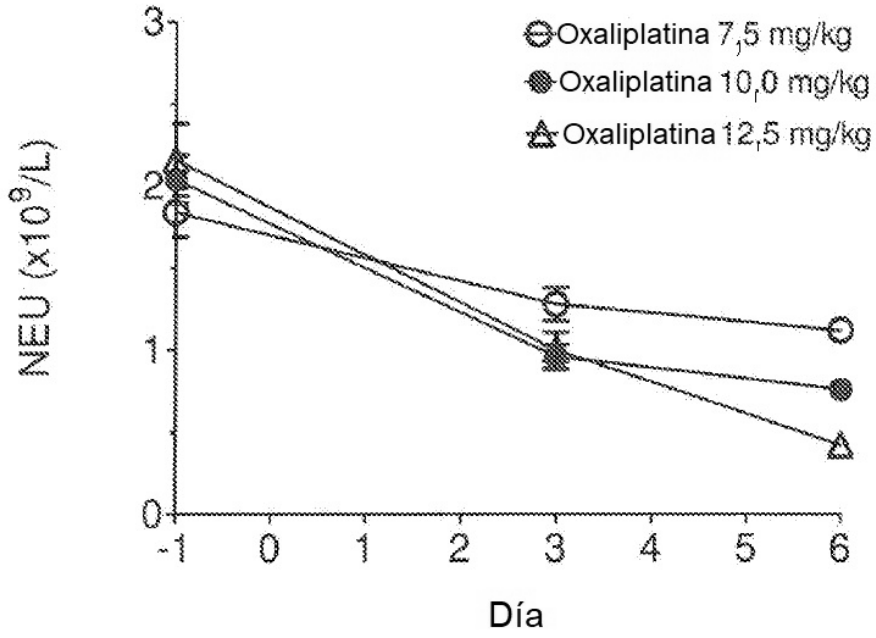


Fig. 7D

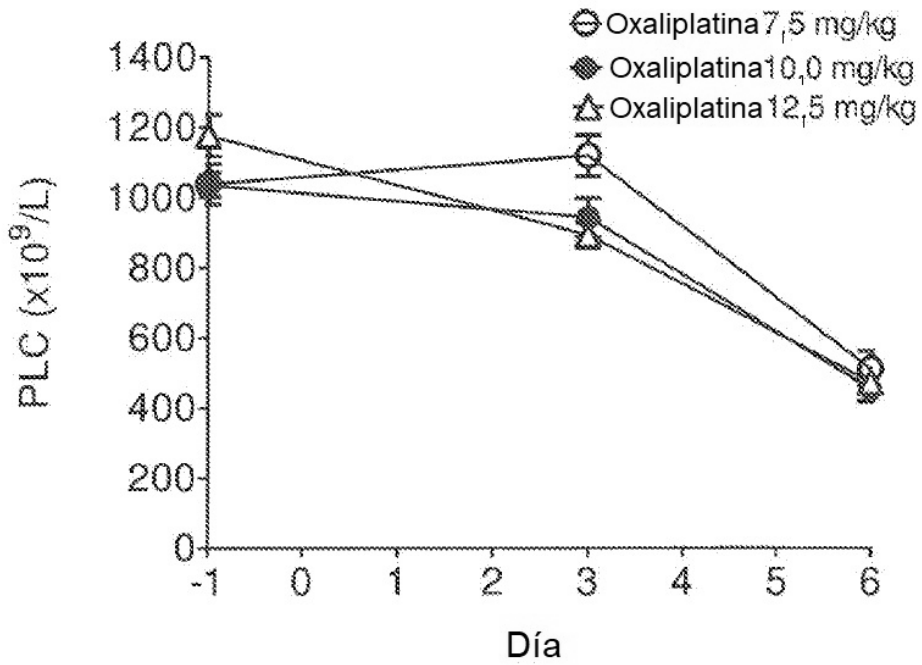


Fig. 8A

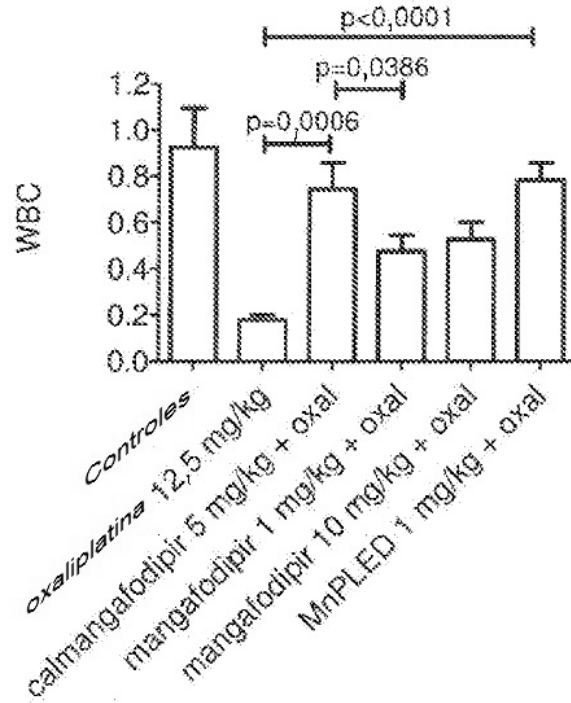


Fig. 8B

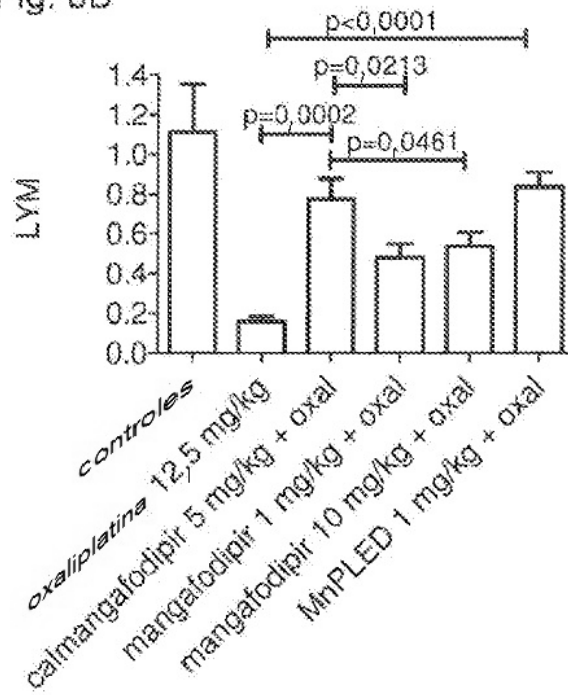


Fig. 8C

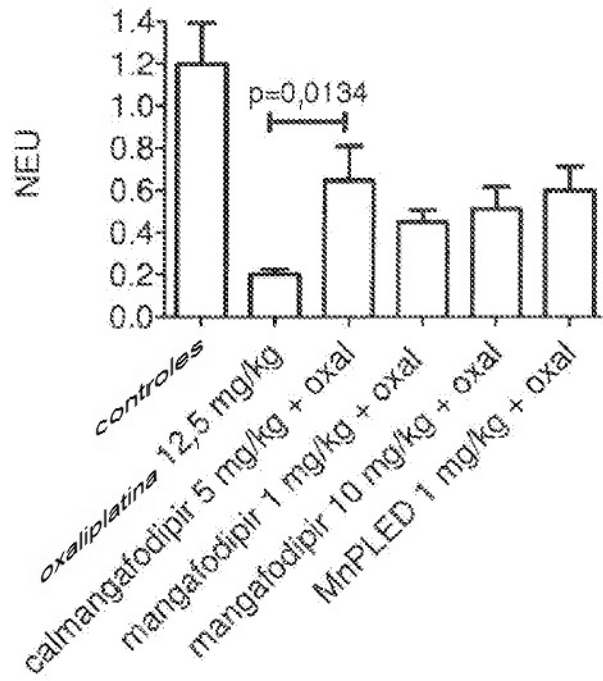


Fig. 8D

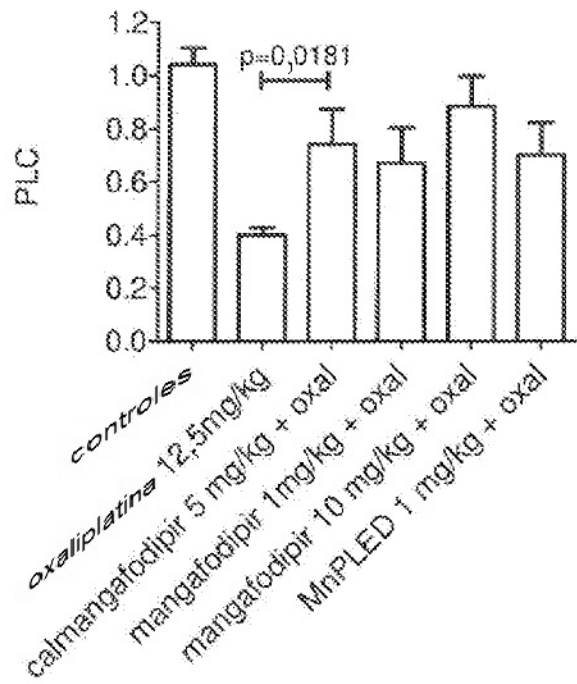


Fig. 9A

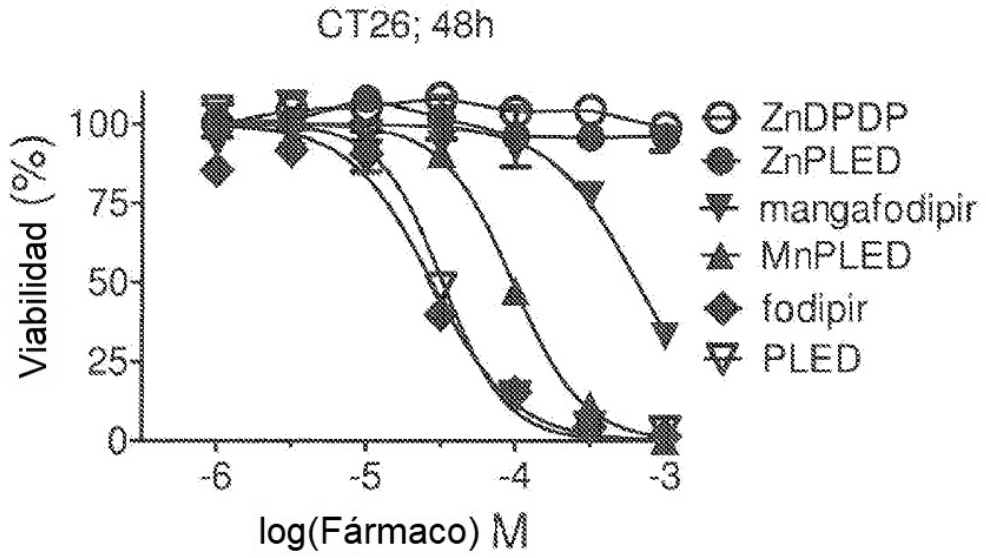


Fig. 9B

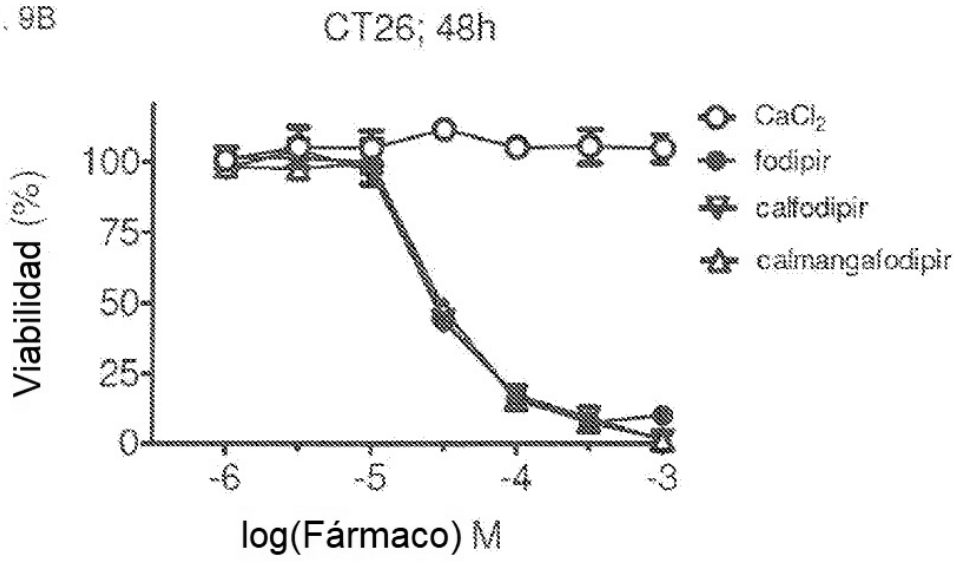


Fig. 10A

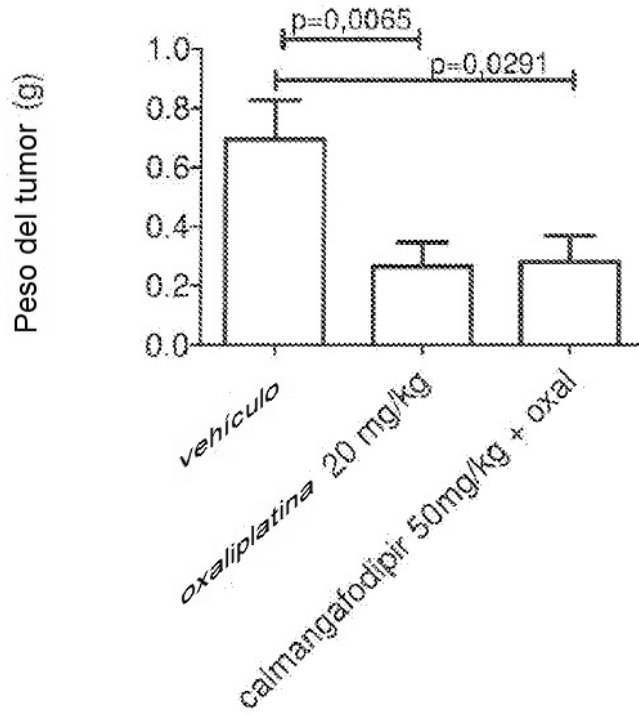


Fig. 10B

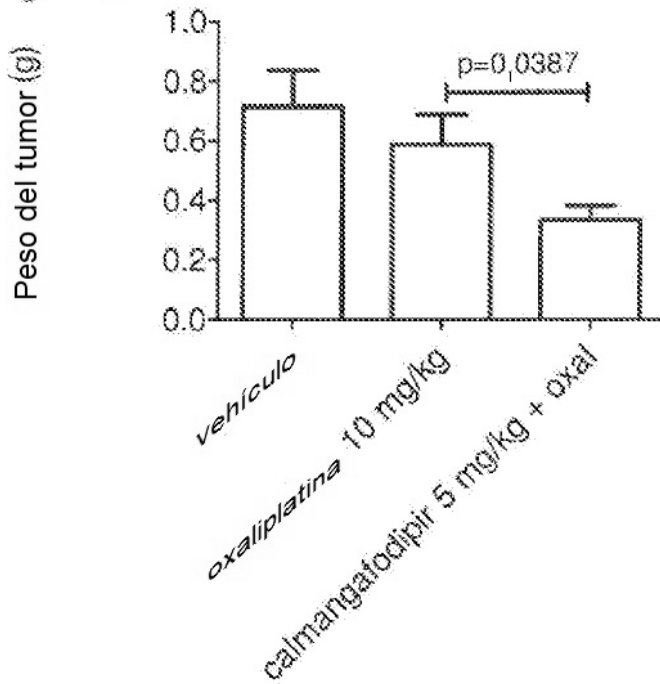


Fig. 11A

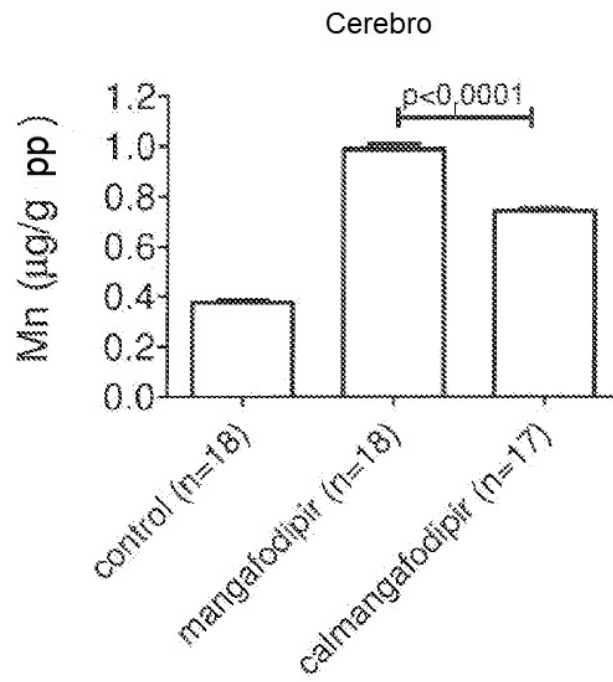


Fig. 11B

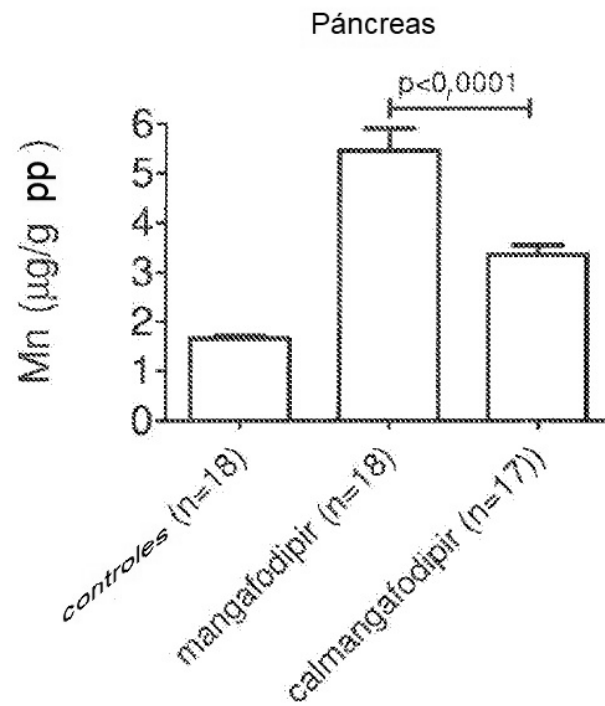


Fig. 11C

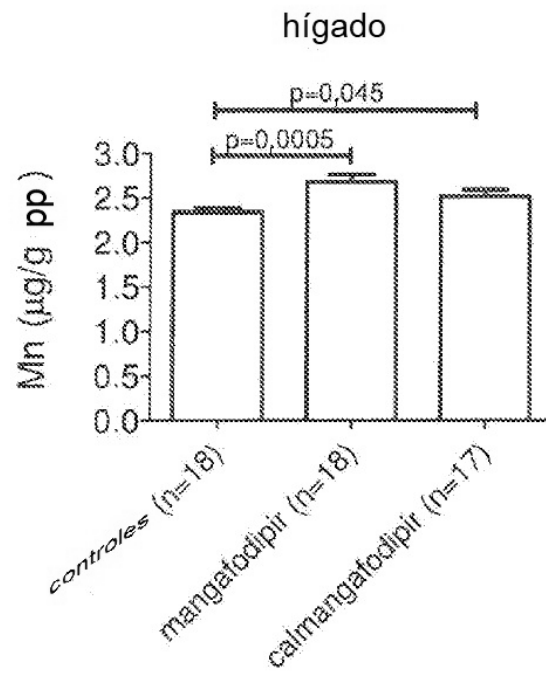


Fig. 12A

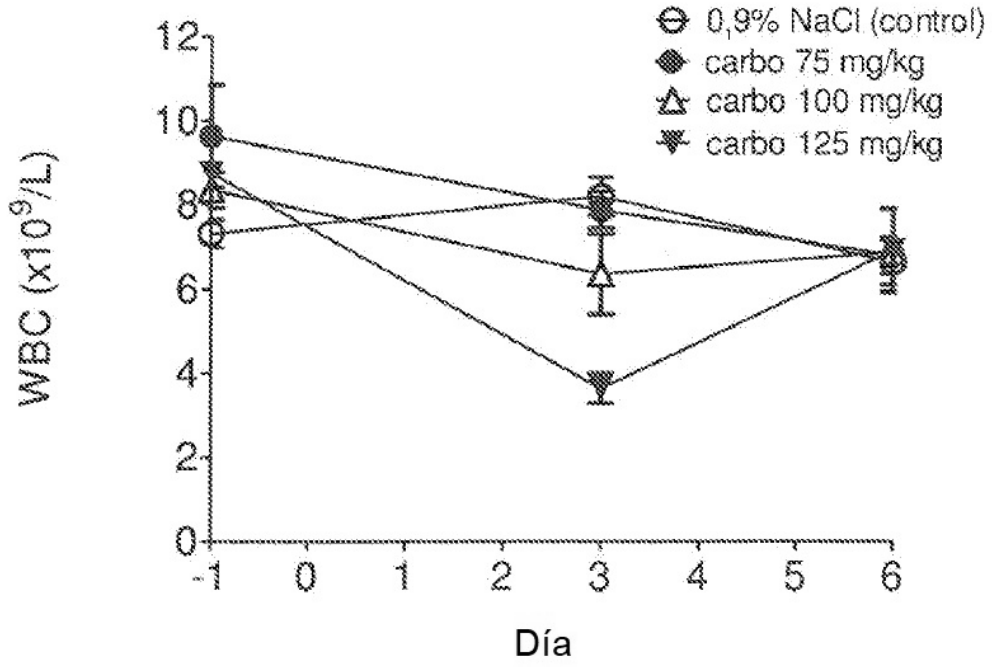


Fig. 12B

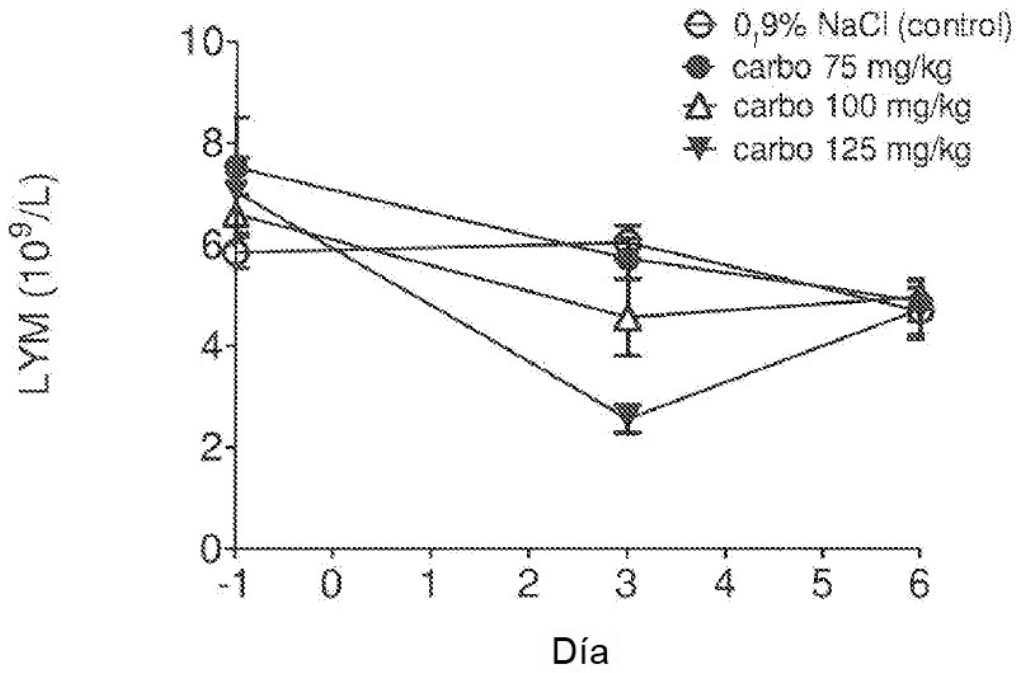


Fig. 12 C

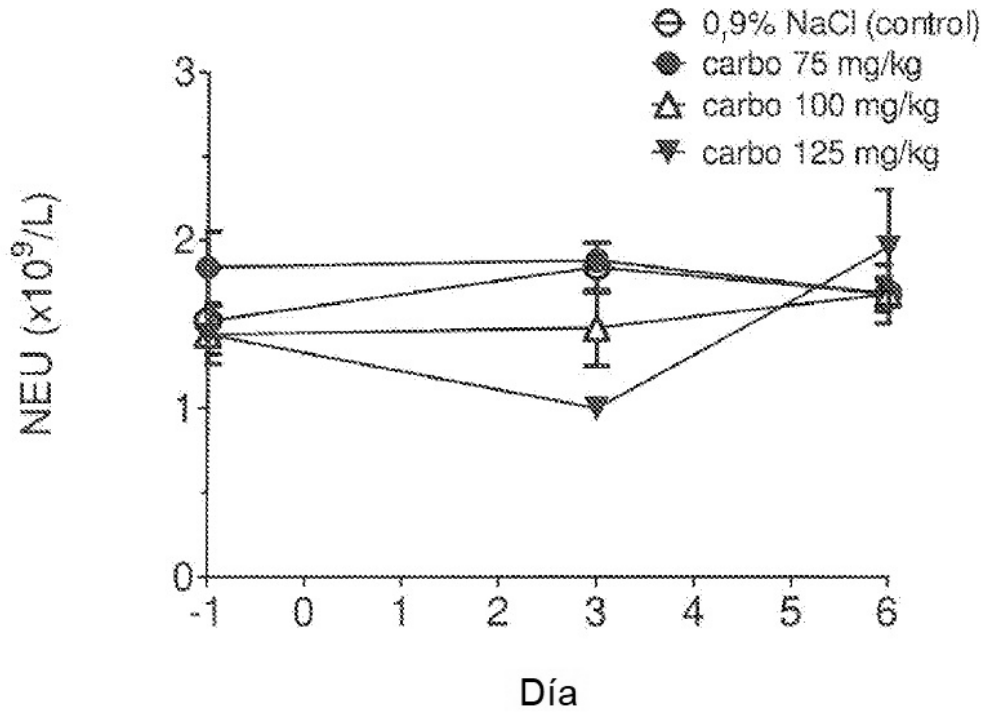


Fig. 12D

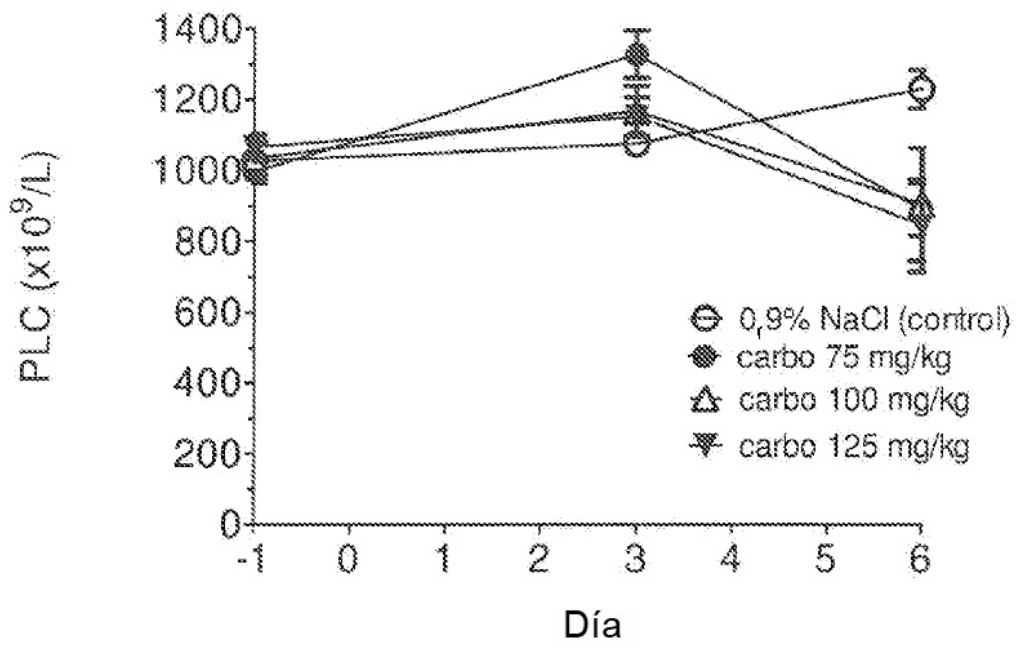


Fig. 13 A

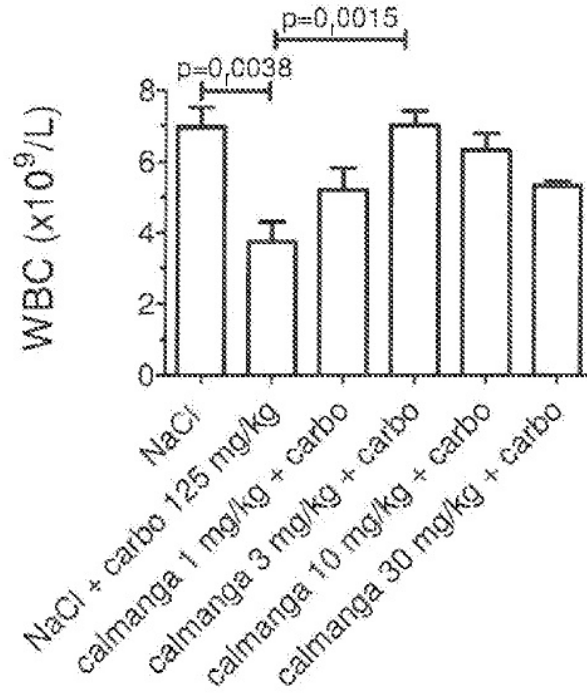


Fig. 13B

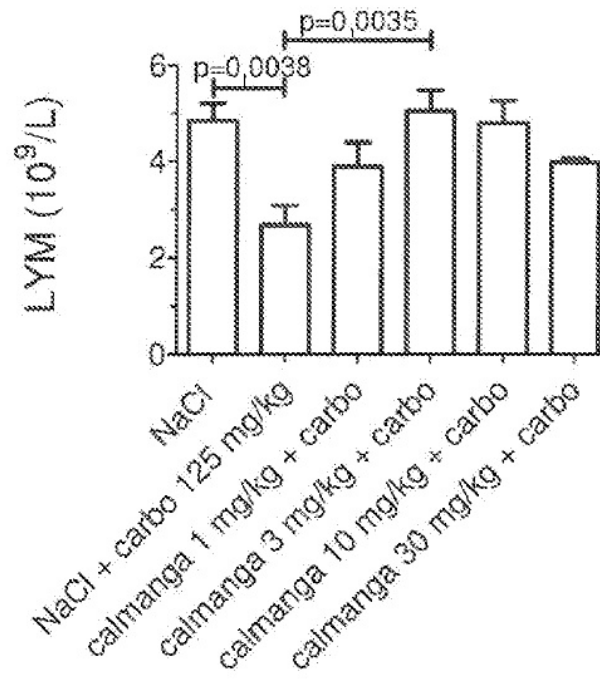


Fig. 13C

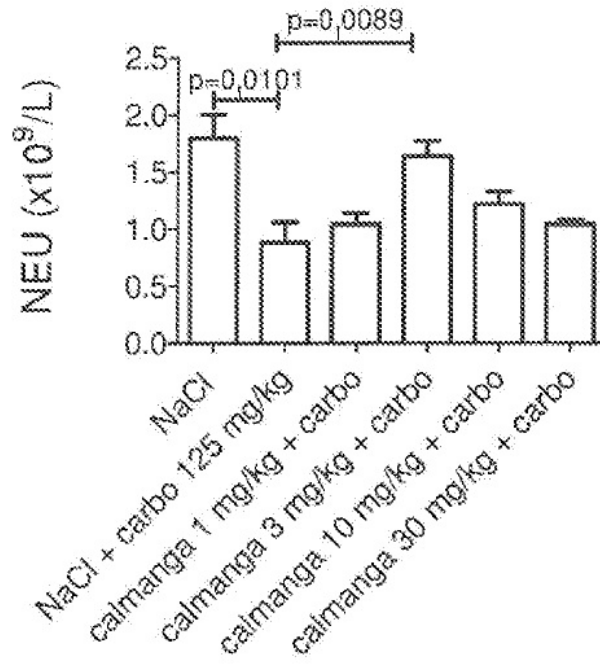


Fig. 13D

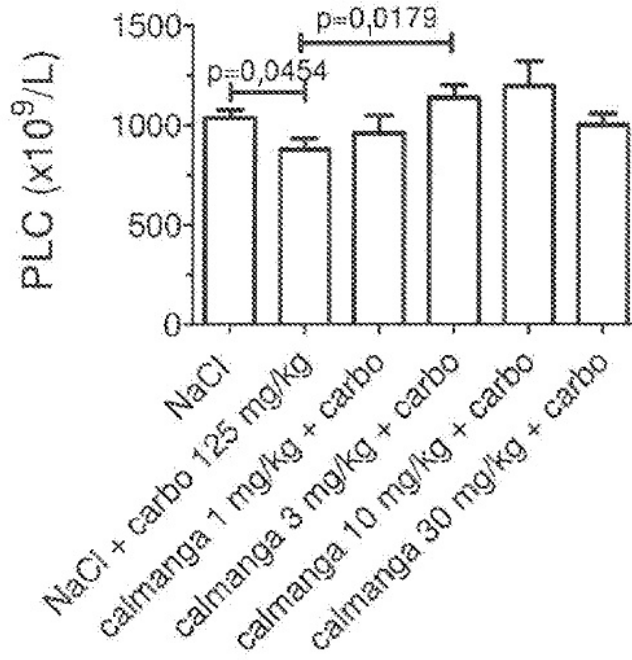


Fig. 14

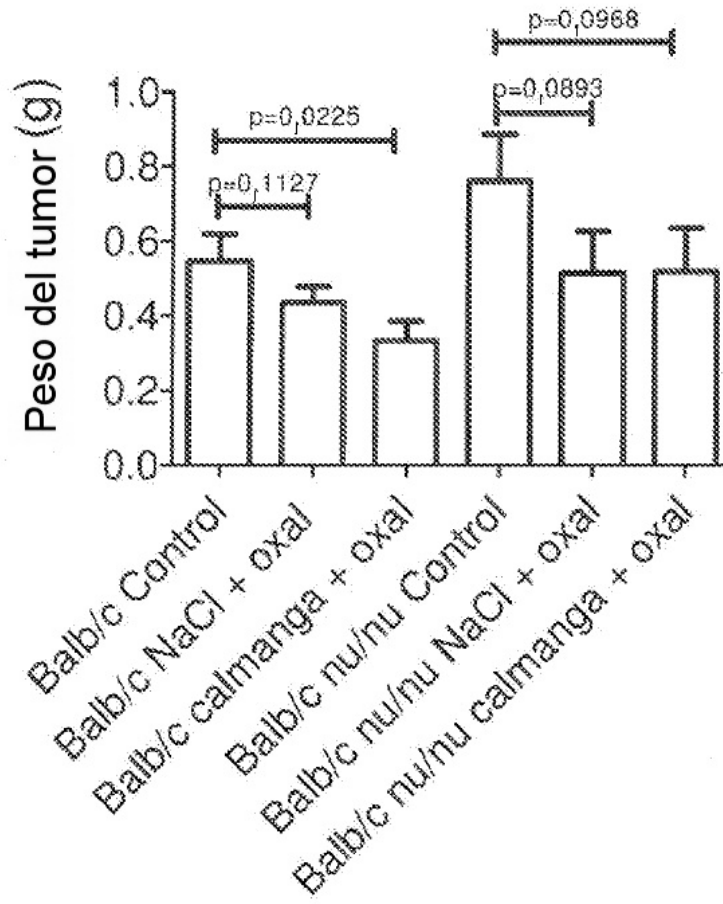


Fig. 15A

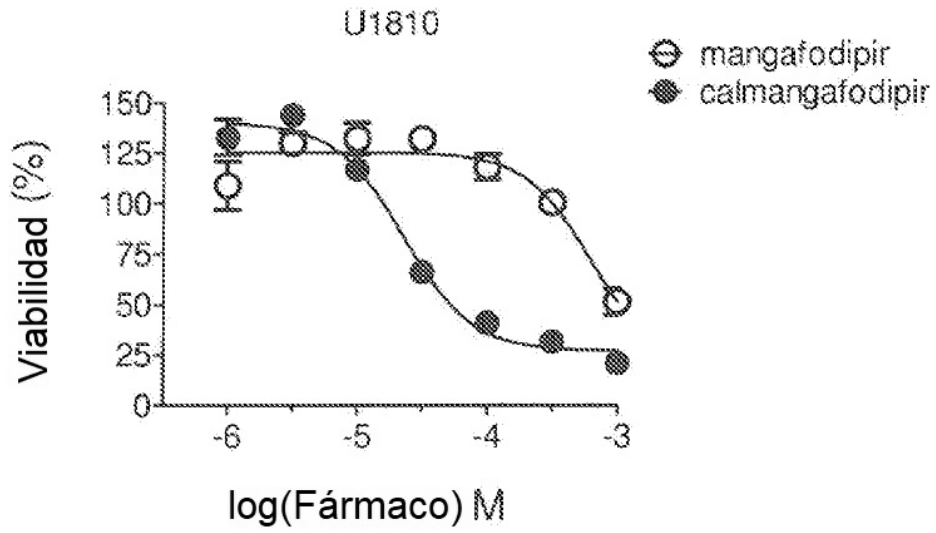


Fig. 15B

