



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 755**

51 Int. Cl.:

A61K 31/28 (2006.01)

A61K 31/30 (2006.01)

A61K 31/315 (2006.01)

A61K 31/295 (2006.01)

C07F 1/08 (2006.01)

C07F 3/06 (2006.01)

C07F 15/04 (2006.01)

C07F 15/06 (2006.01)

C07F 15/02 (2006.01)

C07F 13/00 (2006.01)

C07F 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02760216 .8**

86 Fecha de presentación : **02.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1401425**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **Agente antitumoral organometálico.**

30 Prioridad: **03.07.2001 UZ 0100552**
17.01.2002 DE 102 01 693

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **Valeriy Tatarsky**
Pappelallee 40
14469 Potsdam, DE

72 Inventor/es: **Tatarsky, Valeriy**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

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

Agente antitumoral organometálico.

5 La presente invención se refiere a la utilización de una composición farmacéutica conteniendo al menos un complejo de la fórmula general



10 en la cual

15 D representa una β -dicetona, M un átomo de metal, seleccionado del grupo consistente en Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn y Mo, y T representa una sustancia con al menos un grupo conteniendo N, O o S, en la cual M entra en interacción donador-aceptador de electrones con T y M presenta en el complejo un punto de coordinación libre, para la preparación de un agente antitumoral.

20 En Alemania enferman anualmente 300.000 personas de cáncer y aproximadamente uno de cada cinco alemanes muere de una enfermedad tumoral, cifra que indudablemente aumentará en los próximos años. Aproximadamente el 55% de todos los pacientes de cáncer se diagnostican con una enfermedad tumoral localmente limitada, mientras que en el restante 45% existe un tumor ya avanzado con metástasis. Muchas enfermedades de cáncer pueden curarse sin embargo con un diagnóstico y terapia precoz. Básicamente hay diferentes terapias para tratar el cáncer. El objetivo principal de cada terapia de cáncer es sin embargo siempre la destrucción máxima y eliminación de todas las células tumorales en caso de un daño a ser posible insignificante del tejido normal circundante del tumor.

25 Las enfermedades tumorales localmente limitadas son tratadas predominantemente por terapia local, como la cirugía y radioterapia. En la cirugía se elimina el tumor primario a ser posible completamente mediante una operación, mientras que se matan las células tumorales en el tumor primario con ayuda de radioterapia por medio de una radiación apropiada. El lugar de ataque de la radiación es el ADN que se halla en el núcleo de cada célula. La radiación ocasiona muchos daños en el ADN que no pueden ser reparados completamente por las enzimas propias de la célula. Como consecuencia la célula inicia la muerte celular programada. En otros pasos se disuelven las células dañadas y los fragmentos que surgen entonces son descompuestos por el sistema inmunológico del cuerpo.

30 Los tumores locales limitados pueden, sin embargo, extenderse a los sistemas linfáticos y corrientes sanguíneas. Una vez que la metástasis se ha extendido a otros órganos corporales, ya no bastan solo las medidas de terapia local para parar la extensión de la enfermedad tumoral. En estos casos, el tratamiento debe abarcar todo el cuerpo, lo que puede lograrse mediante una quimioterapia. En la quimioterapia se administran sustancias dirigidas, es decir citostáticos que inhiben el crecimiento de células tumorales y por consiguiente destruyen las células tumorales. A los citostáticos conocidos pertenecen los antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa, agentes alquilizantes y alcaloides vegetales. Aunque todos los citostáticos provocan una inhibición del crecimiento de las células tumorales, los principios de acción en los que se basan los diferentes citostáticos son completamente diferentes. Un espectro citostático a ser posible grande con diferentes principios de acción es de un significado decisivo para el tratamiento de las diferentes enfermedades tumorales, puesto que cada enfermedad tumoral es distinta y precisa un tipo de tratamiento específico. A pesar del gran número de citostáticos conocidos, hasta ahora aún no se pueden tratar todas las enfermedades tumorales. Por lo tanto sigue habiendo un interés continuo en el desarrollo de nuevos citostáticos.

45 Del documento DD-WP 121 525 se conoce la utilización de quelato de metal nitrogenado como prooxidantes para masas de cobertura oxidativas secantes. Son empleados sobre todo como pinturas y recubrimientos.

50 Tamura, Hiroshi *et al* (Chemistry Letters, Chemical Society of Japan, Tokyo, Japón, N°. 8,1997, páginas 711-712) describe el complejo de metal de sodio trans-Dinitrobis(2,4-pentandionato)cobalto(III) como complejo de metal antitumoral. Este complejo de cobalto es un electrólito consistente en un catión de sodio y el anión complejo, que es estabilizado por la interacción de la resonancia entre los electrones de grupos NO_2 y grupos de acetilacetato. La interacción con sustancias biológicas, p. ej. con ADN precisa una considerable activación, p. ej. por luz. No se representa un efecto selectivo sobre células tumorales.

55 La presente invención se basa en la tarea de encontrar complejos de metal para el tratamiento antitumoral y preparar con ellos citostáticos de alta eficacia antitumoral y un amplio espectro de acción frente a un gran número de enfermedades tumorales.

60 Esta tarea ha sido solucionada según la invención por la utilización de una composición farmacéutica conteniendo al menos un complejo de la fórmula general



65 para la preparación de un fármaco antitumoral, en la cual

D representa una β -dicetona,

M representa un átomo de metal, seleccionado del grupo consistente en Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn y Mo,

T representa una sustancia con al menos un grupo que contiene N, O o S, y

- 5 en la cual M entra en interacción donador-aceptador de electrones con T y M presenta en el complejo un punto de coordinación libre.

Los compuestos del complejo monocristalino organometálico poseen una geometría bipiramidal. El átomo de metal M del complejo se encuentra en el centro de la bipirámide tetragonal. Los dos ligandos de dos dientes β -dicetona D ocupan, respectivamente con sus dos átomos de oxígeno extremos que forman un complejo, las cuatro posiciones ecuatoriales de la bipirámide tetragonal. Una de las dos posiciones axiales de la bipirámide tetragonal está ocupada por la sustancia T, por lo cual el átomo N u O o S- del grupo que contiene N u O o S de la sustancia T sirve de átomo de formación del complejo y entra en interacción donador-aceptador de electrones con el átomo de metal M. En la otra posición axial de la bipirámide tetragonal se encuentra un punto de coordinación libre. El punto de coordinación libre en el átomo de metal M del complejo según la invención permite una interacción específica con otras moléculas, como p. ej. con oxígeno, óxidos nítricos o un sitio de enlace molecular sobre la superficie de células meta etc.

Se pudo mostrar en exámenes estructurales que el átomo de metal M del complejo difiere aproximadamente 0,2 Å de su posición ideal en la bipirámide tetragonal en dirección a la sustancia T. Por ello la interacción aceptador-donador de electrones entre el átomo de metal M y la sustancia T adopta el carácter de un ligamiento doble. Además podía mostrarse que dos de las cuatro posiciones ecuatoriales están algo desplazadas en dirección al átomo de metal, mientras que las otras dos posiciones ecuatoriales están dispuestas algo distanciadas del átomo de metal.

La β -dicetona D del complejo se caracteriza por su estructura tridimensional (i) que permite una formación óptima de quelato con el átomo de metal M en sus puntos de coordinación ecuatoriales y (ii) no perturba la interacción donador-aceptador de electrones entre la sustancia T y el átomo de metal M. Preferiblemente la β -dicetona sin embargo será seleccionada entre el grupo consistente en acetilacetona y sus análogos superiores de alquilo y dibenzoilmetano.

El átomo de metal M del complejo es seleccionado entre el grupo consistente en Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn y Mo. Además el átomo de metal M se caracteriza por el hecho de que permite una disposición bipiramidal tetragonal de los ligandos D y T, por lo cual permanece libre un punto de coordinación axial del átomo de metal. Los átomos de metal M especialmente preferidos son Cu y Mn.

La sustancia T del complejo presenta al menos un grupo conteniendo N, O o S, que inicia por medio del átomo N u O o S una interacción donador-aceptador de electrones con el átomo de metal M en uno de los puntos de coordinación axiales de M. En este caso el átomo N u O o S de la sustancia T actúa como donador de electrones y le proporciona al átomo de metal M, como aceptor de electrones, un par de electrones libres. Preferiblemente la sustancia T presenta al menos un grupo conteniendo NH_2 , NH, N, O o S. En una forma de realización preferida de la invención la sustancia T presenta ya una eficacia antitumoral y es seleccionado del grupo consistente en 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo, 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico (Leacadin), 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina (Meiphalan), 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina; 2-metil-(3-dimetil-amino-1-propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina.

En una forma de realización preferida de la invención, el complejo cobre como átomo de metal central M comprende acetilacetona o un análogo de alquilo superior del mismo como β -dicetona D y una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo, 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico, 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina, 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina, 2-metil-(3-dimetil-amino-1 propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina como sustancia T.

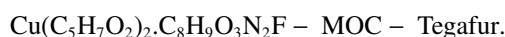
En otra forma de realización preferida de la invención el complejo Mn como átomo de metal central M comprende acetilacetona o su análogo de alquilo superior como β -dicetona D y una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 2-2'-bipiridina, 2-(3-piridil)-piperidina, amida de ácido 1,2-imidopropílico y 4-[Bis-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina como sustancia T.

Se acaba de manifestar sorprendentemente que el complejo es adecuado para la preparación de citostáticos con una excelente eficacia antitumoral. En el caso de que la sustancia T fuera ya un agente antitumoral en una forma de realización preferida, se constata que el complejo muestra una eficacia antitumoral muy elevada en comparación con la sustancia T contenida en el mismo. Además el complejo presenta características inmunomoduladores y antiproliferativas así como una eficacia anti-angiogénica y posee una estabilidad hidrolítica muy elevada con respecto a los fármacos antitumorales convencionales, por lo cual es aplicable en amplios campos antitumorales. Además podía constatar que el empleo del complejo no provoca resistencia alguna a productos farmacéuticos y bajo determinadas condiciones es capaz de dar lugar a una apoptosis y angiogénesis en células cancerígenas.

Especialmente se prefiere dentro del marco de la invención el complejo de cobre o manganeso, acetilacetona y 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina (Meiphalan), en lo sucesivo denominado MOC-Meiphalan. Los exámenes efectuados muestran que esta sustancia se enriquece en su mayoría en el tejido tumoral, oxida de manera catalítica fragmentos de receptores de proteína sobre la superficie de membranas y previene con ello los procesos metastásicos. La sustancia utilizada dispone de efectos moduladores inmunológicos por regulación de la proporción $T_{\text{help}}/T_{\text{supr}}$ e influye sobre la formación de anticuerpos específicos. La sustancia es químicamente estable y tiene un efecto prolongado. Resulta significativo el hecho de que la sustancia supera la barrera sanguínea-cerebral y por ello permite el tratamiento de tumores cerebrales. Además no se produce resistencia alguna a los productos farmacéuticos. Los exámenes realizados en adenocarcinoma, sarcoma, células de leucemia, melanoma y carcinoma renal (RENCA) proporcionaron una eficacia muy superior en comparación con Melphalan.

En cuanto al mecanismo de acción de esta sustancia especialmente preferida se supone que puede regular el contenido del monóxido de nitrógeno y las concentraciones de iones Ca en las células tumorales. Por medio de la “aspiración” de los iones Ca^{2+} de las células tumorales se inhibe el proceso de glicolisis y se perjudica por ello la función de sus mitocondrios. En la recombinación de las formas activas del oxígeno surgen condiciones por el MOC-Melphalan, que dan lugar a la destrucción de la células tumorales con ayuda de los macrófagos - que están cargados con NO. Además la sustancia actúa sobre la expresión de genes penetrando en el núcleo de las células tumorales, destruyendo el núcleo celular e inhibiendo la actividad de proliferación. Finalmente se constató que induce también una formación de cápsula de doble capa del tumor, donde la capa interna consiste en células similares a la grasa. A causa de ello se suprime adicionalmente el suministro de nutrientes del tumor y se permite eventualmente una intervención quirúrgica acertada.

Otra sustancia especialmente preferida de los complejos utilizados según la invención es el complejo de cobre-acetilacetato con Tegafur:



Las desventajas decisivas de Tegafur[5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo] son la corta acción, que sólo conduce a una opresión de la síntesis de ácidos nucleicos y la mala hidrosolubilidad. A pesar de su baja toxicidad (LD_{50} asciende a 650 mg/kg) el preparado exhibe un fuerte efecto sobre la formación de sangre y provoca leucemia, trombocitopenia y anemia. Se enriquece en altas concentraciones en el tejido cerebral y provoca diarrea y estomatitis. El preparado Tegafur no debe aplicarse en caso de enfermedades renales y hepáticas (en estado terminal), en caso de hemorragias y en caso de un contenido en leucocitos y trombocitos inferior a $3 \cdot 10^9/\text{l}$. La aplicación de Tegafur se limita al tratamiento de tumores del intestino delgado y duodeno, en recidivas de tumores de estómago, así como en tumores de mama y carcinoma de ovarios.

La combinación de la molécula Tegafur con la molécula de cobre acetilacetato da lugar a un compuesto químico que no presenta estas numerosas desventajas. El complejo organometálico MOC-Tegafur dispone de un amplio espectro de características de acción antitumoral, antimetastásico e inmunorregulador. Es una sustancia hidrosoluble con efecto prolongador y no provoca resistencia alguna a fármacos en el organismo. Otra ventaja decisiva es la dosificación terapéutica del preparado MOC-Tegafur (dosificación de 5 mg/kg de peso corporal). Con Tegafur exclusivamente ésta es solamente de 2,1 mg. También MOC-Leacadin ($\text{Cu}/\text{Mn}(\text{acac})_2$ -Leacadin) muestra los efectos con MOC-Melphalan descritos con más detalle como “aspiración” de los iones Ca^{2+} , destrucción de los mitocondrios en células tumorales etc.

La presente invención se refiere por consiguiente la utilización de una composición farmacéutica, comprendiendo al menos un complejo para la fabricación de un agente antitumoral. La composición farmacéutica puede contener un complejo único o una combinación de varios complejos como agente activador. Además la composición farmacéutica puede contener en su caso aditivos farmacéuticos convencionales suficientemente conocidos para el experto, utilizados p. ej. como vehículos fisiológicamente tolerables, diluentes y agentes auxiliares.

La composición farmacéutica puede existir en una forma administrable por vía tópica, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o transdérmica y puede prepararse con ayuda de procedimientos convencionales bien conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente la composición farmacéutica se prepara en forma de tabletas o como inyección o infusión intravenosa.

La composición farmacéutica es utilizada para el tratamiento de tumores. La denominación “tumor”, según se emplea aquí, se refiere a cualquier aumento local del volumen tisular así como células en las que ya no funciona la regulación del crecimiento normal y se produce la división celular descontrolada. Es decir, en el sentido más amplio, cualquier hinchazón localizada por edema, inflamación aguda y crónica, aumento aneurismático y tumefacción de un órgano a causa de una inflamación, así como en el sentido más estricto, una renovación tisular (p. ej. tumor, blastoma, neoplasia) en forma de crecimiento excesivo espontáneo, desinhibido en varios grados, autónomo e irreversible del tejido propio del cuerpo, que está unido generalmente a una pérdida diferentemente pronunciada de funciones celulares y tisulares específicas. Ejemplos de enfermedades tumorales que pueden ser tratadas con ayuda de la composición farmacéutica, abarcan el cáncer intestinal, tumor cerebral, tumor ocular, carcinoma pancreático,

carcinoma de vejiga urinaria, cáncer pulmonar, cáncer de mama, tumor ovárico, cáncer de útero, tumor óseo, carcinoma de vesícula y del conducto biliar, tumor de cabeza y cuello, carcinoma epidermoide, cáncer de testículos, tumor renal, tumor de células germinales, cáncer hepático, leucemia, linfoma maligno, tumor de nervios, neuroplastoma, cáncer de próstata, tumor de partes blandas, cáncer de esófago así como carcinomas donde se desconoce el tumor primario.

La denominación "tratamiento de tumores", según se emplea aquí, se refiere a al menos una de las siguientes características: alivio de los síntomas inherentes a la enfermedad tumoral, reducción de la extensión de la enfermedad tumoral (p. ej. reducción del crecimiento tumoral), estabilización del estado de la enfermedad tumoral (p. ej. inhibición del crecimiento tumoral), impedimento de mayor distensión de la enfermedad tumoral (p. ej. una metastasización), impedimento de la presencia o reaparición de una enfermedad tumoral, moderación o retardo del desarrollo de la enfermedad tumoral (p. ej. reducción del crecimiento tumoral) o mejora del estado de la enfermedad tumoral (p. ej. disminución del tumor).

Preferiblemente la composición farmacéutica se administra a un paciente con una enfermedad tumoral, en una cantidad que es suficiente para lograr un tratamiento del tumor correspondiente. La dosis a administrar de la composición farmacéutica depende en este caso de diferentes factores, como p. ej. la elección del complejo (especificidad, eficacia, etc.), del tipo de administración (tableta, inyección, infusión, etc.), del tipo y de la extensión de la enfermedad tumoral y de la edad, del peso y estado general del paciente y puede ser determinado sin más por un experto en el campo de la enfermedad tumoral tomando en consideración los factores arriba citados. No obstante los complejos son preferiblemente administrados en el orden de 1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del paciente hasta 5 mg/kg de peso corporal del paciente, preferiblemente de 1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del paciente hasta 0,5 mg/kg de peso corporal del paciente y especialmente preferido de 10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del paciente hasta 0,1 mg/kg de peso corporal del paciente.

La administración de la composición farmacéutica se efectúa de manera tópica, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Preferiblemente se administra la composición farmacéutica en forma de pastillas o como inyección intravenosa o infusión. En casos individuales puede realizarse también una inyección apropiada de la composición farmacéutica en cavidades corporales o a través de un catéter en el vaso sanguíneo de la región tumoral o del órgano, en el cual está el tumor.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Cu y T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4-dihidroxi-5-fluoro-pirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo (Tegafur), 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico, 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina, 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina, 2-metil-(3-dimetilamino-1-propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina.

Además se refiere a una composición farmacéutica de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Mn y T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 2-2'-bipiridina, 2-(3-piridil)-piperidina, amida de ácido 1,2-imidopropílico y 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina.

Los siguientes ejemplos están destinados explicar la invención con más detalle y en combinación con las ilustraciones del dibujo adjunto.

En los dibujos representan:

Figura 1: Ratón de línea Black con melanoma B-16 después del tratamiento con MOC-Melphalan, peso del tumor 0,3 g

Figura 2: Ratón de línea Black con melanoma B-16, grupo de control, peso del tumor 3,15 g

Figura 3: Electroforesis DNS de ratones de línea Black con melanoma B-16

2 MOC-Melphalan

ES 2 272 755 T3

4 Grupo de control

1,3 Sustancias de referencia

5 Figura 4: El efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre la formación de la cápsula del tumor melanoma 8-16 (ampliado 100 veces)

1 Células grasas del parénquima

10 2 células similares a las epiteliales

3 vaso

4 Tejido tumoral

15 Figura 5: El tumor melanoma B-16 en el grupo de control (ampliado 100 veces)

1 Paquetes de fibra muscular

20 2 Vaso

Figura 6: muestra el efecto preventivo de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor AKATON: masa y volumen tumoral tras 4 aplicaciones intravenosas de MOC-Melphalan antes de una implantación de un tumor

25 Figura 7: muestra un electroferograma del ADN de células del sarcoma S-180 bajo la influencia de la sustancia MOC-Melphalan en una dosificación de 0,05 mg/10⁶ células

2 MOC-Melphalan, tiempo de incubación 40 minutos

30 5 MOC-Melphalan, tiempo de incubación 60 minutos

7 Grupo de control

1, 3, 4, 6 Sustancias de referencia

35 Figura 8: La formación de la envoltura de doble capa entre el tejido maligno y sano por el efecto de la sustancia Tegafur

Figura 9: La formación de cavidades en las células bajo la influencia de la sustancia Tegafur

40 Figura 10: El efecto de la sustancia Tegafur sobre la formación de la cápsula del tumor melanoma B-16 (ampliación 40 x 40):

1 Células similares a las epiteliales con signo de degradación

45 2 Células de las fibras musculares

3 Tejido tumoral

50 Figura 11: El efecto de la sustancia MOC Melphalan sobre la formación de la cápsula del tumor melanoma B-16 (ampliación: 10 X 10):

1 Células grasas del parénquima

55 2 Células similares a las epiteliales

3 Vaso

4 Tejido tumoral

60 Figura 12: El tumor melanoma B-16 en animales del grupo de control (ampliación 10 x 10)

1 Grupo tisular de los músculos

65 2 Vasos

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Preparación de un complejo según la invención en el ejemplo de $(C_5H_7O_2)_2Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$*

a) *Síntesis de $Cu(C_5H_7O_2)_2$*

10 A una solución de 20,4 g de $CuCl \times 2H_2O$ en 125 ml de agua se añadieron 25 ml de $C_5H_9O_2$ recién destilado, disuelto en 50 ml de metanol, bajo agitación continua. Entonces se añadió una solución de 20 g de acetato de sodio en 75 ml de agua a esta mezcla. Se recalentó la mezcla obtenida de esta manera en un baño de agua hasta la ebullición y después se enfrió a temperatura ambiente. El $Cu(C_5H_7O_2)_2$ formado fue cristalizado a partir de metanol. Unas horas después de la cristalización completa se filtraron los cristales azules de $Cu(C_5H_7O_2)_2$, se lavaron con agua y se secaron al vacío a una temperatura de 80°C y una presión de 6 mm Hg.

15 b) *Síntesis del complejo $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$*

20 A 0,01 Mol $Cu(C_5H_7O_2)_2$ en 20 ml de disolvente se añadieron bajo agitación continua 20 ml de una solución de 0,02 mol a partir de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ 4-[bis(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina).

25 Variante 1: Se cerró el recipiente de cristal con la solución obtenida de esta manera herméticamente con un tapón de polietileno y se almacenó durante unos días para la cristalización lenta en un lugar oscuro. Pasados unos días se separaron los cristales verdes de $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ y se limpiaron varias veces con un solvente de moléculas físicamente adherentes de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$. Luego se secaron los cristales de $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ al aire.

30 Variante 2: Se evaporó solución obtenida de esta manera dentro de un evaporador giratorio, con lo cual el solvente fue aspirado bajo condiciones de vacío (6 mm Hg) a una temperatura de 40°C. Los cristales coloreados en verde $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ fueron retirados del pistón de cristal, limpiados con solvente y secados al aire.

Ejemplo 2

Estabilidad hidrolítica de los complejos según la invención en el ejemplo de $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

35 I. *Estabilidad hidrolítica en agua o suero fisiológico*

40 Se dispersaron 0,6 g de $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ con ayuda de un generador de ultrasonido (frecuencia: 15 kHz, 10 minutos) en 100 ml de agua o suero fisiológico. La solución obtenida de esta manera fue estable durante un periodo de 30 días a 20°C y no mostró en este período hidrólisis alguna.

II. *Estabilidad hidrolítica en aceite de oliva*

45 Se dispersaron 0,6 g $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ con ayuda de un generador de ultrasonido (frecuencia: 15 kHz, 10 minutos) en 100 ml de aceite de oliva al 100%. La solución obtenida de esta manera fue estable durante un período de más de 2 años a 20°C y no manifestó hidrólisis alguna.

III. *Estabilidad hidrolítica en ácido linoleico o ácido linolénico*

50 Se dispersaron 0,1 g $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ con ayuda de un generador de ultrasonido (frecuencia: 15 kHz, 10 minutos) en 100 ml de ácido linoleico o ácido linolénico. La solución obtenida de esta manera presentó un color verde claro y fue estable al aire a 20°C durante un período de 1 año.

Ejemplo 3

55 *Eficacia antitumoral de los complejos según la invención*

60 1) A 10 ratones de la línea Balb, los cuales tenían un adenocarcinoma, se administró $Cu(acac)_2M$ por vía intraabdominal en una dosis de 5 mg/kg en 0,3 ml de suero fisiológico. Para el control se destinaron otros 10 ratones del mismo tipo con el mismo tumor sin tratamiento. En los ratones experimentales se constató un peso de tumor medio de 3,60 g, en los ratones tratados el peso medio del tumor ascendía a 0,3 g. En la siguiente tabla 1 se indican los resultados en los ratones tratados según la invención con indicación del peso y tamaño del tumor. En comparación con la serie de control se obtiene una inhibición del 91,9% del tumor.

65

ES 2 272 755 T3

TABLA 1

Ratones	Peso del tumor en g	Tamaño del tumor cm
1	0	0
2	0	0
3	0,35	0,2 x 0,2 x 0,2
4	1,13	1,4 x 0,7 x 0,6
5	0,8	0,8 x 0,8 x 0,5
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0,49	0,3 x 0,2 x 0,2
10	muerto	-

La siguiente tabla 2 muestra los resultados de la serie de control de ratones no tratados igualmente con indicación del peso y tamaño del tumor. El peso medio del tumor ascendía a 3,60 g.

TABLA 2

Ratones	Peso del tumor en g	Tamaño del tumor cm
1	1,61	1,6 x 1,0 x 0,7
2	1,69	2,5 x 2,0 x 0,8
3	6,48	3,6 x 2,5 x 1,6
4	2,93	3,0 x 1,0 x 0,7
5	3,75	3,5 x 1,5 x 0,7
6	2,56	3,1 x 1,0 x 1,7
7	3,69	3,0 x 2,0 x 1,0
8	5,22	3,0 x 2,5 x 1,0
9	4,85	3,0 x 2,0 x 1,0
10	3,23	2,6 x 1,5 x 1,0

2. Actividad antitumoral en un adenocarcinoma y administración intravenosa (cuatro veces en suero fisiológico)

La siguiente tabla 3 muestra los resultados.

TABLA 3

Preparados	Dosis del preparado	Número de animales	Masa del tumor g	% de inhibición
(Cu(acaC)2 M	5 mg/kg	6	0,9	80
Control	-	6	4,4	

3. Actividad antitumoral en el adenocarcinoma, que fue transplantado después de una administración del preparado

TABLA 4

Preparados	Dosis del preparado	Número de animales	Masa del tumor g	% de inhibición	Extensión del tumor en cm ³	% de inhibición
Cu(acac) ₂ M	5 mg/kg	6	0,91	80	1,38	82,5
Control		6	4,46		7,9	

El agente según la invención fue administrado por vía intravenosa en suero fisiológico por cada 0,3 ml en la dosificación indicada en la tabla durante 4 días seguidos. Luego se implantó el adenocarcinoma a los ratones Balb. 21 días después del trasplante del tumor se mataron los animales y se registró el peso y tamaño del tumor. En el curso del ensayo, los animales no recibieron otros fármacos y se mantuvieron con la ración de pienso normal. Los resultados muestran que el agente activador según la invención se puede acumular en el organismo y dispone de un efecto prolongado.

4. Actividad antitumoral en el sarcoma C-180

En la siguiente tabla 5 se representan los resultados de las series de experimentación, en las que se administra el agente activador indicado por vía intraperitoneal en suero fisiológico en la dosificación indicada.

TABLA 5

Preparado	Dosis del preparado	Número de animales	Masa del tumor g	% de inhibición
Cu(acac) ₂ M	5 mg/kg	6	Ningún tumor	100
Melphalan	5 mg/kg	10	2,4 ± 1,1	49
Control		10	2,8	

5. Eficacia en la leucemia

Se analizó la eficacia terapéutica en cepas tumorales de leucemia L-1210, P-388 y especialmente en cepas P-388 sobre la resistencia a medicamentos. La vida de los animales se fijó en este caso en 60 días. Los tumores resistentes a medicamentos se obtuvieron por trasplantes sucesivos de leucemia P-388 con células ascíticas, que fueron tomadas de ratones, que fueron tratados con rubomicina (cepa P388/ph), vinkristina (P388/vcr) y zisplastina (P388/cPt).

La resistencia respecto a los citados preparados se manifestó en la octava, sexta y cuarta generación. Los exámenes dieron que las cepas P388/ph y P388/vcr disponían de un fenotipo y un genotipo con resistencia a medicamentos multifactorial.

Las sucesivas tablas 6,7 y 8 muestran los resultados,

5a. Leucemia L-1210

Inóculo: 10⁶ células en 0,2 ml de suero fisiológico. Ratones: BDF₁, hembra 19-21 g. Los preparados fueron administrados por vía intraabdominal.

Tras el trasplante del tumor se administró a los animales la sustancia MOC-Mclphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en 0,3 ml de una solución Twin-80 de 10% 80 en los días 1 a 7. El efecto de la sustancia se calificó por medio de la vida y la variación del peso de los animales (tabla 9). El tiempo de observación era de 60 días.

TABLA 6

Preparado	Dosis única mg/kg	Régimen de administración días	Número de animales en el experimento	% de animales supervivientes	Variación del peso g	Vida de los animales en el experimento (días)
Cu(acac) ₂ M	5	1-7	6	100	-1,5	> 60
Control	5	1-7	6	0	+0,7	8,5

5b. Leucemia P-388

Inóculo: 10^6 células en 0,2 ml de suero fisiológico. Ratones: BDF₁. Hembra 19-21 g

- 5 Después del trasplante del tumor se administró a los animales la sustancia MOC-Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en 0,3 ml de solución doble 80 al 10% durante los días 1 a 7. El efecto de la sustancia se calificó por la vida y la variación del peso de los animales (tabla 7).

Tabla 7

Preparado	Dosis única mg/kg	Régimen de administración días	Número de animales en el experimento	Número de animales que sobrevivieron hasta 60 días	Promedio de vida, días	Aumento de la vida media %	Variación del peso en g
Cufacac/2M	5	1-7	6	0	16,8	56,0	-2,5
Control			6	0	10,8	-	+1,6

ES 2 272 755 T3

Los preparados fueron administrados por vía intraabdominal. Se disolvió $\text{Cu}(\text{acac})_2\text{M}$ en 10% de Twin-80.

TABLA 8

Cepa	Preparado	Dosis mg/kg	Régimen (días después del transplante)	ILS %*	Número de animales/número de animales supervivientes en el grupo
P-388* o.S. (cepa inicial)	Cu(acac) ₂ M	5	1-7	56	-
		10	1,5,9	419	5/6
		10	1,7	465	4/6
		15	1,7	447	5/6
Tumores resistentes a medicamentos					
P388/pH	Cu(acac) ₂ M	5	1-7	189	2/6
P388/vcr		5	1-7	516	5/6
P388/cPt		5	1-7	193	-
* Tiempo medio porcentual de supervivencia. En la determinación del ILS se fijó el valor de referencia en 60 días para el índice de supervivencia de los animales.					
**o.S. cepa original, no resistente					
pH - cepa resistente a la rubomicina					
vcr - cepa resistente a la vincristina					
cPt - cepa resistente a la cisplatina					

Los tumores resistentes a fármacos se obtuvieron por administración de células ascíticas de la leucemia P-388, provenientes de ratones que fueron tratados con rubomicina, vincristina y cisplatina. La resistencia se encontró en la 4ª, 6ª y 8ª generación. La sensibilidad de los tumores resistentes bajó 4 a 5 veces por aplicación de la sustancia MOC-Melphalan.

Según se puede deducir de las tablas 6 a 8 se lograron los resultados más interesantes en leucemia P-388 con resistencia a medicamentos multifactorial. Los tumores que reaccionan a numerosos agentes antitumorales eran sensibles frente al preparado según la invención.

Igualmente considerable es el efecto frente a L-1210, puesto que todos los animales del grupo de experimentación sobrevivieron 60 días después del transplante del tumor. Dicha supervivencia corresponde a su curación completa.

Ejemplo 4

Características inmunomodulatorias de los complejos según la invención en el ejemplo de $(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{-Cu-C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$

Se determinaron las características inmunomodulatorias del complejo según la invención $(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{-Cu-C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ por el aumento de las células que forman anticuerpos de ratones blancos sin raza (peso intermedio: 20 g). Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 2×10^8 eritrocitos de oveja en 0,2 ml de suero fisiológico. Media hora después de la inmunización los ratones recibieron 0,3 mg/kg de $(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{-Cu-C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ en 0,6 ml de aceite de oliva por vía peroral. Pasados 4 días se mataron los animales, se extrajo el bazo, se suspendió en solvente homogéneo y se extendieron 0,5 ml de la suspensión sobre una cubeta Petri con eritrocitos de oveja sobre un Agar. Los experimentos manifestaron que el $(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2\text{-Cu-C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ en una dosificación de 0,3 mg/kg de peso corporal aumentó el número de células que forman anticuerpos en el bazo de los animales inmunizados. Así ascendió el número de las células que forman anticuerpos del grupo de control al que se administró por vía oral sólo 0,6 ml de aceite de oliva, 76.000 ± 5.000 , mientras que el número de las células que forman anticuerpos de los animales inmunizados ascendió a 158.000 ± 7.000 .

Ejemplo 5

Exámenes de toxicidad de los complejos según la invención en el ejemplo de $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$

La toxicidad del complejo según la invención $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ se determinó en cinco especies de animales de laboratorio en diferentes pruebas. Los resultados de los exámenes mostraban que $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal no causa variación grave alguna en el cuadro hemático periférico, no tiene influencias patológicas sobre la función renal y hepática y no suscita en los órganos y tejidos variación específica alguna. Adicionalmente podía mostrarse mediante los exámenes, que $(C_5H_7O_2)_2-Cu-C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ incluso en un tiempo de administración prolongado no suscita resistencia alguna.

Ejemplo 6

Actividad antitumoral en un melanoma B-16

Experimento I

Después del trasplante del tumor melanoma B-16 a ratones de la línea Black (suspensión celular con 10×10^6 células/ml) se administró MOC-Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en una solución de 0,3 ml de 10% de DMSO en los días 3, 5 y 9. Los animales se mataron el 21º día del análisis y se examinaron histológica y morfológicamente (véase tabla 9).

TABLA 9

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor melanoma B 16 inhibición de la proliferación del tumor				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	Promedio de la masa del tumor/g	Inhibición porcentual
MOC-Melphalan	5	5	-	100
Control	-	5	3,4	-

Experimento II

Tras un trasplante del tumor melanoma B-16 a ratones de la línea Black (suspensión celular con 10×10^6 células/ml) se administró la sustancia por vía intraabdominal en una dosificación de 0,1 mg/animal en los días 3, 5 y 9 en 0,3 ml de solución de 10% de dimetilsulfóxido DMSO. Los animales se mataron el 16º día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 10, ilustraciones 1, 2). La concentración del ácido dinitrosalícílico DNS en las células tumorales se ha determinado espectrofotométricamente tras la electroforesis. (Tabla 10, ilustración 3).

TABLA 10

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan en el tumor melanoma B-16 inhibición de la proliferación del tumor, destrucción del DNS de células tumorales						
Grupo	Dosificación mg/animal	Número de animales	Promedio de la masa tumoral/g	inhibición porcentual	DNS mg/g	Índice de mitosis
MOC-Melphalan	0,1	6	0,83	78	0,8	0,6
Control	-	6	3,22	-	4,3	4,2

Ejemplo 7

Actividad en un sarcoma S-180

Experimento I

Tras el trasplante del tumor sarcoma S-180 en ratones blancos sin raza se administró a los animales la sustancia MOC-Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 1 mg/kg en 0,3 ml de solución al 10% de dimetilsul-

fóxico DMSO en los días 3, 5 y 9. Los animales se mataron el 21° día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 11).

TABLA 11

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor sarcoma S-180 Inhibición de la proliferación tumoral				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	Promedio masa tumoral/g	Inhibición porcentual
MOC-Melphalan	1	6	-	100
Control	-	6	4,7	-

Experimento II

Tras el transplante del tumor sarcoma S-180 en ratones blancos sin raza se administró a los animales MOC-Melphalan y Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en 0,3 ml de una solución al 10% de concentración en dimetilsulfóxido DMSO en los días 3, 5, 7 y 9. Los animales se mataron el 21° día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 12).

TABLA 12

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor sarcoma S-180 inhibición de la proliferación del tumor				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	Promedio de la masa tumoral/g	inhibición porcentual
MOC-Melphalan	5	6	-	100
Melphalan	5	10	1,4	49
Control	-	10	2,8	-

Experimento III

Después de un transplante del tumor sarcoma S-180 en ratones blancos sin raza se administró a los animales MOC-Melphalan y Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en 0,3 ml de una solución al 10% de concentración en dimetilsulfóxido DMSO en los días 2, 4, 6, 8 y 10. Los animales se mataron el 21° día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 13).

TABLA 13

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor sarcoma S-180 inhibición de la proliferación tumoral				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	Promedio de masa tumoral/g	inhibición porcentual
MOC-Melphalan	5	10	2,0 ± 0,7	49
Melphalan	5	10	2,4 ± 1,1	38
Control	-	20	3,9 ± 0,5	-

Ejemplo 8

Efecto en el adenocarcinoma del intestino delgado (AKATON)

Experimento I

Tras un transplante del tumor AKATON en ratones blancos sin raza, se administró a los animales la sustancia MOC-Melphalan por vía intraabdominal en una dosificación de 5 mg/kg en 0,3 ml de un suero fisiológico en los días 3, 5, 7 y 9. Los animales se mataron el 21° día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 14).

TABLA 14

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor AKATON inhibición de la proliferación del tumor en una aplicación por vía intraabdominal				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	Promedio de masa tumoral	inhibición porcentual
MOC-Melphalan	5	10	0,3	92
Control	-	10	3,6	

Experimento II

Tras un transplante del tumor AKATON en ratones blancos sin raza, se administró a los animales la sustancia MOC-Melphalan por vía intravenosa en una dosis de 5 mg/kg en 0,3 ml de suero fisiológico en los días 3, 5, 7 y 9. Los animales se mataron el 21º día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 15).

TABLA 15

Efecto de la sustancia MOC-Melphalan sobre el tumor AKATON inhibición de la proliferación del tumor en caso de aplicación por vía intravenosa				
Grupo	Dosificación en mg/kg	Número de animales	promedio de masa tumoral/ g	inhibición porcentual
MOC-Melphalan	5	6	0,9	80
Control	-	6	4,4	-

Experimento III

En el examen para la prevención del tumor de la sustancia MOC-Melphalan, se administró a ratones de la línea Balb la sustancia MOC-Melphalan por vía intravenosa en dosificaciones de 2,5 mg/kg y 5 mg/kg en 0,3 ml de suero fisiológico en cuatro días consecutivos (1 x diariamente). El día 5 se implantó a los animales el tumor AKATON. Los animales se mataron el 21º día del análisis y fueron examinados histológica y morfológicamente (tabla 16, ilustración 6).

TABLA 16

Efecto preventivo de la sustancia MOCMelphalan sobre el tumor AKATON inhibición de la proliferación del tumor						
Grupo	Dosificación mg/kg	Número de animales	promedio de masa tumoral/g	inhibición porcentual del peso del tumor	promedio del volumen tumoral/ cm ³	inhibición porcentual del volumen tumoral
MOC-Melphalan	5,0	6	0,91	80	1,38	82
MOC-Melphalan	2,5	6	2,67	40	4,76	40
Control	-	6	4,46	-	7,90	-

Ejemplo 9

Determinación de la concentración del ADN en células de ratones con sarcoma S-180 tras la acción de la sustancia MOC-Melphalan

Células tumorales del sarcoma S-180 (20-10⁶ células/examen) fueron incubadas durante 40 o 60 minutos con la sustancia MOC-Melphalan en una concentración de 0,05 mg/10⁶ células, a una temperatura de 37°C (véase tabla 16).

Se determinó la concentración de ADN con el método de fenol-cloroformo según MANIATIS (MANIATIS, Frin, Sämbruck métodos de la tecnología genética, clonación molecular, M.: MIR, 1984, página 479 ff.). Después de la separación de ADN y ARN se efectuó una fóresis en un gel de agarosa de una concentración de 2,5% (véase tabla

16, ilustración 7). Se calculó la cantidad del ADN a partir del consumo de RNasas, es decir los datos indican la masa exacta del ADN.

TABLA 17

Influencia de la sustancia MOC Melphalan sobre la concentración del ADN en células tumorales del sarcoma S180				
Grupo	Tiempo de incubación /min	Dosificación mg/10 ⁶ células	concentración del ADN µg/g células	Concentración ADN/Control
MOC-Melphalan	40	0,05	530	498
MOC-Melphalan	60	0,05	53	50
Control	-	-	106	100

Ejemplo 10

Síntesis del complejo Cu (acac)₂-Tegafur

Se obtuvo el complejo Cu(acac)₂·Tegafur a través de una cristalización lenta de una solución de cloroformo-metanol, acidificada con ácido clorhídrico.

Preparación: Se disolvieron 2,61 g (1 x 10⁻² mol) de acetilacetato de cobre Cu(C₅H₇O₂) en 50 ml de cloroformo purificado. La solución tiene un color azul marino. Se disolvieron 4 g (2 x 10⁻² mol) de Tegafur (N¹-(2-furanidil)-5-flururacilo) en 50 ml de solución de cloroformo-metanol en la proporción de 1:1:1. Las soluciones obtenidas han sido recalentadas en baño de agua hasta la ebullición y mezcladas bajo agitación continua con ayuda de un agitador magnético. La solución adopta un color verde brillante. Se depositó el recipiente de cristal con la solución en un lugar oscuro para la cristalización lenta. Unos 3 a 4 días después de la evaporación completa del solvente se purifica el residuo marrón-verde con cloroformo hasta el completo lavado del Cu(C₅H₇O₂)₂ reaccionado y Tegafur. Los cristales verdes residuales son secados al aire.

Constitución y estructura: del complejo MOC-Tegafur se efectuaron mediante los métodos EPR, NMR, espectroscopia de electrones e infrarrojo.

Caracterización del compuesto MOC-Tegafur

El producto representa un complejo policristalino organometálico que posee un color verde. La proporción estequiométrica Cu(C₅H₇O₂)₂·Tegafur es de 1:1. La masa molecular del complejo Cu(acac)₂·Tegafur es de 461,2 g/mol, el complejo se disuelve bien en agua, en suero fisiológico, en metanol, etanol, DMSO y Twin-80. El compuesto no es soluble en éter y cloroformo. La temperatura de fusión de los cristales es de 127°C. El compuesto fue estable al aire durante 5 años.

Parámetros espectroscópicos de MOC-Tegafur

Espectros ultravioleta (solución: metanol-cloroformo, proporción: 1:3):

Espectros UV-VIS: - margen UV: líneas de intensidad con 36200 cm⁻¹ (276 nm)

- margen VIS: transición característica de d_{x²-y²} → d_{xy} con

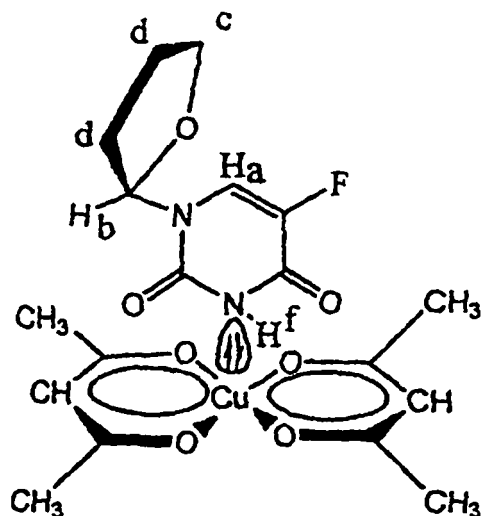
λ = 12345 cm⁻¹ (810 nm)

Espectros ESR: solución de metanol-cloroformo en la proporción 1:3 con temperatura ambiente y temperatura de 77°K:

g_{||} = 2,301, g_⊥ = 2,05, g₀ = 2,146

A_{||} = 160·10⁻⁴ cm⁻¹ A_⊥ = 14·10⁻⁴ cm⁻¹ A₀ = 52·10⁻⁴ cm⁻¹

Espectros NMR en metanol-cloroformo deuterizado (1:3): en la tabla se indican los valores del desplazamiento químico de los protones en el espectro NMR del complejo MOC-Tegafur y del Tegafur puro para la comparación (a, b, c, d, f corresponden a la posición de los protones).

MOC-Tegafur:

Valores del desplazamiento químico de los protones en las sustancias Tegafur y MOC-Tegafur

TABLA 18

Sustancia	a	b	c	g	f
Tegafur	7,8	5,8	3,7, 4,1	2,0	-
MOC-Tegafur	7,82	5,86	4,15	1,9	11,73

Ejemplo 11

Efecto antitumoral de MOC-Tegafur

Experimento I

48 Horas después del trasplante del tumor AKATON (adenocarcinoma del intestino delgado) se administró a los ratones de la línea Balb la sustancia MOC-Tegafur por vía intraabdominal en 0,3 ml de un suero fisiológico en una dosificación de 5 mg/kg peso corporal. Esto ocurrió el día 3º, 5º, 7º y 9º. Los animales se mataron el 21º día del análisis.

TABLA 19

Influencia de las sustancias MOC-Tegafur y Tegafur sobre el tumor AKATON (cuatro veces administración de las sustancias)				
Dosis (mg/kg)	Número de animales	Peso del tumor (g)	inhibición porcentual	MOC-Tegafur
5	10	0,61	86	Tegafur
250	10	1,95	54,5	Control del tumor
-	10	4,4	-	
*en comparación con el grupo de control				

Experimento II

48 Horas después del transplante del tumor AKATON se administró a los ratones de la línea Balb la sustancia MOC-Tegafur por vía intravenosa en 0,3 ml de un suero fisiológico. Esto ocurrió el día 3º, 5º, 7º y 9º. Los animales se mataron el 21º día del análisis.

TABLA 20

Influencia de las sustancias MOC-Tegafur y Tegafur sobre el tumor AKATON en caso de una administración intravenosa (cuadro veces administración de las sustancias)				
Dosis (mg/kg)	Número de animales	Peso del tumor (g)	Inhibición porcentual*	MOC-Tegafur
5	10	0,86	80	Tegafur
250	10	2,1	51	Control del tumor
-	10	4,3	-	
*en comparación del grupo de control				

Experimento III

48 Horas después del transplante del tumor sarcoma-180 se administró a ratones de la línea Balb la sustancia MOC-Tegafur por vía intraabdominal en 0,3 ml de un suero fisiológico. La administración se efectuó el día 3°, 5° y 9°. Los animales se mataron el 21° día del análisis.

TABLA 21

Influencia de las sustancias MOC-Tegafur y Tegafur sobre el tumor sarcoma180 (tres veces administración de las sustancias)				
	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Peso del tumor (g)	Inhibición porcentual*
MOC-Tegafur	3	6	0,43	89
MOC-Tegafur	5	6	0,195	95
Tegafur	250	10	3,1	20,5
Control	-	6	3,9	-
*en comparación con el grupo de control				

Ejemplo 11

Examen de la acción de MOC-Tegafur sobre la proliferación del tumor AKATON después del transplante del tumor

El preparado se administró por vía intravenosa en un suero fisiológico de 0,3 ml durante 4 días seguidos (tabla 20). Luego se transplantó el tumor AKATON.

TABLA 22

Acción de MOC-Tegafur sobre la proliferación del tumor en los exámenes del AKATON						
Dosis (mg/kg)	Número de animales	Peso del tumor (g)	Inhibición porcentual del peso del tumor	Tamaño del tumor (cm ³)	Inhibición porcentual del volumen del tumor	MOC-Tegafur
5	6	2,20	50	3,06	61,3	Control
-	6	4,46	-	7,90	-	
*en comparación con el grupo de control						

Ejemplo 12

Modificaciones morfológicas estructurales en el tejido tumoral en ratones con sarcoma-180 por la acción de MOC-Tegafur

Se transplantó el tumor sarcoma-180 a ratones adultos sin raza con un peso de 20 a 22 g. 48 horas después del transplante del tumor sarcoma-180 se administró a los ratones la sustancia MOC-Tegafur por vía intraabdominal en una solución de NaCl con una concentración al 0,9% en una dosificación de 5 mg/kg de peso corporal. La administración se efectuó el 3°, 5° y 9° día.

Al 21° día se mataron los ratones por decapitación y se extrajo el tejido tumoral para el examen histológico. La actividad antitumoral de MOC-Tegafur se determinó provisionalmente. La inhibición porcentual de la proliferación del tumor en este examen era del 96,4%.

La estructura morfológica de los cortes de tumor histológicos en los animales que recibieron MOC-Tegafur, se distingue de los tumores de los animales del grupo de control. Por un lado se forma entre los tejidos sanos y tumorales una envoltura de doble capa que puede compararse con una cápsula. Externamente consiste en fibras musculares en cuyo interior se pueden reconocer células con membranas. Las células en la mayoría de los casos están sin contenido (ilustración 8). En segundo lugar es reconocible un gran número de cavidades de diferentes tamaños comparables con vacuolas (ilustración 9).

En el tejido tumoral de los animales tratados con MOC han de observarse células altamente diferenciadas y zonas necróticas y postnecróticas, así como vasos sanguíneos que contienen un gran número de células. Las células tumorales son normalmente redondas con núcleos pequeños (1 o 2 núcleos) y contienen cromatina micronuclear y microrreticulada difundida. Pocas de las células blásticas tienen aspecto redondo. El citoplasma que rodea el núcleo grande no está uniformemente distribuido. La cromatina numerosa y entrecruzada se concentra en la periferia del núcleo. El número de células de varios núcleos indica una alteración de la citocinesis. En las células transformadas en blásticas puede observarse una condensación prematura de la cromatina.

En el examen se determinó la actividad del tejido tumoral en animales que recibieron el preparado MOC-Tegafur y en animales no tratados en el control. Se calculó el número de mitosis e índices de mitosis. El número medio de las mitosis en el grupo de examen ascendía a 2,55% y en el grupo de animales de control a 11,2%. El índice de mitosis en estos grupos de animales ascendía a 0,9 y 4,75. En el examen se observó bajo el microscopio un aumento del número de metafases y anafases patológicas.

En resumen se deduce de esto que el preparado MOC-Tegafur induce un gran cambio destructivo en el tejido tumoral.

Ejemplo 13

Acción de MOC-Melphalan y MOC-Tegafur sobre el tumor melanoma B-16

48 Horas después del transplante del tumor melanoma B-16 en ratones de la línea Black se administraron las sustancias MOC-Melphalan y MOC-Tegafur en la dosificación de 3 mg/kg de peso corporal por vía intraabdominal (a continuación de los días: 3, 5 y 9). Considerando la mala hidrosolubilidad de MOC-Melphalan se disolvieron en una solución de dimetilsulfóxido DMSO con una concentración al 10% (recargado con 0,15 mol de NaCl). El MOC-Tegafur se administró en un suero fisiológico. A los animales del grupo de control se administraron también las soluciones (sin preparados). Al 16° día se mataron los ratones por decapitación, se les extrajo el tejido tumoral para el examen histológico y se analizó el tumor sobre la actividad antitumoral (tabla 23). Se realizó la fijación de los tumores con formalina al 10% y a continuación se efectuó una inclusión de parafina. El espesor de corte de 5 μ m fue teñido con hematoxilina-eosinoma. La microscopía se efectuó con un microscopio Leica Galen.

Los resultados del examen de estos compuestos, relacionados en la tabla 23, indican una alta actividad antitumoral.

TABLA 23

	Número de animales	Dosis mg/kg	peso del tumor g	inhibición porcentual	MI (índice de mitosis)
MOC-Tegafur	5	5,0	1,13	65,66	0,86
MOC-Melphalan	5	5	0,74	77,71	0,64
Control	5		3,22		4,22
*en comparación con el grupo de control					

Durante la acción sobre el tumor, las sustancias en el estado de proliferación no actúan sólo sobre el tamaño y el peso de los tumores sino que además inhiben los procesos de división y la vitalidad de las células tumorales.

En los grupos de animales que recibieron las sustancias MOC-Melphalan y MOC-Tegafur se observó una inhibición de la proliferación del tumor, pero también el número de las células de mitosis era inferior (tabla 21).

Morfológicamente pueden apreciarse claramente estas particularidades de los compuestos. En la microscopia de los tumores de los animales (los animales que han recibido MOC-Tegafur (ilustración 10)) se puede observar una formación de cápsula. Dentro de las cápsulas se pueden reconocer diferentes tipos celulares: por un lado las células similares a las epiteliales con degradación y por otra parte las células musculares. Además puede reconocerse un tejido tumoral. En el tejido tumoral puede observarse un gran número de zonas necróticas. Las células tumorales se diferencian muy claramente con diferentes núcleos celulares. La cromatina en la mayoría de los casos es de núcleo grande y reticulado pequeño, se pueden ver también células con mucha cromatina. El número de las células divisibles es insignificante (MI es de 0,86).

Debe observarse otro cuadro de la estructura morfológica en el tejido tumoral en los animales que han recibido MOC-Melphalan (ilustración 11). La capa superior de la cápsula es en este caso esencialmente mayor, similar y consiste en las células grasas parenquimáticas. Se pueden reconocer células similares en la delimitación frontal del tejido tumoral. En el centro del tumor se pueden observar secciones y tiras queróticas. Se puede ver también la destrucción en los contactos intercelulares. Las células tumorales en la mayoría de los casos tienen poco citoplasma, los núcleos están deformados y contienen una cromatina granulada. El número de células divisibles es insignificante. Se reconoce un pequeño número con grandes núcleos transformados. En el tejido tumoral se presentan también estructuras alveolares que se forman a partir de los tipos de melanoblastomas similares a las células epiteliales antitípicas.

En los tumores de los animales del grupo de control falta la formación de cápsulas (ilustración 12). La capa exterior consiste en grupos de músculos que se encuentran en la mayoría de los casos en el tejido tumoral. La mayor parte de células tumorales divisibles manifiestan en su mayoría un desarrollo normal de la mitosis. Los núcleos son grandes y contienen diferente cromatina. Raramente se encuentran pequeñas células necróticas.

El análisis comparativo de los cuadros morfológicos de los tres grupos de animales hace suponer que los complejos según la invención disponen de un efecto apropiado sobre el tejido tumoral. A pesar de las diferencias en la estructura morfológica, la tendencia del efecto de los preparados sobre la degradación del tumor es igual a lo siguiente: encapsulado, degradación esencial de la cromatina, división del tejido, disminución de la actividad celular proliferativa.

Ejemplo 14

Influencia sobre los cultivos celulares

Se examinó el efecto de las sustancias MOC-Melphalan y MOC-Tegafur según la invención sobre la actividad proliferativa, morfología y síntesis protéica en los cultivos celulares tumorales (KML). Esto se produjo en los ratones eliminados de la línea Melanoma-16. Se distribuyeron 80.000 células/ml en 3 ml de DMEM con la adición de suero de ternero embrional, 200 μ /mol de glutaminas y antibiótico. Después del cultivo celular de 24 horas a una temperatura de 37°C (fase de crecimiento celular logarítmica) se añadieron las sustancias MOC con una concentración de 10 y 100 μ g/ml. Después de la incubación durante 24 horas se determinó el número de células vivas. Paralelamente se prepararon los preparados fijados de las células para el análisis morfológico.

Ambas sustancias MOC con una concentración de 100 μ g/ml inciden en la supresión del crecimiento del tumor (tabla 24) y ulterior muerte de células tumorales.

TABLA 24

Exámenes para la supresión de la proliferación celular por la acción de MOC-Tegafur y MOC-Melphalan		
	Dosis (μ g/ml)	Supresión de células de crecimiento (%)
MOC-Tegafur	100	100
	10	32
MOC-Melphalan	100	95
	10	30
*en comparación con el control del tumor		

El análisis morfológico ha mostrado que en la dosificación de 10 $\mu\text{g/ml}$, el MOC-Tegafur provoca una acumulación de células hiper cromáticas y picnóticas. El MOC-Melphalan conduce a la formación de células con citoplasma, similar a una vacuola.

- 5 El efecto de las sustancias sobre la síntesis protéica se determina con ayuda del estado de supresión mediante la inclusión de los precursores radioactivos de los aminoácidos (mezcla totalizada de ^3H -aminoácidos). Por ello fueron seleccionados 1 millón de células que se encuentran en una "fase logarítmica". Se introdujeron en botellas de 10 ml los complejos con la dosificación de 50 $\mu\text{g/ml}$ y paralelamente los aminoácidos con una actividad de 10 mCi/ml . Después de una incubación durante 24 horas se lavaron las células de la base nutritiva de cultivo y se efectuó una lisis (disolución). La radioactividad de las proteínas se determinó con el contador celular (tabla 25).

TABLA 25

Efecto de MOC-Tegafur y MOC-Melphalan sobre la biosíntesis protéica		
	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Opresión de la inclusión de aminoácidos (%)
MOC-Tegafur	50	77
MOC-Melphalan	50	59
*En comparación con el control (culturas de células tumorales)		

- 25 Se determinó la disminución de la síntesis protéica en las células en los grupos examinados en comparación con las células del grupo de control. Según se puede deducir de la tabla 25, especialmente el MOC-Tegafur inhibe la biosíntesis protéica.

- 30 La acción de las sustancias MOC sobre los cultivos de celulares tumorales con melanoma B-16 conduce al cambio de la estructura morfológica, disminución de la actividad proliferativa e inhibición de la síntesis protéica. Esto se confirma mediante los resultados del examen que se obtuvieron previamente en los ratones por la acción de los complejos sobre el tumor B-16.

35 Ejemplo 15

Farmacocinética del almacenamiento de preparados MOC en los tejidos del organismo

- 40 La quimioterapia de tumores exige un efecto selectivo de preparados carcinostáticos. A esta selectividad puede añadirse la facultad de almacenamiento de los preparados en el tejido tumoral. Para la determinación se sintetizaron los ^3H -Cu(acac)₂ especialmente marcados con MOC-Tegafur. El preparado marcado se limpió minuciosamente con ayuda de un cromatógrafo de sustancias acompañatorias. La radioactividad total del ^3H -Cu(acac)₂Ft es de 0,16 microunidades.

- 45 Se examinó la distribución y el almacenamiento del complejo caracterizado en los órganos y tejidos en ratones con proliferación del tumor AKATON transplantado (cáncer del intestino delgado). El preparado se administró en una dosificación de 1.200.000 impulsos por minuto el 13° día después del trasplante del tumor. Se formaron tres grupos de ratones de 5 unidades. Los animales se mataron 30, 60 y 180 minutos después de la administración del preparado y se examinaron los órganos mediante impulsos radioactivos con un contador (scintigrafía). Los resultados están representados en la tabla 26.

TABLA 26

Desarrollo de almacenamiento del ^3H -Cu(acac) $_2$ -Tegafur en órganos y tejidos en los ratones examinados (número de impulsos por minuto)

Órganos	30 min	60 min	180 min
Cerebro	600	1200	500
Corazón	Trazas	Trazas	-
Pulmón	2300	2800	3000
Hígado	1700	3550	4000
Riñón	Trazas	Trazas	1200
Intestino delgado	Trazas	Trazas	3200
Bazo	1400	1200	1900
Sangre	3300	4700	1200
Tumor	1200	1800	12.000

El máximo almacenamiento del preparado se observa en el tumor, lo cual confirma un transporte acertado en el organismo.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición farmacéutica, conteniendo al menos un complejo de la fórmula general



en la cual

D representa una β -dicetona

M representa un átomo de metal seleccionado del grupo consistente en Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn y Mo,

T representa una sustancia con al menos un grupo conteniendo N, O o S y

donde M entra en una interacción donador-aceptador de electrones con T, y M presenta en el complejo un punto libre de coordinación para preparar un fármaco antitumoral.

2. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1, **caracterizada** por el hecho de que D es seleccionado entre acetilacetona y dibenzoilmetano.

3. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada** por el hecho de que T es una sustancia conteniendo al menos un grupo NH_2 -, NH -, N -, O - o S -.

4. Utilización de una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** por el hecho de que T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo, 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico, 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina, 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina, 2-metil-(3-dimetil-amino-1-propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina.

5. Composición farmacéutica de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Cu y T es una sustancia seleccionada del grupo comprendiendo 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo, 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico, 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina, 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina, 2-metil-(3-dimetil-amino-1-propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina.

6. Composición farmacéutica de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Mn y T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 2-2'-bipiridina, 2-(3-piridil)-piperidina, amida de ácido 1,2-imidopropílico y 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina,

7. Complejo de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Cu y T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furil)-uracilo (Tegafur), 2-[bis-(2-cloroetil)-amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, amida de ácido 1,2-imidopropílico, 2-hidroximetil-5-hidroxi- γ -pirona, 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina, 2-(3-piridil)-piperidina, 2-2'-bipiridina, 2-metil-(5-trimetil-butil-1-il-ol-3)-piridina, 2-metil-(3-dimetil-amino-1-propinil)-piridina y 2-metil-5-etileno-piridina.

8. Complejo de la fórmula general



en la cual D es acetilacetona, M es Mn y T es una sustancia seleccionada del grupo consistente en 2,4,6-trimetilpiridina, 2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triacina, 2-2'-bipiridina, 2-(3-piridil)-piperidina, amida de ácido 1,2-imidopropílico y 4-[bis-(2-cloroetil)-amino]-L-fenilalanina.

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

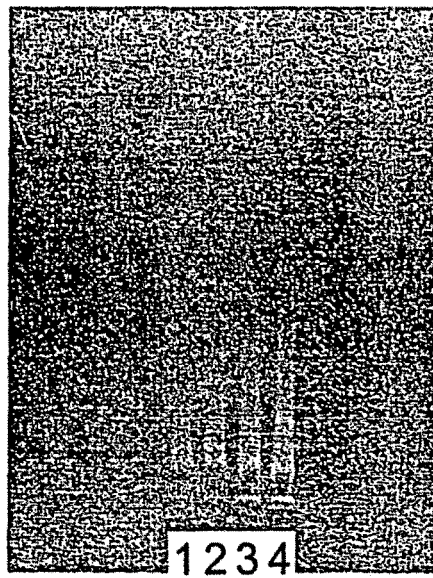


Fig. 4

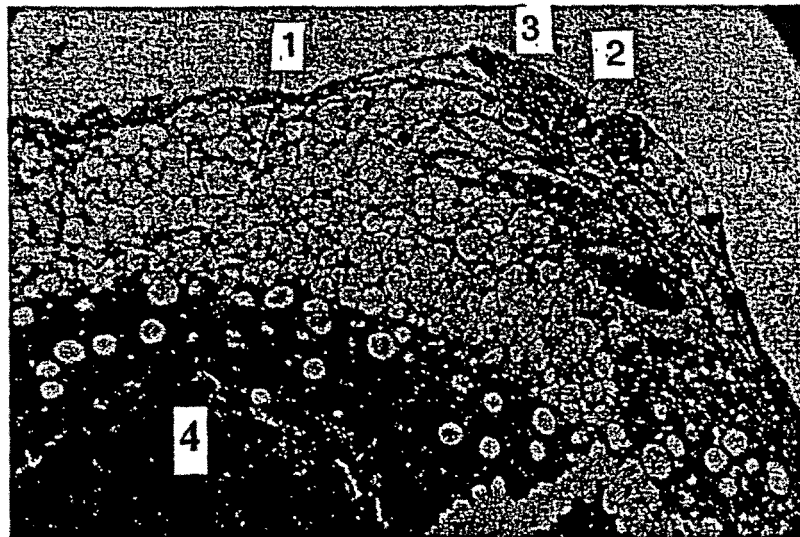


Fig. 5



Fig. 6

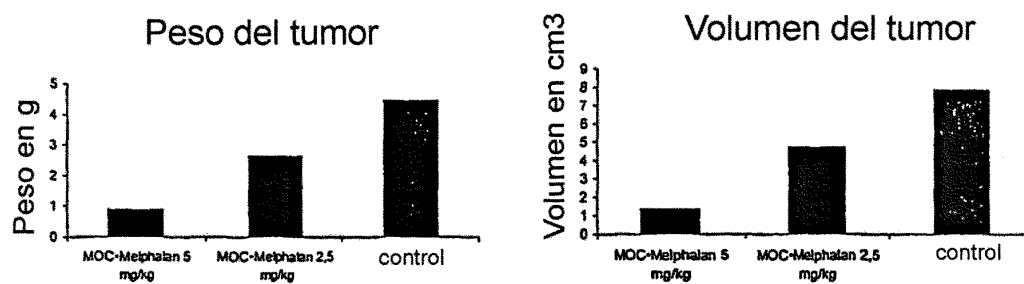


Fig. 7

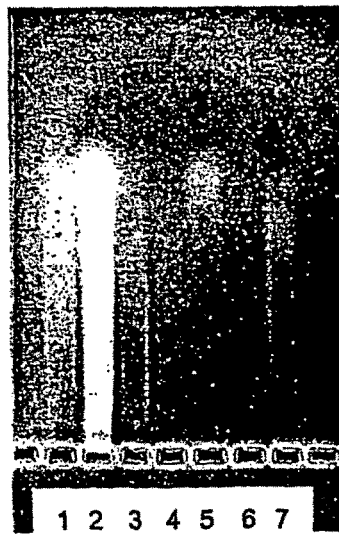


Fig. 8

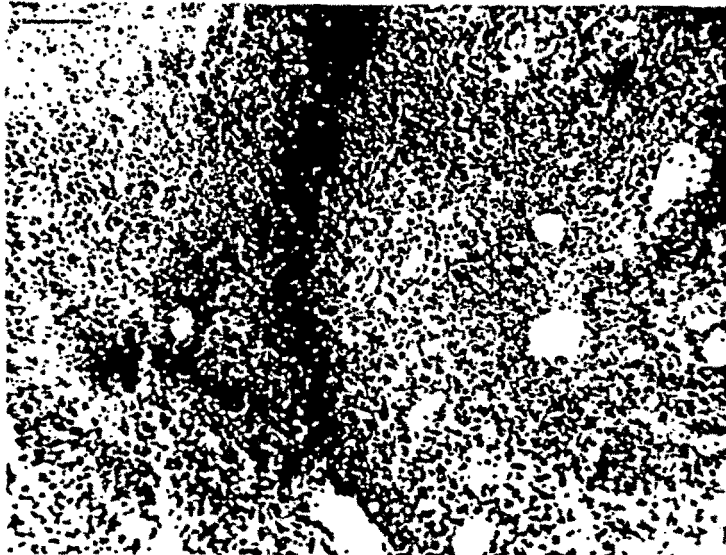


Fig. 9

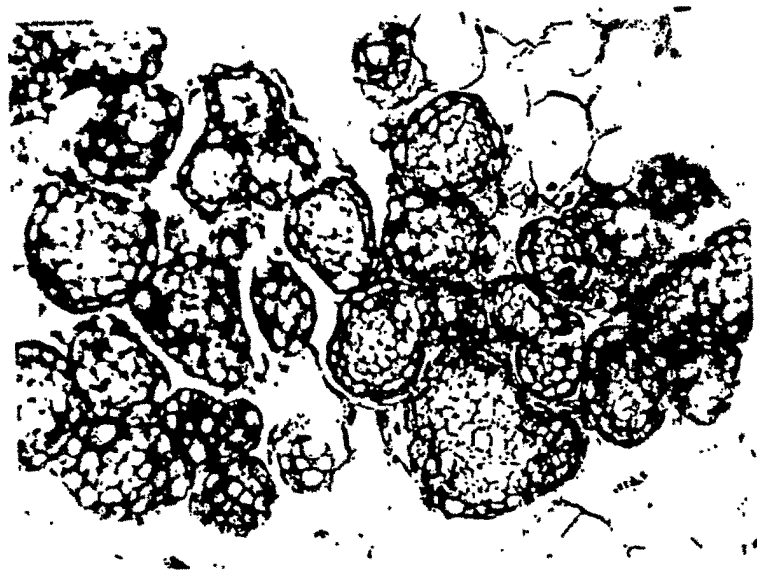


Fig. 10



Fig. 11

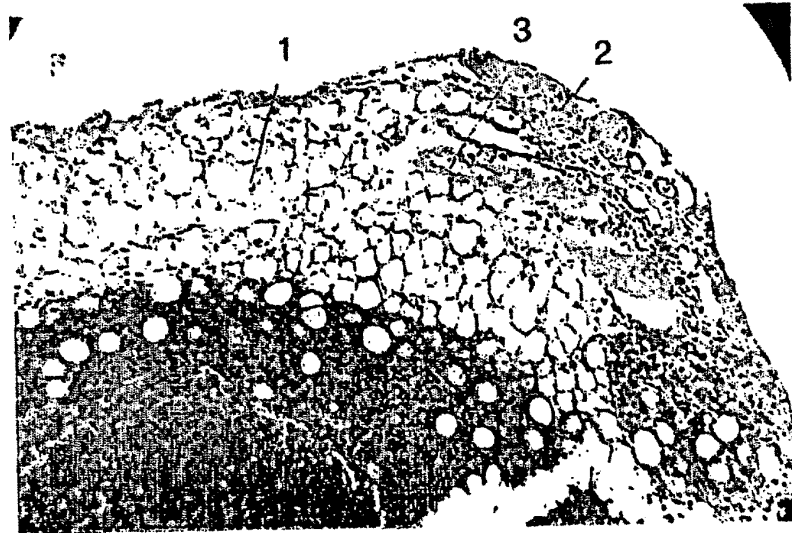


Fig. 12

