



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015011819-8 A2

(22) Data do Depósito: 22/05/2015

(43) Data da Publicação: 11/07/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 1 1 8 1 9 A

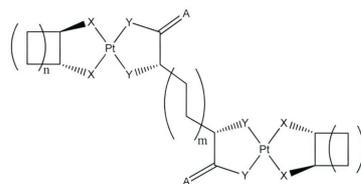
(54) **Título:** COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL

(51) **Int. Cl.:** C07F 15/00; A61P 35/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE - CETENE

(72) **Inventor(es):** MÔNICA FREIRE BELIAN; WAGNER EDUARDO DA SILVA; JAMERSON HENRIQUE FREITAS DA SILVA; LEONARDO SEVERIANO DE ALBUQUERQUE; ANDRÉ GALEMBECK; TERESINHA GONÇALVES DA SILVA; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

(57) **Resumo:** COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL. A presente invenção trata-se de um complexo binuclear de platina II, contendo em sua estrutura dois centros (núcleos) de platina (II) (complexo binuclear), apresentando este composto, atividade antitumoral, consistindo assim, em promissor fármaco a ser aplicado na terapêutica do câncer. O já referidocomposto apresenta ação antineoplásica, cujo setor de aplicação é a área de saúde humana, especificamente a oncologia. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica, (a) do ponto de vista estrutural (novidade); e (b) quanto ao seu potencial antitumoral, a presente invenção (droga), apresentou-se eficientemente satisfatória quando comparada a análogos que contém apenas um núcleo de platina (II). Os percentuais de inibição tumoral obtidos para a presente invenção, após realização de ensaios in vitro, frente às linhagens de células de (i) leucemia promielocítica aguda, (ii) carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano e (iii) adenocarcinoma de cólon humano foram: 79,1; 94,6 e 70,2%; respectivamente, comprovando assim, sua ação como quimioterápico antineoplásico.



COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL

Campo de Invenção

[001] A presente invenção trata-se de um complexo binuclear de platina II, contendo em sua estrutura dois centros (núcleos) de platina (II) (complexo binuclear), apresentando este composto atividade antitumoral, constituindo assim, em promissor fármaco a ser aplicado na terapêutica do câncer. O referido composto apresenta ação antineoplásica, cujo setor de aplicação é a área de saúde humana, especificamente a oncologia. A referida invenção apresenta-se como inovação tecnológica, (a) do ponto de vista estrutural (novidade), e (b) quanto ao seu potencial antitumoral, a presente invenção (droga), apresentou-se eficiente quando comparada a análogos que contém apenas um núcleo de platina (II).

Sumário

[002] A presente invenção consiste em composto de coordenação contendo dois centros de platina (II) e dois ligantes; o primeiro ligante caracterizado por ser um ligante em ponte entre os cátions Pt (II) e o segundo completando a esfera de coordenação dos cátions (número de coordenação 4); sendo o produto final potencialmente ativo contra células tumorais. Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de (i) leucemia promielocítica aguda, (ii) carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano e (iii) adenocarcinoma de cólon humano foram: 79,1, 94,6 e 70,2%, respectivamente.

Anterioridades

[003] Os quimioterápicos antineoplásicos baseados em platina tiveram origem no ano de 1960, com os estudos do professor Rosenberg Barnett, da Universidade de Michigan - USA. Em 1978, através de seus estudos, o primeiro fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e comercializado, sendo este fármaco a cisplatina. Desde a descoberta da ação antitumoral da cisplatina (CDDP), os complexos à base de platina, contendo o íon Pt^{2+} , vem sendo estudados como potenciais agentes farmacológicos (Jung, Y., Lippard, S. J., *Direct Cellular responses to platinum-induced DNA damage, Chemical Reviews*, 107, No 5, (2007) 1387-1407) e (Burger, H., Loos, W. J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R. H. J., Wiemer, E. A. C., *Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance, Drug Resistance Updates*, 14 (2011) 22-34).

[004] Apesar do crescente estudo e desenvolvimento destes compostos, uma problemática persiste quanto sua utilização, que são os efeitos colaterais apresentados por essa classe de compostos. Devido a isto, muitos esforços têm sido aplicados para o desenvolvimento racional de novos complexos que apresentem redução dos efeitos adversos sem comprometimento da ação antitumoral desejada. Porém, independente dos efeitos colaterais, o uso clínico de fármacos à base de platina continua amplamente difundido, haja vista que esta classe de compostos possui uma ampla janela de atuação frente aos mais diversos tipos de tumores, a exemplo da CDDP.

[005] As propriedades dos compostos de platina, utilizados como agentes antineoplásicos, estão relacionadas em sua maioria com a cinética de reação dos chamados grupos de saída, os quais se encontram diretamente ligados ao centro metálico, ou seja, são ligantes com alta labilidade quando comparados aos alvos e interferentes biológicos, por exemplo, nDNA, mtDNA, enzimas (proteínas), biomoléculas, entre outros, os quais poderão determinar sua atividade farmacológica específica, fenômeno de resistência à multidrogas (*MultiDrug Resistance* – MDR) e/ou efeito colaterais (Farrell, N. P., *Platinum formulations as anticancer drugs clinical and pre-clinical studies, Current topics in medicinal chemistry*, 11, No 21 (2011) 1-9). Diversas pesquisas as quais trataram de investigar os possíveis alvos do íon Pt (II) em uma célula foram de fundamental importância para entender a atividade citotóxica das drogas à base de platina, bem como seus danos causados ao nível de nDNA e mtDNA.

[006] Acredita-se que o primeiro alvo dos fármacos à base de platina são os nitrogênios presentes nos nucleotídeos. As ligações formadas entre o íon metálico e as bases do material genético interagem de maneira suficientemente forte para bloquearem o processo de divisão celular ou acionarem uma série de mecanismos intracelulares que identificam danos ao nDNA, por exemplo, desencadeando por fim a apoptose. Os compostos de platina mais utilizados, e disponíveis no mercado, são a CDDP, carboplatina (CBDCA), oxaliplatina e nedaplatina. Na Tabela 1 são apresentados os perfis toxicológicos destes fármacos comercializados mundialmente (Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G.

E., Oun R., The status of platinum anticancer drugs in the clinic and clinical trials, Dalton Trans., 39 (2010) 8113-8127).

[007] Tabela 1. Perfil toxicológico de algumas drogas à base de platina disponíveis no mercado.

	Cisplatina	Carboplatina	Oxaliplatina	Nedaplatina
Mielosupressão -	♦	♦		
Nefrotoxicidade -	♦			♦
Neurotoxicidade -	♦		♦	
Ototoxicidade -	♦			
Náusea / Vômito-	♦	♦	♦	♦

[008] Devido aos efeitos colaterais apresentados por estes quimioterápicos e à baixa média de sobrevida dos pacientes submetidos aos regimes quimioterápicos, a comunidade científica vem impulsionando a busca por novos compostos e/ou composições capazes de resolver os problemas toxicológicos sem comprometer seu efeito antitumoral, podendo contribuir assim, para uma melhor qualidade de vida dos pacientes portadores de câncer.

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

[009] Um dos grandes problemas envolvidos na terapia do câncer utilizando fármacos à base de platina está relacionado aos efeitos colaterais provocados pela administração desses compostos, os quais apresentam um potencial risco aos pacientes submetidos ao regime quimioterápico. A baixa média de sobrevida dos pacientes constitui um reflexo da utilização de regimes

quimioterápicos que não se preocupam com a adequação entre a dose ou composições sugeridas, juntamente com a expressão dos efeitos toxicológicos ao mesmo tempo em que o mesmo regime quimioterápico sugerido poderá desencadear um processo de seleção natural entre as linhagens de células normais e tumorais, eliminando as mais susceptíveis, deixando no corpo do paciente, já demasiadamente debilitado, as células tumorais mais resistentes, caracterizando o surgimento do fenômeno MDR, acarretando assim em um alto número de óbitos, muitas vezes através do próprio perfil toxicológico do fármaco ou coquetel utilizado (*Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., Oun R., The status of platinum anticancer drugs in the clinic and clinical trials, Dalton Trans., 39 (2010) 8113-8127*).

[010] Atualmente, a comunidade científica vem exaustivamente estudando as diversas expressões (genóticas e fenóticas) do fenômeno da resistência à multidrogas, do inglês *MultiDrug Resistance (MDR)*, que ocasiona a geração de células tumorais resistentes aos mais variados tipos de agentes quimioterápicos, independente de correlação estrutural ou mecanismo de ação. O MDR é desencadeado pela alta toxicidade dos agentes antineoplásicos comercializados, conduzindo ao insucesso qualquer regime quimioterápico adotado pelos médicos.

[011] Entre os fármacos à base de platina é sabido que a CDDP e CBDCA apresentam resistência cruzada, ou seja, pacientes tratados por CDDP que apresentam tumores resistentes apresentarão também resistência ao uso da CBDCA. A oxaliplatina e nedaplatina não desencadeiam o fenômeno MDR,

porém apresentam restrições quanto a sua utilização, pois suas janelas de atuação entre os mais variados tipos de tumor são reduzidos quando comparados a CDDP, por exemplo. Além disso, estes fármacos possuem também efeitos colaterais severos como: mielosupressão e nefrotoxicidade.

Objetivos da Invenção

[012] O objetivo da presente invenção é apresentar um novo complexo à base de platina, contendo dois centros de platina (II); com maior atividade antitumoral e menores dosagens de administração, conferindo assim, baixos efeitos colaterais.

Solução

[013] A presente invenção consiste em quimioterápico à base de platina (II), cuja constituição se apresenta como um novo complexo binuclear o qual foi capaz de inibir, de maneira satisfatória, células tumorais humanas de leucemia promielocítica aguda; carcinoma mucoepidermóide de pulmão e adenocarcinoma de colo humano; cujos percentuais apresentados foram 66,9, 94,6 e 70,2%, respectivamente.

Vantagens

[014] Ao ser comparado aos resultados dos padrões quimioterápicos disponíveis no mercado (CDDP e oxaliplatina), em ensaios (*in vitro*) contendo cinco linhagens de células humanas, o composto proposto na presente invenção apresentou significativa atividade citotóxica, confirmado através da realização de ensaios *in vitro*, utilizando o método de referência MTT, que se

refere ao brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), HEP-2 (carcinoma de laringe humana), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HT29 (adenocarcinoma do colo humano). Os resultados para as atividades citotóxicas estão sumarizados na Tabela 2.

[015] Tabela 2. Resultados obtidos no teste de citotoxicidade da cisplatina, oxaliplatina e do complexo sintetizado, codificado como (JWM), frente a algumas linhagens de células tumorais humanas.

Compostos testados	% de inibição									
	NCI-H292	SEM**	HEP-2	SEM	HT-29	SEM	MCF-7	SEM	HL-60	SEM
CDDP*	100,0	0,33	65,29	1,11	***	***	42,79	0,10	100,0	0,61
Oxaliplatina	35,6	1,5	33,7	3,7	36,1	1,2	12,2	0,6	72,3	2,0
JWM	94,6	1,1	42,4	3,1	70,2	0,5	7,8	0,0	66,9	0,0

* CDDP = cisplatina; ** SEM = Desvio padrão; ***sem atividade.

[016] O complexo JWM apresentou maior percentual de inibição frente às linhagens celulares de tumores humanos de NCI-H292, HEP-2 e HT-29, quando comparado com a oxaliplatina, fármaco já disponibilizado no mercado mundial. Realizando-se agora uma comparação entre o padrão (CDDP) e o complexo JWM, observa-se uma maior atividade citotóxica do padrão, porém estes percentuais no caso da linhagem NCI-H292 são aproximados. A citotoxicidade do complexo binuclear sintetizado pode estar relacionada com a forma que o centro Pt(II) interage com o nDNA após a hidrólise do grupo de saída. No complexo JWM poderá ocorrer a hidrólise dos anéis de forma semelhante ao observado no mecanismo de hidrólise da nedaplatina e com

isso a quantidade de ligações interfitas do nDNA com os núcleos metálicos são favorecidas devido ao espaço que existe entre os centros. Sendo este tipo de interação mais citotóxica do que as ligações intrafitas, verificando assim, um aumento da citotoxicidade do composto para algumas linhagens já citadas. Analogamente à cisplatina, a oxaliplatina utiliza transportadores de cátions orgânicos para penetrar no meio intracelular. Um fator que pode contribuir para a citotoxicidade desse complexo sintetizado deve-se ao fato de algumas linhagens celulares possuírem uma maior quantidade de proteínas transportadoras de cátions aumentando a captação e dose antitumoral efetiva do composto proposto frente a certas linhagens de células tumorais.

Descrição Detalhada

[017] O procedimento de síntese adotado para a obtenção da presente invenção, o complexo codificado como JWM, foi satisfatório uma vez que a rota sintética adotada apresentou bons rendimentos reacionais (~90%). O complexo JWM foi submetido a algumas técnicas de caracterização espectroscópica, tais como: a ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , as quais confirmaram a formação do já referido composto, representado de forma genérica como mostrado na figura 1.

[018] Legenda da Figura:

[019] Figura 1. Fórmula estrutural generalizada do quimioterápico sintetizado e apresentado como a presente invenção, o qual foi codificado como **JWM**.

[020] Os ligantes utilizados para compor a primeira esfera de coordenação do complexo JWM possuíam todos altos padrões de pureza (98%), sendo utilizados sem qualquer purificação.

[021] Os ligantes utilizados, (a) ligante em ponte tetradentado (conectando os dois centros de platina (II) através de dois centros básicos de *Lewis* (dois dentes) para cada centro de platina (II)) e (b) dois ligantes bidentados isolados (coordenando-se cada um, especificamente, a único centro de platina (II)); devendo as duas classes consistirem em ligantes: acíclico ou cíclico, com cadeia alquílica (série homóloga), dissubstituídos ou não; a modificação estrutural em “Y”, “X” e “A” que corresponda a qualquer base de Lewis. As classes dos ligantes podem incluir que os mesmos sejam do tipo: alquílicos (acíclicos ou cíclicos, saturados ou insaturados, com ou sem heteroátomo), aromáticos (aromáticos com um ou mais heteroátomos), carboidratos (insaturados ou saturados, monossubstituídos ou polissubstituídos, com e sem agliconas), aminas ou diaminas (primárias, secundárias, terciárias e quaternárias (forma carregada – sais quaternários de amônio), tosiladas, mesiladas), enaminas, iminas, acilas, carboxilatos, dicarboxilatos hidroxilados ou dihidroxilados, fosfato, haletos, o-tosila (-OTs), o-mesila (-OMs), sulfóxidos, sulfatos, sulfonas, tiossemicarbazonas, tiadiazóis, benzoquinonas, naftoquinonas, acridinas.

[022] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica (FT-IR e RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt), obtidos para o composto de coordenação, o qual foi utilizado como quimioterápico, encontram-se descritos abaixo:

[023] Fórmula Molecular: $(Pt_2X_aY_bA_cC_{d+n+m}H_{(d+n+m)\pm i})$, onde os substituintes X, Y e A podem ser qualquer átomo ou grupo funcional, havendo ou não igualdade entre os tipos, capazes de se apresentarem como portadores de pares de elétrons (bases de *Lewis*); “a”, “b”, “c” e “d” serão maiores que zero; “C” representando os átomos de carbono, onde “n” e “m” consistem em valores iguais ou maiores que zero e “H” representando os átomos de hidrogênio, onde “i” consiste em termo positivo ou negativo, podendo ser um valor igual ou maior que zero.

[024] Código: JWM

[025] IR cm^{-1} (KBr): ν 2930, 2854, 1640, 1621, 1472, 1330, 1340. RMN 1H (δ , ppm, D_2O): 1,0 (t, 2H); 1,5 (t, 2H); 2,0 (s, 2H); 5,40 (t, 2H); 6,14 (d, 1H). RMN ^{13}C (δ , ppm, D_2O): 167; 62,23; 31,83; 24,48. RMN ^{195}Pt (δ , ppm, D_2O): -1989 (s, Pt).

[026] O complexo JWM foi submetido à atividade citotóxica, através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e HT29 (adenocarcinoma do colo humano). Os meios contendo a cultura de células foram o RPMI e o DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2 . Posteriormente as culturas foram

plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida as amostras (complexo JWM e os padrões de CDDP e oxaliplatina) foram dissolvidas em DMSO (1%) e adicionadas aos poços cuja concentração final foi ficada em $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após 72h de reincubação foi adicionado $25 \mu\text{L}$ de MTT (5 mg mL^{-1}) e após de 3h de incubação, os meios de cultura com o MTT foram aspirados e $100 \mu\text{L}$ de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda fixo de 560 nm. [027] Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 5.0*. O complexo JWM foi capaz inibir, de maneira satisfatória, células tumorais humanas de leucemia promielocítica aguda; carcinoma mucoepidermóide de pulmão e adenocarcinoma de colo humano; cujos percentuais apresentados foram 66,9, 94,6 e 70,2%, respectivamente.

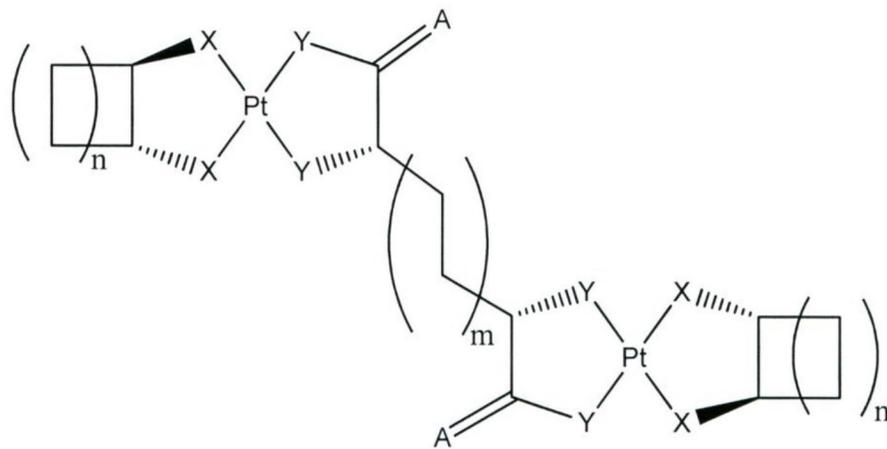
REIVINDICAÇÕES

1. “COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL” caracterizado por se tratar de um complexo binuclear de platina II, contendo em sua estrutura dois centros (núcleos) de platina (II) (número de coordenação 4), apresentando este composto atividade antitumoral, constituindo assim, em promissor fármaco a ser aplicado na terapêutica do câncer.
2. “COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL” conforme reivindicação 1, caracterizado por apresentar fórmula estrutural generalizada do quimioterápico sintetizado, codificado como JWM, conforme figura 1 do relatório descritivo.
3. “COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL” conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado pelos ligantes utilizados, (a) ligante em ponte tetradentado (conectando os dois centros de platina (II) através de dois centros básicos de *Lewis* (dois dentes) para cada centro de platina (II)) e (b) dois ligantes bidentados isolados (coordenando-se cada um, especificamente, a único centro de platina (II)); devendo as duas classes consistirem em ligantes: acíclico ou cíclico, com cadeia alquílica (série homóloga), dissubstituídos ou não; a modificação estrutural em “Y”, “X” e “A” que corresponda a qualquer base de Lewis. As classes dos ligantes podem incluir que os mesmos sejam do tipo: alquílicos (acíclicos ou cíclicos, saturados ou insaturados, com ou sem heteroátomo), aromáticos (aromáticos com um ou

mais heteroátomos), carboidratos (insaturados ou saturados, monossubstituídos ou polissubstituídos, com e sem agliconas), aminas ou diaminas (primárias, secundárias, terciárias e quaternárias (forma carregada – sais quaternários de amônio), tosiladas, mesiladas), enaminas, iminas, acilas, carboxilatos, dicarboxilatos hidroxilados ou dihidroxilados, fosfato, haletos, o-tosila (-OTs), o-mesila (-OMs), sulfóxidos, sulfatos, sulfonas, tiossemicarbazonas, tiadiazóis, benzoquinonas, naftoquinonas, acridinas.

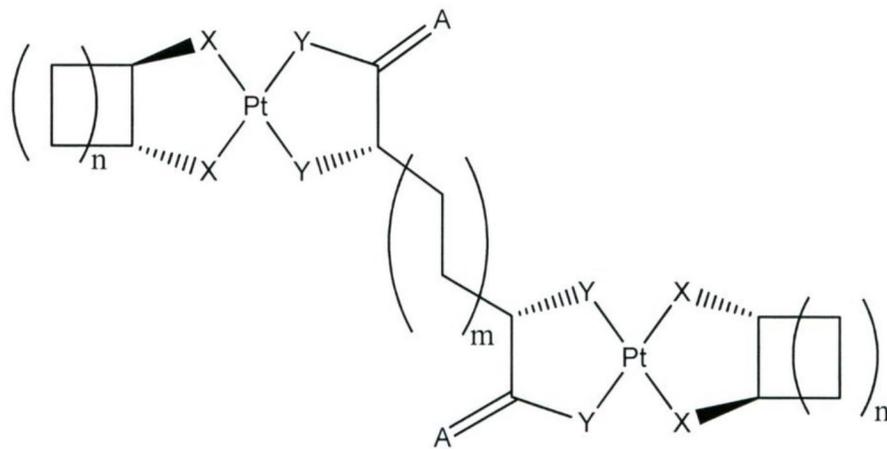
4. “COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL” conforme reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por apresentar fórmula molecular: $(Pt_2X_aY_bA_cC_{d+n+m}H_{(d+n+m)\pm i})$, onde os substituintes X, Y e A podem ser qualquer átomo ou grupo funcional, havendo ou não igualdade entre os tipos, capazes de se apresentarem como portadores de pares de elétrons (bases de *Lewis*); “a”, “b”, “c” e “d” serão maiores que zero; “C” representando os átomos de carbono, onde “n” e “m” consistem em valores iguais ou maiores que zero e “H” representando os átomos de hidrogênio, onde “i” consiste em termo positivo ou negativo, podendo ser um valor igual ou maior que zero.

5. “COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL” conforme reivindicações 2 e 4, caracterizado por apresentar generalizações (fórmulas estrutural e molecular) aplicáveis e correlacionadas à descrição apresentada na figura 1 do relatório descritivo.

**Figura 1.**

RESUMO

“COMPLEXO BINUCLEAR À BASE DE PLATINA COM AÇÃO ANTITUMORAL”. A presente invenção trata-se de um complexo binuclear de platina II, contendo em sua estrutura dois centros (núcleos) de platina (II) (complexo binuclear), apresentando este composto atividade antitumoral, consistindo assim, em promissor fármaco a ser aplicado na terapêutica do câncer. O já referido composto apresenta ação antineoplásica, cujo setor de aplicação é a área de saúde humana, especificamente a oncologia. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica, (a) do ponto de vista estrutural (novidade); e (b) quanto ao seu potencial antitumoral, a presente invenção (droga), apresentou-se eficientemente satisfatória quando comparada a análogos que contém apenas um núcleo de platina (II). Os percentuais de inibição tumoral obtidos para a presente invenção, após realização de ensaios *in vitro*, frente às linhagens de células de (i) leucemia promielocítica aguda, (ii) carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano e (iii) adenocarcinoma de cólon humano foram: 79,1; 94,6 e 70,2%; respectivamente, comprovando assim, sua ação como quimioterápico antineoplásico.

**Figura 1.**