República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020002740-9 A2

(22) Data do Depósito: 10/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 01/02/2022

(54) Título: COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE

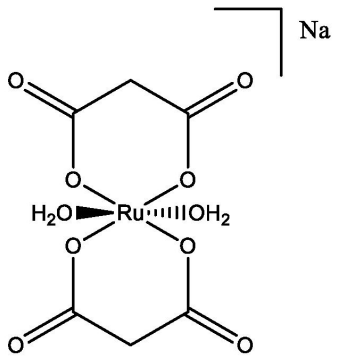
(51) Int. Cl.: C07F 15/00; A61K 31/295; A61P 35/00.

(52) CPC: C07F 15/00; A61K 31/295; A61P 35/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): MONICA FREIRE BELIAN; WAGNER EDUARDO DA SILVA; MARIA HELENA PIRES SOUZA DE ANDRADE; TERESINHA GONCALVES DA SILVA; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR.

(57) Resumo: COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE. A presente invenção trata-se do desenvolvimento de um composto de coordenação de rutênio(III) contendo como ligante o ânion metanodicarboxilato, o qual, segundo testes de toxicidade aguda, foi classificado como sendo de baixa toxicidade, integrante da categoria 4, segundo o protocolo da OECD 423; e segundo ensaios de atividade antitumoral, através de modelo animal, camundongos machos (Mus musculus) da linhagem Swiss, com células tumorais implantadas na região subaxilar do tipo Carcinoma de Ehrlich, apresentou alta atividade antitumoral com 76,6% de inibição tumoral. A invenção apresentou vantagens quanto à diminuição da toxicidade quando comparado a padrões disponíveis no mercado farmacológico, como a cisplatina (CDDP), que é um composto de coordenação de platina (II), uma vez que a referida invenção se enquadrou na categoria 4, e a CDDP enquadra-se na categoria 1.



“COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE”

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata-se de um composto de coordenação de rutênio (III) contendo como ligante o ânion metanodicarboxilato, o qual apresentou baixa toxicidade - categoria 4, segundo protocolo da OECD 423; e alta atividade antitumoral com 76,6% de inibição tumoral, comprovada através de modelo animal, camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, com células tumorais implantadas na região subaxilar do tipo Carcinoma de *Ehrlich*. A invenção apresentou vantagens quanto à diminuição da toxicidade quando comparado a padrões disponíveis no mercado farmacológico, como a cisplatina (CDDP), que é um composto de coordenação de platina (II), uma vez que a referida invenção se enquadrou na categoria 4, e a CDDP enquadra-se na categoria 1. O presente pedido de patente de invenção se situa no campo da química.

Fundamentos da invenção

[002] O uso de complexos metálicos na terapia do câncer teve início em 1978, através da aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) da cisplatina (*cis*-$[Pt(Cl)_2(NH_3)_2]$ ou *cis*-diclorodiaminoplatina II) para uso clínico. A partir desse ano, outros complexos de platina foram estudados, assim como, outros complexos metálicos. *(Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin, Journal of Chemical Education, 83 (5) (2006), 728-734)*. Entre milhares de complexos metálicos que foram sintetizados e avaliados como agentes anticancerígenos, atualmente apenas os complexos de platina, rutênio, titânio e gálio entraram em ensaios clínicos.

[003] A busca por novos complexos metálicos com atividade biológica deve aliar além de uma rota sintética simples e o desenvolvimento de compostos estáveis em pH fisiológico (a fim de não gerar a partir de sua degradação possíveis metabólitos tóxicos), a menor capacidade de provocar efeitos colaterais no organismo. Dentre os diversos

complexos metálicos com atividade antitumoral destacam-se os complexos de rutênio (III), os quais têm demonstrado alta seletividade para células tumorais e baixa toxicidade sistêmica comparada a compostos de platina (II) (*Kostova, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. Current Medicinal Chemistry, 13 (2006) 1086-1107*).

[004] A síntese dos complexos metálicos se justifica, pois, a atividade biológica de um complexo é potencialmente maior que a dos seus constituintes separadamente, sob as mesmas condições físico-químicas. Esse fato é corroborado pelo conceito de *Overtone* e pela teoria de quelação de *Tweedy*. O conceito de *Overtone* afirma que a membrana lipídica que envolve externamente a célula atua de forma a permitir mais facilmente a entrada de moléculas lipofílicas que as hidrofílicas (*Santos, M.; Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra Trypanosoma cruzi; 2012, p. 31*). Já a teoria de *Tweedy* afirma que, a sobreposições dos orbitais dos ligantes sobre os orbitais vazios dos íons metálicos reduz a polaridade (carga positiva) sobre esses e, além disso, aumenta a deslocalização de elétrons-π, o que, consequentemente, aumenta a hidro e lipossolubilidade dos complexos.

[005] Os compostos de coordenação apresentam um centro metálico parcialmente positivo, o qual é “atraído” principalmente pelas moléculas-alvo no interior celular, que são as proteínas e o ácido desoxirribonucléico (DNA-Nuclear ou nDNA), que serão espécies doadoras de elétrons, principalmente devido à sua composição por átomos de nitrogênio e oxigênio (*Nazarov, A. A.; Risse, J.; Ang, W. H.; Schmitt, F.; Zava, O.; Ruggi, A.; Groessl, M.; Scopelitti,, R.; Juillerat-Jeanneret, L.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Anthracene-Tethered Ruthenium(II) arene complexes as tools to visualize the cellular localization of putative organometallic anticancer compounds. Inorg. Chem. 51 (6). 2012*).

[006] Dessa forma, as principais formas elucidadas de atuação desse tipo de fármacos é a de formação de complexos com o nDNA e/ou com proteínas, o que dificulta o funcionamento normal do organismo e células, desencadeando processos apoptóticos (*Al-Amiery, A. A.; Kadhum, A. A. H.; Mohamad, A. B. Antifungal and antioxidant activities of pyrrolidone thiosemicarbazone complexes. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2012*).

[007] Os complexos de rutênio(II) e (III) apresentarem menos efeitos colaterais e não induzem processos de resistência cruzada como no caso dos complexos de platina(II) (*Lima, A. P; Pereira F. C.; Vila Nova C. A.; Soares J. R.; Pereira L.C.; Porto H. K.; Pavanin L.A.; dos Santos W.B.; Silveira-Lacerda E. P. Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Ruthenium Complex cis-(Dichloro) tetramine ruthenium(III) Chloride in Human Lung Carcinoma Cells A549. Biological Trace Element Research, 147 (1-3) (2012) 8–15*), porém, apresentaram similaridade com esses com relação à cinética de trocas de ligantes em meio aquoso (*Caruso, F.; Rossi. M.; Benson, A.; Opazo, C.; Freedman, D.; Monti, E.; Gariboldi, M. B.; Shaulky, J.; Marchetti, F.; Pettinari, R.; Pettinari, C. Ruthenium–Arene Complexes of Curcumin: X-Ray and Density Functional Theory Structure, Synthesis, and Spectroscopic Characterization, in Vitro Antitumor Activity, and DNA Docking Studies of (p-Cymene)Ru(curcuminato)chloro; J. Med. Chemistry 55 (3) (2012) 1072-1081*).

[008] Os baixos efeitos colaterais advindos da administração de doses de quimioterápicos à base de rutênio se devem ao fato das semelhanças entre as propriedades físico-químicas dos complexos desse metal com os de ferro, e como esse último é um componente natural dos sistemas biológicos. No organismo humano, diversas vias são utilizadas para redução de níveis de ferro no plasma, a partir da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e albumina, o que pode ser também atribuído ao mecanismo similar para redução de altos níveis de rutênio no sangue, pois essas proteínas captam o rutênio e fazem com que esse adentre no interior celular (*Hotze, A. C. G.; Kariuki, B. M.; Hannon, M. J. Dinuclear Double-Stranded Metallo supra molecular Ruthenium Complexes: Potential Anticancer Drugs. Angew. Chemistry 118 (2006) 4957–4960*).

[009] A bioquímica ou a bioatividade dos complexos de rutênio(III) se baseia na captação celular facilitada, devido à similaridade do íon Ru(III) com o íon Fe(III). A transferrina e a albumina sérica são proteínas utilizadas por mamíferos para solubilizar e transportar ferro, reduzindo assim a sua toxicidade. Uma vez que as células tumorais se dividem e multiplicam-se rapidamente, existe uma maior necessidade de captar ferro, em decorrência disso ocorre um aumento do número de receptores de transferrina localizados nas superfícies celulares, sequestrando assim mais transferrina do que as

células saudáveis (*Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. Ruthenium in medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. Platinum Metals Review 45 (2) (2001) 35-42*). Desta forma, complexos de rutênio são mais facilmente captados por células tumorais, com isso os complexos exibem baixa toxicidade e menores efeitos colaterais que os demais quimioterápicos metálicos.

[0010] Apesar disso, a utilização de compostos de rutênio para tratamento de câncer ainda se encontra em fases clínicas. Os complexos de rutênio(III) mais estudados na literatura são o NAMI-A, abreviação do termo New Anticancer Metastasis Inhibitor, e o KP-1019 ou trans-[tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III)]; sendo o primeiro com ação antimetastática comprovada; e o segundo, responsável pela indução da apoptose de células de carcinoma colorretal (*Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. Chemistry & Biodiversity 5 (2008) 2140-2155*).

[0011] Para o NAMI-A, a fase 1 dos testes clínicos demonstrou que o composto foi tolerado pelos pacientes em doses relativamente altas, sendo responsável por inibição de aproximadamente 100% dos casos de proliferação das células cancerígenas (antimetastático). Atualmente novos compostos análogos ao NAMI-A estão em desenvolvimento, a fim de avaliar a sua atividade anti-metastática e mecanismos de ação atrelados a atividade (*Rademaker-Lakhai, J. M. et al. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium- trans- DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. v. 10, p. 3717–3727, 2004; Vacca, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. British Journal of Cancer 86 (2002) 993 – 998)*.

[0012] Com relação ao KP-1019, na fase 1 dos ensaios clínicos, foi observada a baixa toxicidade, sem o aparecimento de efeitos colaterais, e potencial ação antitumoral, uma vez que foram observados em até 1/3 dos pacientes redução significativa da massa tumoral (*LOUGH, J. A. Aqueous Solution Chemistry of Ruthenium Arene Anticancer Complexes A Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy by. [s.l.] University of warwick, 2010*).

[0013] Na patente PI 07127154 A2 é descrita a preparação de uma série de complexos de rutênio(II), cuja estrutura contém compostos aromáticos com ligações organometálicas. Os ensaios de citotoxicidade, os quais foram realizados em linhagem de célula de câncer ovariano A2780, demonstraram alta atividade dos complexos testados. A presente invenção difere da patente descrita em diversos aspectos, como a estrutura do complexo, o qual não apresenta nenhuma similaridade química; número de oxidação do metal utilizado, na presente invenção foi utilizado o Ru(III); e os ensaios biológicos, os quais apresentam citotoxicidade e na presente invenção foram feitos ensaios *in vivo*. Neste caso, a presente invenção apresenta vantagens quanto a solubilidade em água e ao método de síntese, o qual não utiliza solventes orgânicos apenas água, no caso da patente descrita a síntese é mediada com uma mistura de água/metanol.

[0014] A patente BR 102014024478-6 A2 descreve o processo de obtenção de complexos de rutênio com bioligantes e sua atividade. Os complexos formados através da complexação do rutênio com alupurinol, imidazol e benzoimidazol, apresentaram alta citotoxicidade frente à linhagem de célula tumoral MDA-MB-231. A referida patente difere da presente invenção quanto aos ligantes utilizados na síntese, não tendo, portanto, nenhuma correlação estrutural. A vantagem da presente patente consiste na alta solubilidade e estabilidade do complexo em água, já que a patente citada apresenta baixa solubilidade em água. Este fator solubilidade em água determina a aplicação de compostos metálicos na medicina, assim como, prevê a dificuldade de eliminação do fármaco pós-atuação no corpo.

[0015] Na patente US 2014/0031565 A1 são descritas as sínteses de complexos organometálicos polinucleares de Ru(II) e sua atividade *in vitro*. Os inventores restringem o uso dos complexos devido à baixa estabilidade química e solubilidade em solventes orgânicos. A presente invenção apresenta estrutura e propriedades diferentes do relatado nesta patente. As vantagens da presente invenção são a estabilidade do complexo sintetizado e a alta solubilidade em água, fatores essenciais na composição de fármacos.

[0016] Outras patentes (WO O 1/30790, WO 02/02572, US 49804 73, BR 10 2013 033604-1 A2, PI 0312470-3 A, WO 2018/087413 Al) descrevem a síntese de

complexos de rutênio (II) e sua atividade anticâncer. A presente invenção difere quanto ao número de oxidação do metal utilizado e da estrutura final do complexo. Deve ser ressaltado que a atividade do metal, como citada na presente invenção, deve-se aos ligantes utilizados, metal e do número de oxidação. Para todas as patentes listadas, nenhuma mostrou a atividade antitumoral (ensaios *in vivo*) dos complexos, mas a citotoxicidade dos mesmos. A vantagem da presente invenção deve-se ao número de oxidação do metal utilizado, o qual favorece a entrada do mesmo no meio intracelular; e a atividade antitumoral expressiva aliada à sua baixa toxicidade.

Breve descrição dos desenhos

[0017] A Figura 1 apresenta a estrutura da referida invenção, codificada como MHMW.

Descrição da invenção

[0018] A presente invenção apresentou um procedimento de síntese satisfatório, tendo o complexo de rutênio (III) obtido, codificado como MHWM, bons rendimentos, >90%; e reprodutibilidade reacional. Para a síntese foram utilizados reagentes de alto grau analítico, para minimizar interferentes e subprodutos indesejados. Os precursores sais de rutênio(III), podendo ser cloreto, brometo, iodeto, nitrato, tiocianato; e o metanodicarboxilato foram misturados através do processo de difusão lenta, na presença de uma solução salina, podendo essa solução ser soro fisiológico. O complexo MHMW foi purificado através de processo de precipitação com solventes de baixa toxicidade, e foi secado em liofilizador para garantir a remoção completa do solvente empregado. O complexo MHWM apresentou alta solubilidade em meio aquoso e em solução salina, e foi submetido a algumas técnicas de caracterização espectroscópica, tais como: espectroscopia de absorção eletrônica, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas; todas as técnicas confirmaram a formação do já referido composto, como mostrado na Figura 1.

[0019] Os ligantes que compuseram a esfera de coordenação do íon Ru(III), cujo número de coordenação é 6; foram (i) ligante dicarboxilato bidentado (metanodicarboxilato) e (ii) ligantes monodentados (moléculas de água completando a esfera de coordenação do íon metálico).

[0020] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica (Absorção eletrônica, FTIR) e espectrométricas, obtidos para o complexo de rutênio(III), o qual foi avaliado quanto a toxicidade aguda e atividade antitumoral, encontram-se descritos abaixo:

[0021] Código: MHWM

[0022] Absorção Eletrônica (nm): λ = 300 (d→d); IR cm^{-1} (KBr): ν 3435 (OH), 1634 (C=O), 1431 (C-O); m/z = 305,89534; 341,18692 (erro = -0,58027 ppm).

[0023] Toda a experimentação animal e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e uso de animais da UFPE, sob a licença nº 23076.030363/2017-48. O teste de toxidade aguda foi baseado segundo o protocolo da ANVISA (2013), que é caracterizado pela avaliação da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias. A classificação da toxicidade aguda do complexo MHWM foi feito segundo o protocolo da OECD/OCDE 423. Após o experimento, foi possível verificar que a presente invenção está classificada como integrante da categoria 4 (300 – 2000 mg Kg^{-1}), considerada como uma categoria de baixa toxicidade.

[0024] Os percentuais de inibição tumoral, para os ensaios *in vivo*, foram calculados segundo Equação, TWI% = [(C – T)/ C] x 100, onde, *C* é a média das massas dos tumores nos animais do grupo controle, e *T* é a média das massas dos tumores do grupo tratado; possuindo cada grupo o número de 10 (dez) animais, e sendo as cobaias portadoras do carcinoma de *Erlich*; para a qual tomaram-se as massas médias dos tumores extraídos do grupos: tratado e controle.

[0025] O composto MHWM apresentou um percentual de inibição tumoral em torno de 76,6%, mediante tratamento das cobaias com uma dose (intraperitoneal) contida na faixa de 0,1 a 20,0 mg Kg^{-1}, incluindo-se os limites.

Exemplos de concretizações da invenção

[0026] A presente invenção comparada ao padrão quimioterápico disponível no mercado, *cisplatina ou CDDP*, em ensaios *in vivo*, apresentou maior atividade

antitumoral. Os resultados para as atividades antitumorais estão sumarizados na Tabela 1.

[0027] Tabela 1. Resultados obtidos nos ensaios de atividade antitumoral, ensaios *in vivo*, da cisplatina e do complexo MHWM, frente ao carcinoma de *Erlich*.

Produtos teste	% de inibição
MHWM	76,6
Controle (-) NaCl 10%	0,0
CDDP	58,0

REIVINDICAÇÕES

1. “COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE” **caracterizada por** ser um composto de coordenação de rutênio(III), contendo em sua estrutura os ligantes metanodicarboxilato e água, com número de coordenação 6, apresentando este complexo atividade antitumoral comprovada, constituindo assim, em um promissor quimioterápico antineoplásico.

2. “COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE”, conforme reivindicação 1, **caracterizada por** apresentar estrutura de um composto de coordenação, codificado como MHWM, conforme a figura 1 do relatório descritivo.

3. “COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE”, conforme reivindicações 1 e 2, **caracterizada pela** atividade antitumoral ser evidenciada através de sua administração, via intraperitoneal e intravenosa, em uma faixa de 0,1 a 20,0 mg Kg^{-1}, incluindo os limites.

4. “COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE”, conforme reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pelo** complexo de rutênio(III) apresentar alta solubilidade em água e em solução salina, podendo ser administrado pelas vias oral, intraperitonial e intravenosa.

DESENHOS

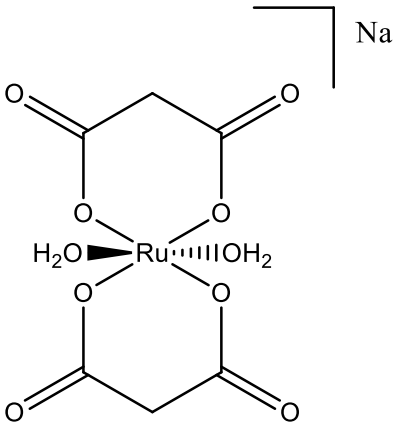


Figura 1.

RESUMO

“COMPLEXO DE RUTÊNIO (III) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E BAIXA TOXICIDADE”

A presente invenção trata-se do desenvolvimento de um composto de coordenação de rutênio(III) contendo como ligante o ânion metanodicarboxilato, o qual, segundo testes de toxicidade aguda, foi classificado como sendo de baixa toxicidade, integrante da categoria 4, segundo o protocolo da OECD 423; e segundo ensaios de atividade antitumoral, através de modelo animal, camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, com células tumorais implantadas na região subaxilar do tipo Carcinoma de *Ehrlich*, apresentou alta atividade antitumoral com 76,6% de inibição tumoral. A invenção apresentou vantagens quanto à diminuição da toxicidade quando comparado a padrões disponíveis no mercado farmacológico, como a cisplatina (CDDP), que é um composto de coordenação de platina (II), uma vez que a referida invenção se enquadrou na categoria 4, e a CDDP enquadra-se na categoria 1.