



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

(21) BR 102016000688-0 A2

(22) Data do Depósito: 13/01/2016

(43) Data da Publicação: 18/07/2017



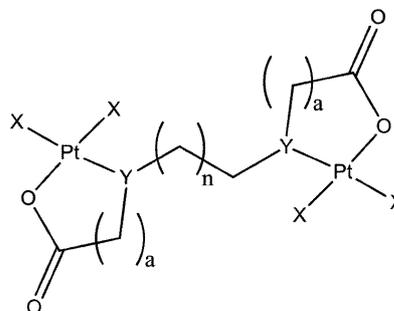
(54) **Título:** QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA

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

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) **Inventor(es):** MÔNICA FREIRE BELIAN; WAGNER EDUARDO DA SILVA; CARINE EMILE MENEZES LAGRANGE; LEONARDO SEVERIANO DE ALBUQUERQUE; TERESINHA GONÇALVES DA SILVA; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR

(57) **Resumo:** QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA. A presente invenção trata-se de dois compostos de coordenação platínicos, contendo em sua estrutura dois núcleos de platina (II), apresentando estes compostos atividades antitumorais contra carcinoma de pulmão e de laringe humano, consistindo assim, em promissores fármacos a serem aplicados nessa terapêutica. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica no que tange as características estruturais dos compostos apresentados (a) e seu alto potencial antitumoral contra carcinomas pulmonares e de laringe humana (b). Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios in vitro, frente às células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram 73,2 e 47,8%; e de laringe humana foram 51,3 e 49,8 %; para os complexos CMW-S e CMW-N, respectivamente.



“QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA”

Campo de Invenção

[001] A presente invenção trata-se de dois compostos de coordenação binucleares a base de platina II, ou seja, contendo em suas estruturas dois centros platínicos, apresentando este composto atividade antitumoral frente a carcinoma pulmonar e laringe humana, constituindo assim, em um promissor agente antineoplásico a ser aplicado nesse tipo de terapêutica. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica no que tange as características estruturais dos compostos apresentados (a) e seu alto potencial antitumoral contra carcinomas pulmonares (b). A presente invenção (potencial fármaco antitumoral) apresentou-se eficiente quando comparada a análogos de platina (II) e demais antineoplásicos utilizados no mercado.

Sumário

[002] A presente invenção consiste em dois compostos de coordenação binucleares, onde cada um deles é constituído por dois ligantes diferentes. O complexo denominado CMW-S contém em sua estrutura dois centros platínicos, um ligante em ponte contendo oxigênio e enxofre como pontos de ligação das platinas; e como segundo ligante o ânion cloreto. O complexo denominado CMW-N contém em sua estrutura dois centros platínicos, um ligante em ponte contendo oxigênio e nitrogênio como pontos de ligação das

platinas; e como segundo ligante o ânion cloreto. Ambos os complexos formados possuem uma esfera de coordenação completa, cujo número de coordenação é 4 (quatro), estrutura quadrática plana; sendo os dois produtos finais potencialmente ativo contra células tumorais humanas do tipo carcinoma pulmonar. Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram 73,2 e 47,8%; e de laringe humana foram 51,3 e 49,8 %; para os complexos CMW-S e CMW-N, respectivamente.

Anterioridades

[003] O primeiro composto de coordenação baseado em platina descrito na literatura quanto ao seu potencial antineoplásico foi o cis-dicloro-diamino platina (II), conhecido como cisplatina (CDDP). Após sua aprovação para uso clínico, em 1978; diversos outros complexos de platina foram testados a fim de verificar seu potencial antineoplásico, e alguns já foram aprovados para uso clínico (*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] Uma problemática que persiste desde os primeiros estudos com complexos de platina aplicados como agentes antineoplásicos são os efeitos colaterais severos produzidos por essa classe de compostos. Devido a isto, muitos ligantes têm sido testados com a finalidade de produzir compostos mais

bioativos, sem ocasionar em um aumento dos efeitos colaterais produzidos; mas apesar disso, os complexos de platina continuam a ser utilizados. Sabe-se que estes complexos apresentam uma ampla faixa de aplicação, pois agem frente aos mais diversos tipos de tumores. Um exemplo de um complexo utilizado contra diversos tipos de tumores é a CDDP.

[005] A bioquímica dos complexos de platina é estudada a cerca de 30 anos. A comunidade científica reconhece que o processo difusional dos complexos de platina no corpo depende de sua estabilização no meio fisiológico extracelular, que apresenta alta concentração de íons cloreto (100mmol L^{-1}) e albumina. Após a sua entrada no organismo, via albumina, o íon platina sofre reações de substituição nucleofílica lentas com moléculas de água presentes no meio. Estas reações proporcionam a formação de um complexo mais ativo. A formação do complexo diaquo garante a eficiência da ligação da platina com centros nitrogenados dos nucleotídeos presentes na estrutura do DNA. Ao se ligar a estes nucleotídeos, o íon Pt(II) bloqueiam o processo de divisão celular ou desencadeiam sinalizadores de danos ao DNA, sendo assim, o mecanismo de apoptose celular é desencadeado (*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*).

[006] O número de pontos e força da ligação entre a platina e os nucleotídeos, dependem da estrutura do complexo e número de centros platínicos. As ligações dos complexos de platina com os nucleotídeos podem ser mono e multifuncionais. A ligação monofuncional ocorre quando cada

átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA e multifuncional quando cada átomo de platina se liga a regiões distintas do DNA. As ligações multifuncionais são mais eficazes em desencadear o processo de apoptose, pois dificulta o processo de reparo do DNA quanto ao dano causado. Essas ligações podem ser do tipo: interfita, quando o complexo se liga a fitas diferentes de DNA; intrafita, quando se liga na mesma fita de DNA; e intermolecular, na qual o metal se liga ao DNA e a outra biomolécula (que atua como ligante) (Jamieson, E. R.; Lippard, S. J., Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, Chem Rev. 99 (9) (1999), 2467-2498). A ligação multifuncional do tipo interfita é a mais eficiente na promoção do processo de morte celular programada, pois esta ligação restringe os graus de liberdade do DNA e minimiza os mecanismos de correção do mesmo.

[007] Como a ligação interfita é a mais eficiente no processo de apoptose celular, a produção de novos agentes antineoplásicos que apresentem mais de um centro platínico unidos em uma única estrutura são vastamente estudados, pois sua estrutura permite que esta ligação aconteça. As variáveis estudadas para estes complexos multinucleares são a natureza do ligante e distância entre os centros platínicos (Mangrum, J. B., Farrell, N. P., Excursions in polynuclear platinum DNA binding, Chem. Commun. 46(36) (2010) 6640-6650). Compostos multinucleares têm sido testados nos últimos 10 anos, a fim de criar uma nova classe de compostos mais ativos e capazes de vencer os mecanismos de resistência a multidroga. O complexo BBR3464® é um sistema trinuclear, que apresentam dois centros platínicos

bioativos, e encontra-se em ensaios de fase clínica II. O complexo apresentou atividade contra tumores de mama, pâncreas e ovário, sendo em alguns casos vinte vezes mais ativo que a cisplatina (Manzotti, C., Pratesi, G., Menta, E., Di Domenico, R., Cavalletti, E., Fiebig, H. H., Kelland, L. R., Farrell, N., Polizzi, D., Supino, R., Pezzoni, G, Zunino, F., BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin, *Clin. Cancer Res.* 6(7) (2000) 2626-2634).

[008] Os relatos na literatura acerca de sistemas multinucleares tem demonstrado a eficiência quanto ao disparo no mecanismo de apoptose celular, pois a ligação interfitas nestes casos é mais eficiente (Broomhead, J. A., Lynch, M. J., The synthesis and characterization of dinuclear platinum complexes bridged by the 4,4'-dipyrazolylmethane ligand, *Inorg. Chim. Acta* 240 (1-2) (1995) 13–17; Hochreuther, S., Puchta, R., van Eldik, R., Novel dinuclear platinum(II) complexes containing mixed nitrogen-sulfur donor ligands, *Inorg Chem.* 50(24) (2011) 12747-12761).

[009] A presente invenção, a qual se configura em dois compostos codificados como CMW-S e CMW-N, os quais não apresentam similaridades com outros compostos desenvolvidos e patenteados pelo presente grupo de pesquisa como PI10029184, BR1020120066246, BR102014024704, BR1020150118198, não havendo correlação com alguns complexos binucleares, cujas patentes referem-se à síntese, terapêutica e/ou aplicações luminescentes: CN103467397-A; CN103396456-A; CN102731580-A; CN103804400-A; CN103788139-A; CN103467397-A; CN103467529-A;

CN103467529-A; CN102731580-A; WO2012117082-A1; DE102010027319-A1;
CN101318980-A; WO2008120690-A1; CN1634018-A; JP03271297-A;
WO9007514-A1.

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

[010] A utilização clínica da cisplatina pode ser limitada devido ao fator desenvolvimento de resistência à droga, do inglês *MultiDrug Resistance (MDR)*, caracterizado pelo seu uso sistemático, demonstrando que para qualquer outro quimioterápico, essa resistência é um dos obstáculos para um tratamento mais eficaz. Observa-se em organismos que precisam ser expostos ao quimioterápico por períodos mais longos, o aparecimento de linhagens celulares que se tornam resistentes à droga no decorrer do tratamento (*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*). Além do fator MDR, os severos efeitos colaterais associados ao uso do quimioterápico em doses superiores a 50 mg m^{-2} , é um limitador quanto a utilização dos complexos de platina. Em regime de doses superiores podem acontecer ototoxicidade, neurotoxicidade, destacando-se a nefrotoxicidade, náusea e vômito, mielosupressão e alguns efeitos raros como danos visuais, doenças repentinas, arritmia, isquemia vascular aguda, intolerância a glicose e pancreatite (*Loehrer, P. J., Einhorn, L. H., Drugs five years later. Cisplatin., Ann. Intern. Med. 100 (1984) 704-713*).

[011] O uso de sistemas multinucleares tem demonstrado eficácia contra o MDR, porém os mecanismos de contorno deste fenômeno ainda não estão bem elucidados.

Objetivos da Invenção

[012] O objetivo da presente invenção é apresentar dois complexos de platina (II) binucleares que apresentem atividade antitumoral frente a carcinoma pulmonar e de laringe humano, constituindo assim, em um promissor agente antineoplásico a ser aplicado nos tratamentos oncológicos.

Solução

[013] A presente invenção consiste em dois complexos de platina (II), cuja constituição se apresenta com dois centros platinicos e dois ligantes diferentes, sendo o complexo denominado CMW-S constituído por um ligante em ponte contendo oxigênio e enxofre como pontos de ligação das platinas; e o complexo denominado CMW-N constituído por um ligante em ponte contendo oxigênio e nitrogênio como pontos de ligação das platinas. Ambos os complexos formados possuem uma esfera de coordenação completada com íons cloreto, constituindo um complexo com número de coordenação é 4 e estrutura quadrática plana. Os dois produtos finais foram potencialmente ativos contra células tumorais humanas; do tipo carcinoma pulmonar e de laringe. Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram 73,2 e 47,8%; e de laringe humana foram 51,3 e 49,8 %; para os complexos CMW-S e CMW-N, respectivamente.

Vantagens

[014] Ao serem comparados aos resultados dos padrões quimioterápicos disponíveis no mercado (CDDP e doxorrubicina), em ensaios (*in vitro*) contendo cinco linhagens de células humanas, os compostos propostos na presente invenção apresentaram significativa atividade citotóxica. O método utilizado para tal comprovação foi o 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 1.

[015] Tabela 1. Resultados obtidos no teste de citotoxicidade da cisplatina, doxorrubicina e dos complexos sintetizados, codificado como (CMW-S e CMW-N), 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
Doxorrubicina	94,1	1,9	79,4	2,6	74,7	2,1	92,7	0,6	64,1	1,1
CWM-S	73,2	0,0	51,3	1,7	6,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMW-N	47,8	0,0	49,8	2,3	23,5	0,0	0,0	0,0	7,6	0,0

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

[016] Os complexos CWM-S e CMW-N apresentaram percentual de inibição significativo frente a linhagens celulares de tumores humanos, do tipo

carcinoma mucoepidermóide de pulmão e de laringe. A citotoxicidade dos complexos binucleares sintetizados podem estar relacionada com a forma que o centro Pt(II) interage com o nDNA após a hidrólise do grupo de saída, neste caso íons cloretos. Para estes complexos a ligação interfitita pode ser favorecida devido a estrutura apresentada por estes complexos oriundo dos ligantes utilizados, ligante ponte ambidentado.

Descrição Detalhada

[017] O procedimento sintético para a obtenção dos dois complexos binucleares foi feito em duas etapas, e os compostos foram codificados como “CWM-S” e “CMW-N”. Primeiro foram obtidos os sais dissódicos dos dois ligantes ácidos. As rotas sintéticas de obtenção dos sais e dos complexos de platina foram satisfatórias, uma vez que os rendimentos foram excelentes (~90%) e a reprodutibilidade da reação foi comprovada através da repetibilidade do experimento em triplicata. Os complexos CWM-S e CMW-N foram submetidos a algumas técnicas de caracterização espectroscópica, tais como: espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de absorção molecular; além de análise térmica; todas as técnicas confirmaram a formação dos já referidos compostos, representados pelas formas genéricas como mostrado na figura 1.

[018] Legenda da Figura:

[019] Figura 1. Fórmula estrutural generalizada dos quimioterápicos sintetizados e apresentados como a presente invenção, os quais foram codificados como **CWM-S** e **CMW-N**.

[020] Os ligantes utilizados, (i) ligante em ponte entre os dois centros de platina (II), (ii) ligantes aniônicos (cloretos) completando a esfera de coordenação do íon Pt(II), que é igual a 4. Para o complexo CWM-S o ligante em ponte é um dicarboxilato contendo em sua estrutura dois centros de enxofre (C–S–C), que se coordenam aos centros de platina. No caso do complexo CMW-N o ligante em ponte também é um dicarboxilato, porém a sua estrutura contém dois grupos amino que se coordenam aos íons Pt(II).

[021] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica, obtidos para os compostos de coordenação, os quais foram utilizados como quimioterápicos, encontram-se descritos abaixo:

[022] Fórmula Molecular: $(Pt_2X_4Y_2O_4C_{b+n+a}H_{(b+n+a)\pm i})$, onde os substituintes X e Y 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). Os sub-índices “a”, “b”, e “n” serão maiores que zero; “C” representando os átomos de carbono, e “H” representando os átomos de hidrogênio, onde “i” consiste em termo podendo ser positivo ou negativo, podendo também ser um valor igual ou maior que zero.

[023] Código: CWM-S

[024] UV nm: $\lambda_{\text{máximo}} = 303$; IR cm^{-1} (KBr): ν 1712, 1633, 725, 701, 663.

TG/DTA (%massa/temperatura °C): 2,0/189, 62,6/372.

[025] Código: CWM-N

[026] UV nm: $\lambda_{\text{máximo}} = 220$; IR cm^{-1} (KBr): ν 1615, 1348, 732, 580.

TG/DTA (%massa/temperatura °C): 35,68/400.

[027] Os complexos CWM-N e CWM-S foram submetidos 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 CO₂. Posteriormente as culturas foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida as amostras (CWM-S, CWM-N e os padrões de CDDP e doxorubicina) foram dissolvidas em DMSO (1%) e adicionadas aos poços cuja concentração final foi ficada em 25 µg mL⁻¹. Após 72h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg mL⁻¹) e após de 3h de incubação, os meios de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda fixo de 560 nm.

[028] Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram 73,2 e 47,8%; e de laringe humana foram 51,3 e 49,8%; para os complexos CMW-S e CMW-N, respectivamente.

REIVINDICAÇÕES

1. “QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA” caracterizado por se tratar de dois compostos de coordenação binucleares, contendo em suas estruturas dois centros de platina (II), cujo número de coordenação de cada centro é 4, apresentando ambos os compostos atividade antitumoral.

2. “QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA” conforme reivindicação 1, caracterizados por apresentarem fórmula estrutural generalizada para ambos os quimioterápicos sintetizados, codificados como CWM-S e CWM-N, conforme figura 1 do relatório descritivo.

3. “QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA” conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado pelos ligantes utilizados, (a) ligantes em ponte tetradentados (conectando os dois centros de platina (II) através de dois centros básicos de *Lewis* (dois dentes), em dois extremos da molécula, para cada centro de platina (II)), sendo para o complexo CWM-S os centros básicos (Base de *Lewis*): oxigênio e enxofre, e para o complexo CWM-N os centros básicos (Base de *Lewis*): oxigênio e nitrogênio; bem como, completando a esfera de coordenação dos centros

platínicos, ocorrem dois ligantes monodentados aniônicos X para cada centro Pt(II).

4. “QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA” conforme reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por apresentar fórmula molecular: $(Pt_2X_4Y_2O_4C_{b+n+a}H_{(b+n+a)\pm i})$, onde os substituintes X e Y 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*). Os sub-índices “a”, “b”, e “n” serão maiores que zero; “C” representando os átomos de carbono, e “H” representando os átomos de hidrogênio, onde “i” consiste em termo podendo ser positivo ou negativo, podendo também ser um valor igual ou maior que zero.

5. “QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA” conforme reivindicações 2 e 4, caracterizados por apresentarem, ambos compostos codificados como **CWM-S** e **CMW-N**, fórmulas estruturais e moleculares) aplicáveis e correlacionadas à descrição (generalização estrutural), apresentada na figura 1, e descrição generalizada molecular também presente no relatório descritivo.

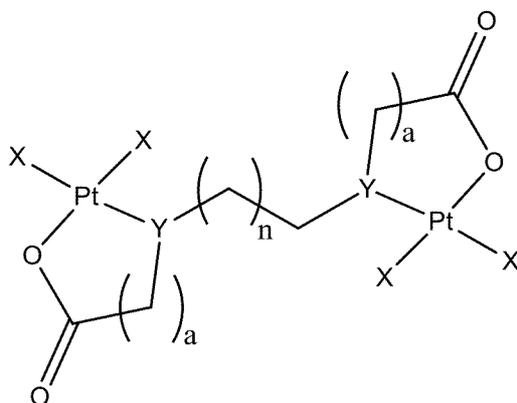


Figura 1.

RESUMO

“QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS A BASE DE PLATINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO CONTRA CARCINOMA DE PULMÃO E DE LARINGE HUMANA”. A presente invenção trata-se de dois compostos de coordenação platínicos, contendo em sua estrutura dois núcleos de platina (II), apresentando estes compostos atividades antitumorais contra carcinoma de pulmão e de laringe humano, consistindo assim, em promissores fármacos a serem aplicados nessa terapêutica. A presente invenção apresenta-se como inovação tecnológica no que tange as características estruturais dos compostos apresentados (a) e seu alto potencial antitumoral contra carcinomas pulmonares e de laringe humana (b). Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram 73,2 e 47,8%; e de laringe humana foram 51,3 e 49,8 %; para os complexos CMW-S e CMW-N, respectivamente.