



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

(21) BR 102018077083-7 A2



(22) Data do Depósito: 26/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 28/07/2020

(54) Título: QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA

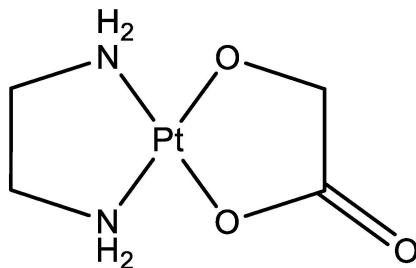
(51) Int. Cl.: A61K 31/282; A61K 33/24; A61P 35/00.

(52) CPC: A61K 31/282; A61K 33/24; 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; MANOELY VIRGINIA DUARTE DE BARROS SILVA; TERESINHA GONCALVES DA SILVA; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR.

(57) Resumo: QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA. A presente invenção trata-se de quimioterápico antineoplásico à base de platina (II), com estrutura análoga à Nedaplatina (composto comercializado). A referida invenção apresenta-se como inovação tecnológica, do ponto de vista sintético e quanto ao campo de sua aplicação (tratamento oncológico). O composto, aqui apresentado como invenção, foi caracterizado através de análise térmica (TGA) e técnicas espectroscópicas entre as quais podemos citar: absorção eletrônica (UV-Vis), espectroscopia infravermelha (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , incluindo para este último caso, técnicas de RMN 2D (HMBC e HSQC). A atividade antitumoral (in vitro), do referido composto, foi avaliada frente às linhagens de células tumorais todas humanas: (i) HEP-2 (carcinoma de laringe), (ii) NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), (iii) MCF-7 (câncer de mama humano) e (iv) HL-60 (leucemia promielocítica aguda); obtendo percentuais de inibições tumorais de 77; 82; 73 e 90 %, respectivamente. Referindo-se aos ensaios in vivo, utilizaram-se camundongos Mus musculus (linhagem Swiss) como modelo animal, para os quais (grupo tratado) inocularam-se na região sub-axilar, células tumorais do tipo carcinoma de Ehrlich (106 células/mL), obtendo-se assim, ao final do tratamento para uma dose preferencial de 1 mg/Kg (...).



“QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo de Invenção

[001] A presente patente de invenção trata-se de um composto de coordenação à base de platina (II), com potencial aplicação na área de saúde, especificamente, como composto quimioterápico para o tratamento do câncer. A referida invenção apresenta em sua estrutura os ligantes glicolato e etileno diamino, compondo a esfera de coordenação primária do íon platina (II) (NC=4), cuja atividade antitumoral comprovada através de modelo animal, camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* com aproximadamente 60 dias de vida, com células tumorais implantadas na região subaxilar do tipo Carcinoma de *Ehrlich*; foi de 76%. A referida invenção poderá configurar regimes quimioterápicos (tratamentos oncológicos) com menores efeitos colaterais, significando um avanço toxicológico, uma vez que o mesmo se enquadrou na categoria 2, segundo análise toxicológica do protocolo OECD 423, sinalizando assim, por exemplo, ser menos tóxico que uma droga mundialmente comercializada como a cisplatina (CDDP).

Sumário

[002] A presente invenção consiste em composto de coordenação mononuclear à base de platina (II) contendo em sua primeira esfera de coordenação dois tipos de ligantes bidentados, sendo um diaminado e outro um carboxilato hidroxilado; possuindo o produto final alto potencial ativo contra células tumorais humanas (ensaio *in vitro*) e células animais do tipo carcinoma de *Erlich* (ensaio *in vivo*). Os percentuais de inibição tumoral, obtidos mediante realização de ensaios *in vitro*, frente às células de: (i) carcinoma de laringe humana, (ii) carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, (iii) câncer de mama humano e (iv) leucemia promielocítica aguda foram 77,1; 81,4; 73,0 e 89,5%, respectivamente. O percentual de inibição tumoral, obtido mediante realização do ensaio *in vivo* foi de 76%.

Anterioridades

[003] O uso de metais na medicina teve início a partir dos estudos realizados por *Paul Ehrlich* no ano de 1908 e em seguida por *Alfred Werner* em 1913. *Paul Ehrlich* foi o primeiro a introduzir a relação entre estrutura e atividade, assim como o conceito de índice terapêutico, quando fez uso de complexos metálicos, em especial de arsênio para preparação de drogas para o tratamento de sífilis; enquanto que *Alfred Werner* desenvolvia teorias que explicassem a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos (*Beraldo, L. Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal. Química nova na escola, 6 (2005)*).

[004] O uso de compostos de platina como importantes agentes terapêuticos na área medicinal surgiu a partir da descoberta casual da atividade antitumoral da *cis*-diclorodiaminoplatina (II), comumente conhecida como cisplatina (CDDP), a partir de estudos desenvolvidos pelo professor *Rosenberg Barnett* e colaboradores na Universidade do Estado de Michigan, nos Estados Unidos. A evidência da propriedade antitumoral da cisplatina só foi estabelecida cerca de um século após serem sintetizadas pela primeira vez. A partir do estudo sobre a influência do campo elétrico com a utilização de eletrodos de platina sobre o crescimento de colônias de bactérias do tipo *Escherichia coli*, *Rosenberg Barnett* observou que a divisão celular era inibida de tal forma que as bactérias, as quais se apresentavam normalmente na forma de bastonete, agora cresciam formando filamentos alongados.

[005] As propriedades antitumorais dos fármacos contendo platina podem ser explicadas a partir da cinética das reações de substituição de seus ligantes. Acredita-se que alvos primários sejam espécies doadoras de nitrogênio nos núcleos- bases do nDNA. As ligações formadas entre o íon metálico e essas bases devem ser suficientemente duradouras para interferir no processo de divisão celular ou para acionar os mecanismos intracelulares que reconhecem danos irreparáveis a uma célula. O medicamento à base de metal que é injetado deve sofrer, em um período de tempo relativamente curto, uma seqüência de reações que permita que os grupos de saída do composto inicial sejam substituídos por moléculas de água, que são mais suscetíveis a substituição pelas bases do nDNA. Ligações entre os átomos de nitrogênio do núcleo-base e a platina cumprem claramente este requisito dinâmico (*Kelland, L. R.;*

Farrell, N. P. Platinum-based drugs in cancer therapy. Humana Press, New Jersey, 2000)
(Lippert, B. Cisplatin Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Verlag Helvetica Chimica Acta, Postfach, Switzerland, 1999).

[006] A atividade anticancerígena da cisplatina foi testada em camundongos, e verificou-se de acordo com resultados preliminares que inibia o sarcoma 180 e leucemia L120. *Rosenberg, Van camp e Krigas* reportaram em trabalhos a regressão de tumores grandes em 63 a 100% dos animais (*Rosenberg, B.; Camp, L.; The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. Cancer Research, 30 (1970) 1799-1802*). A partir dos testes realizados, a cisplatina entrou em testes clínicos de fase I no ano de 1971, sendo submetida a testes clínicos, inicialmente em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados, como câncer de testículo e ovário. A cisplatina teve seu uso aprovado para o tratamento de câncer em 1978 pela *Food Drug and Administration (FDA)*.

[007] A partir do sucesso da cisplatina como fármaco utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer, novos fármacos passaram a ser sintetizados a fim de diminuir os efeitos colaterais que o uso da cisplatina traz aos pacientes, bem como solucionar o problema da resistência a múltiplas drogas. Nesse sentido, análogos a cisplatina, ou seja, compostos com semelhança nos ligantes coordenados ao íon platina, passaram a ser desenvolvidos.

[008] Entre esses análogos, destaca-se a nedaplatina, fármaco de 2ª geração, tem uso restrito apenas ao Japão e foi desenvolvida pela *Shionogi Pharmaceutical Company* no ano de 1983 com o objetivo de reduzir as toxicidades induzidas pela cisplatina, tais como nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal (*Shimada, M.; Itamochi, H.; Kigawa, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. Cancer Management and Research, 5 (2013) 67-76*). Diferindo da cisplatina apenas pela substituição do grupo de saída, neste caso, o ligante bidentado glicolato, a nedaplatina possui mecanismo de ação semelhante ao da cisplatina.

[009] Considerada como sendo 10 vezes mais solúvel que a cisplatina, a nedaplatina é significativamente menos nefrotóxica quando comparada com a cisplatina e carboplatina. Somado a isso, segundo diretrizes de prática clínica da *Japan Society of Clinical Oncology*, a nedaplatina é relatada como tendo um risco emético

moderado nas diretrizes de prática clínica, enquanto que a cisplatina, de acordo com as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network*, é classificada como tendo um alto risco de emese, ou seja, expulsão do conteúdo gástrico pela boca e/ou nariz, mais conhecido como vômito. Em contrapartida, efeitos colaterais como mielossupressão; leucopenia, quantidade da taxa sanguínea de leucócitos inferior ao limite da normalidade; trombocitopenia, redução do número de plaquetas no sangue e a anemia são responsáveis pela toxicidade limitante da dose de nedaplatina.

[010] Desde sua aprovação em 1995, a nedaplatina tem sido utilizada no tratamento de NSCLC, SCLC, câncer esofágico, câncer do colo do útero, câncer de bexiga, cabeça e pescoço.

[011] Atualmente, o desenvolvimento de candidatos a fármacos antitumorais platínicos faz uso de conhecimentos estruturais aliados a propriedades de fármacos comerciais, como solubilidade e toxicidade. Diante disso, diversos trabalhos buscam estabelecer relações entre o já proposto na clínica oncológica e inovações sintéticas que possam minimizar efeitos colaterais atrelados a farmacocinética e farmacodinâmica.

[012] Na patente BR102016011642—2 A2 é descrita o desenvolvimento de um composto de coordenação de platina (II), contendo dois ligantes, sendo um desses bidentado. A presente invenção se diferencia desta do ponto de vista estrutural, por apresentar em sua estrutura ligantes diferentes, e com relação a atividade antitumoral apresentada. A vantagem da presente invenção está atrelada ao custo dos reagentes envolvidos, que são menores, e ao processo sintético que apresenta maiores rendimentos.

[013] Na patente BR 102016000688-0 A2 são descritas a síntese de dois complexos de platina binucleares com atividades antitumorais contra carcinoma de pulmão e de laringe humano. A presente invenção apresenta diferenças estruturais dos ligantes, assim como a presença de apenas um sítio platínico, que confere a nossa invenção menor toxicidade.

[014] Todas as demais patentes desenvolvidas pelo nosso grupo sobre complexos de platina (II) apresentam diferenças estruturais, conferindo inovação no complexo da presente invenção, assim como, atividades antitumorais distintas.

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

[015] Entre os fármacos à base de platina, disponível no mercado sabe-se que todos apresentam expressivos efeitos colaterais, adjunto a isso é de conhecimento comum que a cisplatina (CDDP) e carboplatina (CBDCA) apresentam resistência cruzada, ou seja, os portadores de câncer submetidos a algum regime quimioterápico que contenham a CDDP e que, porventura, os tumores se tornem resistentes, os mesmos apresentarão também resistência ao uso da CBDCA, uma vez que ambas as drogas são dependentes da produção de proteínas do reparo de emparelhamento (*MisMatch Repair Proteins – MMR Proteins*) das bases nitrogenadas presentes no nDNA para o desencadeamento da apoptose (ação antimitótica por parte do quimioterápico), e sendo assim, uma vez que a resistência é expressa por parte das células tumorais, as mesmas diminuem a produção das proteínas MMR, impedindo a formação de composto de coordenação (envolvendo o centro ácido de platina (II), o nDNA e a proteína MMR) o qual é responsável direto pelo desencadeamento da apoptose (*Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic, E. Mol. Cancer Ther. 1, (2002) 227–235*).

[016] A presente invenção apresenta vantagens com relação ao fenômeno MDR, pois não apresenta correlação estrutural com a CDDP e CBDCA; isso minimiza possíveis contribuições da resistência cruzada para o insucesso de terapias futuras utilizando o complexo apresentado.

Objetivos da Invenção

[017] O objetivo da presente invenção é apresentar um composto antitumoral à base de platina (II) que seja solúvel em água, que apresente uma resposta biológica (inibidor de mitose) eficiente frente a algumas linhagens de células tumorais e que apresente um perfil toxicológico menos danoso quando comparado a algum padrão à base de platina (II), que já se configura como droga disponível no mercado.

Solução

[018] A presente invenção apresenta-se como um potencial quimioterápico a ser aplicado para o tratamento do câncer, constituindo uma alternativa viável na terapêutica do câncer. Em sua constituição se apresenta como um novo complexo de platina (II) o qual foi capaz de inibir, de maneira satisfatória, células tumorais humanas de carcinoma de laringe humana, carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, câncer de mama humano e leucemia promielocítica aguda, obtendo percentuais de inibições tumorais de 77, 82, 73 e 90%, respectivamente. Também foi capaz de inibir o crescimento celular do carcinoma de *Erlich*, implantado em camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, alcançando percentual de inibição antitumoral de 76 %.

Vantagens

[019] Ao ser comparado ao resultado do padrão quimioterápico disponível no mercado, a CDDP, em ensaios (*in vivo*), a presente invenção apresentou maior atividade antitumoral 76% quando comparado ao padrão que apresentou atividade de 59 %. Em ensaios *in vitro*, a presente invenção foi comparada ao padrão doxorrubicina, através do teste com quatro linhagens de células humanas, o composto proposto apresentou significativa atividade citotóxica, 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 HEP-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda). Os resultados para as atividades citotóxicas estão sumarizados na Tabela 1.

[020] Tabela 1. Resultados obtidos no teste de citotoxicidade da doxorrubicina e do complexo sintetizado, codificado como (MWM), frente a algumas linhagens de células tumorais humanas.

Compostos								
testados	NCI-H292	SEM*	HEP-2	SEM	MCF-7	SEM	HL-60	SEM
Doxorrubicina	70,1	0,5	52,6	3,7	73,2	0,6	81,3	2,0
MWM	82,0	1,3	77,0	3,1	73,0	0,9	90,0	0,0

* SEM = Desvio padrão.

[021] O complexo MWM apresentou maior percentual de inibição frente às linhagens celulares de tumores humanos de NCI-H292, HEP-2 e HL-60, quando comparado com a doxorrubicina, fármaco já disponibilizado no mercado mundial. Com relação à linhagem MCF-7 o composto apresentado na presente invenção não apresentou diferenças significativas com relação ao fármaco doxorrubicina.

Descrição Detalhada

[022] O procedimento de síntese adotado para a obtenção da presente invenção, o complexo codificado como MWM, foi satisfatório uma vez que a rota sintética adotada apresentou rendimento reacional superior a 80%. O complexo MWM foi submetido a algumas técnicas de caracterização, tais como: espectroscopia de absorção eletrônica; espectroscopia no infravermelho e 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.

[023] Legenda da Figura 1.

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

[025] Os ligantes utilizados, (i) ligante bidentado neutro (1,2-diaminoetano) e (ii) ligante bidentado aniônico (glicolato), completam a esfera de coordenação do íon Pt(II) , que é igual a 4.

[026] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica, obtidos para o composto de coordenação, o qual foi utilizado como quimioterápico, encontram-se descritos abaixo:

[027] UV nm: $\lambda_{\text{máximo}}$ = 290 e 330 (transições $n \rightarrow \pi^*$ e $d \rightarrow d$); IR cm^{-1} (KBr): ν 1100, 1383, 1610, 1648, 2980, 3273, 3500. RMN ^1H (δ , ppm, D_2O): 2,64- 2,29 (m); 4,11- 3,96 (m). RMN ^{13}C (δ , ppm, D_2O): 183,12 (carbonila); 60,23 (CH_2); e 48,47 (CH_2). RMN ^{195}Pt (δ , ppm, D_2O): -1910.

[028] O composto MWM teve sua citotoxicidade avaliada na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ frente às linhagens de células tumorais humanas HEP-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda). 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 (complexo MWM e o padrão de 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. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. O complexo MWM foi capaz inibir, de maneira satisfatória, células tumorais humanas de carcinoma de laringe humana, carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, câncer de mama humano e leucemia promielocítica aguda, obtendo percentuais de inibições tumorais de 77, 82, 73 e 90%, respectivamente.

[029] Os percentuais de inibição tumoral, para os ensaios *in vivo*, foram calculados segundo Equação, $TWI\% = [(C - T) / C] \times 100$, 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 *Erllich*; para a qual tomaram-se as massas médias dos tumores extraídos do grupos: tratado e controle.

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

REIVINDICAÇÕES

1. “QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA” **caracterizado por** se tratar de um complexo de platina II, contendo em sua estrutura um centro (núcleo) de platina com estado de oxidação (2+) e número de coordenação 4, apresentando este composto atividade antitumoral.
2. “QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA” conforme reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar fórmula estrutural do quimioterápico sintetizado, codificado como MWM, conforme figura 1 do relatório descritivo.
3. “QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA” conforme reivindicações 1 e 2, **caracterizado pela** atividade antineoplásica mediante sua administração, via intraperitoneal, em uma faixa de 0,1 a 20,0 mg Kg⁻¹, incluindo-se os limites.
4. “QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA” conforme reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** apresentar alta solubilidade em água, podendo ser utilizado via oral, intraperitoneal e intravenoso.
5. “QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA” conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizado pelo** composto poder ser usado no tratamento do câncer.

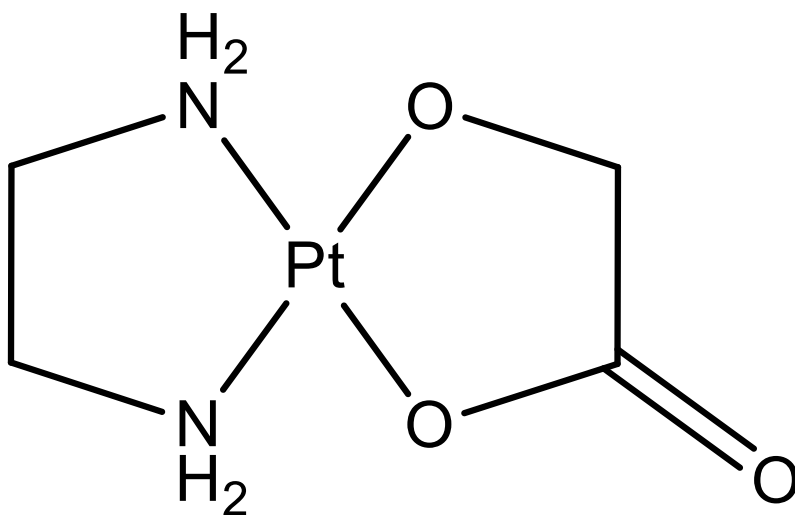


Figura 1

RESUMO

“QUIMIOTERÁPICO ANTITUMORAL À BASE DE PLATINA ANÁLOGO À NEDAPLATINA”.

A presente invenção trata-se de quimioterápico antineoplásico à base de platina (II), com estrutura análoga à Nedaplatina (composto comercializado). A referida invenção apresenta-se como inovação tecnológica, do ponto de vista sintético e quanto ao campo de sua aplicação (tratamento oncológico). O composto, aqui apresentado como invenção, foi caracterizado através de análise térmica (TGA) e técnicas espectroscópicas entre as quais podemos citar: absorção eletrônica (UV-Vis), espectroscopia infravermelha (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , incluindo para este último caso, técnicas de RMN 2D (HMBC e HSQC). A atividade antitumoral (*in vitro*), do referido composto, foi avaliada frente às linhagens de células tumorais todas humanas: (i) HEp-2 (carcinoma de laringe), (ii) NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), (iii) MCF-7 (câncer de mama humano) e (iv) HL-60 (leucemia promielocítica aguda); obtendo percentuais de inibições tumorais de 77; 82; 73 e 90 %, respectivamente. Referindo-se aos ensaios *in vivo*, utilizaram-se camundongos *Mus musculus* (linhagem Swiss) como modelo animal, para os quais (grupo tratado) inocularam-se na região sub-axilar, células tumorais do tipo carcinoma de *Ehrlich* (10^6 células/mL), obtendo-se assim, ao final do tratamento para uma dose preferencial de 1 mg/Kg um percentual de inibição de 76%. Vale salientar que toda experimentação animal e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e uso de animais da UFPE, sob a licença nº 23076.030363/2017-48.