

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 033604-1 A2



(22) Data de Depósito: 16/10/2013

(43) Data da Publicação: 28/07/2015
(RPI 2325)

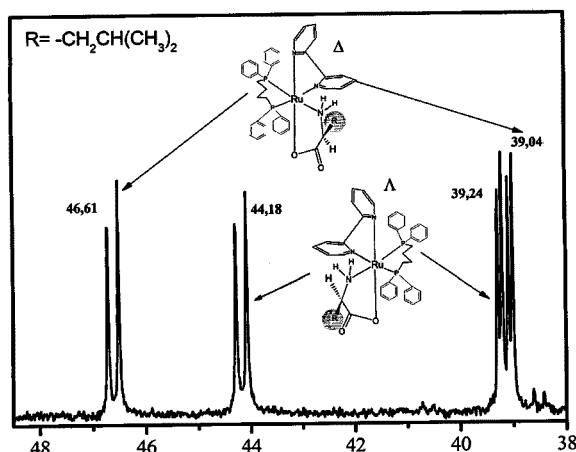
(54) **Título:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE DERIVADOS DE RUTÊNIO DIVALENTE E USO DAS MESMAS

(51) **Int.Cl.:** A61K31/28; A61P35/00

(73) **Titular(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(72) **Inventor(es):** ALINY PEREIRA DE LIMA, ALZIR AZEVEDO BATISTA, ANGELICA ELLEN GRAMINHA, EDJANE ROCHA DOS SANTOS, ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA, FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO, HELLEN KARINE PAES PORTO, JORDANA RIBEIRO SOARES, MARCIO AURÉLIO PINHEIRO ALMEIDA

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE DERIVADOS DE RUTÊNIO DIVALENTE E USO DAS MESMAS São descritas composições farmacêuticas à base de derivados de rutênio divalente, as composições compreendendo: a) compostos de fórmula geral $[Ru(AA)(N-O)(P-P)(N-N)]X$ onde o íon $Ru(II)$ é combinado a um amino ácido, fosfinas e derivados bipyridina, e onde X é o íon hexafluoreto de fósforo, cloreto, acetato e nitrato, além de ligantes diimínicos e fosfínicos e b) um veículo farmacologicamente aceitável. igualmente descrito o uso das composições da invenção em um medicamento para tratar câncer.



COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE DERIVADOS DE RUTÊNIO DIVALENTE E USO DAS MESMAS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo das composições
5 farmacêuticas com aplicação em medicamentos para tratar câncer, mais
especificamente, a composições farmacêuticas à base de derivados de
rutênio divalente para serem usadas em medicamentos para tratar vários
tipos de câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 A palavra câncer tem origem no latim, cujo significado é caranguejo.
Esse nome foi dado à doença porque se refere a um processo em que as
células doentes atacam e se infiltram nas células sadias como se fossem
tentáculos de um caranguejo. Esta doença tem um período de evolução
duradouro, podendo, muitas vezes levar anos para evoluir até ser
15 descoberta, vide Denis, L. K.; e Antonio, S. F., *Medicina interna*. McGraw-
Hill: Rio de Janeiro, 2006; p 1565.

Já foram identificados mais de cem tipos de câncer, sendo que a
maioria tem cura (benignos), desde que identificados num estágio inicial e
tratados de forma correta. O câncer é uma doença causada por uma série
20 de mutações somáticas do DNA, que é caracterizada por uma população
de células que crescem e se dividem, sem respeitar os limites normais,
invadindo e destruindo tecidos adjacentes, podendo se espalhar para
lugares distantes do corpo através de um processo chamado metástase.
Também podem originar-se de erros aleatórios de replicação, exposição a
25 carcinógenos ou defeitos por reparos de DNA. O câncer é a causa de
cerca de 7,1 milhões de mortes por ano em todo mundo, o que representa
12,6 % de todas as mortes, sendo o câncer de pulmão, estômago, fígado,
cólon e mama os que mais matam. O câncer é também a segunda doença
que mais mata no Brasil, perdendo apenas para doenças do sistema

circulatório. Quase todos os cânceres são causados por anomalias no material genético de células transformadas. Atualmente, a medicina dispõe da radioterapia, quimioterapia e de cirurgias para combater a doença. Quando se faz necessária a retirada do tumor, a cirurgia é o procedimento mais adequado.

A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X) é também outra forma de tratamento utilizada para o tratamento de células cancerígenas. Porém, este procedimento tem efeitos colaterais como, por exemplo, queimaduras na pele provocada pela passagem da radiação.

A quimioterapia é um procedimento que visa, através da administração de drogas, impedir a divisão células cancerígenas. A Tabela 1 a seguir lista os principais agentes tumorais utilizados no momento. Esse procedimento também tem efeitos colaterais como, por exemplo, náusea, vômito, queda de cabelos, dentre outros listados na Tabela 1.

Nos casos de câncer de mama e de próstata é usada a hormonoterapia, pois estes tipos de tumores são sensíveis à ação de determinados hormônios.

20

25

TABELA 1

Agentes antitumorais		
Fármaco		Efeitos tóxicos
Ciclofosfamida	Mama, ovário, linfoma, leucemia, pulmão	Supressão da medula óssea, náuseas, vômitos, queda de cabelos, hematúria
Doxorrubicina	Mama, pulmão, linfoma	Náuseas/vômitos, miocardiopatia, estomatite, supressão da medula óssea
Vincristina	Linfoma, pulmão, leucemia	Neuropatia periférica
Cisplatina	Pulmão, bexiga ovário, cólon uterino, cabeça e pescoço	Náuseas, Neuropatia, Auditivos, Plaquetas > leucócitos da medula óssea, problemas renais
Carboplatina	Ovário, pulmões	Plaquetas > leucócitos da medula óssea, Náuseas, problemas renais (altas doses)
Oxaliplatina	Intestino	Náuseas, neuropatia Anemia
Trióxido de arsênio	Leucemia	Neuropatia periférica, dor musculoesquelético, hiperglicemia

A química dos fármacos inorgânicos teve sua origem após os trabalhos de Paul Ehrlich, prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia de 1908, e de Alfred Werner, prêmio Nobel em Química em 1913. Paul Ehrlich é considerado o fundador da quimioterapia. Ele introduziu a relação estrutura e atividade de compostos inorgânicos pela primeira vez e usou o arsênio para preparar drogas para o tratamento de sífilis.⁵

Embora Paul Ehrlich tenha sido o primeiro a fazer o uso de compostos de metais na farmacologia, foi somente em 1965, após a descoberta feita pelo físico Barnett Rosenberg, a respeito das propriedades de inibição de divisão celular de bactérias por compostos de

platina, vide Farrell, N. "Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview". *Coord. Chem. Rev.*, **232**: 1, 2002, que a química medicinal inorgânica deu um grande salto. Rosenberg testou vários compostos de platina, sendo que o *cis*-[(diaminodichloro)platina (II)] (cisplatina) tornou-se fármaco no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o de testículo, ovários e outros. Após o uso da cisplatina como droga no tratamento do câncer de testículo, foi registrada em 1978 uma diminuição de cerca de 80% na morte de homens com este tipo de câncer.

A química inorgânica medicinal tem sido estimulada pelo sucesso do composto de platina e seus derivados. Atualmente as pesquisas em metalodrogas têm proporcionado um grande aumento de compostos com propriedades antitumorais, vide Hall, I. H.; et al., "Cytotoxicity of copper and cobalt complexes of furfural semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives in murine and human tumor cell lines". *Pharmazie*, **55**: 937, 2000; Kopf-Maier e P.; Kopfs, H. "Non-platinum-group metal antitumor agents: history, current status, and perspectives". *Chem. Rev.*, **87**: 1137, 1987; Souza, A. R. et al.; "Water-soluble rhodium(II) carboxylate adducts: Cytotoxicity of the new compounds". *J. Inorg. Biochem.*, **64**: 1, 1996; Jin, V. X.; Ranford, J. D. "Complexes of platinum(II) or palladium(II) with 1,10-phenanthroline and amino acids". *Inorg. Chim. Acta*, **304**: 38, 2000; Ma, D. L. et al.; "DNA binding and cytotoxicity of ruthenium(II) and rhenium(I) complexes of 2-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine". *Inorg. Chem.*, **46**: 740, 2007; Mestroni, G. et al.; "Water-soluble ruthenium(III)-dimethyl sulfoxide complexes: chemical behaviour and pharmaceutical properties". *Met Based Drugs.*, **1**: 41, 1994.

Os compostos de metais de transição, de modo similar aos complexos de platina, representam uma classe muito importante de compostos quimioterapêuticos. A quimioterapia com complexos de platina

é um dos principais métodos de combate ao câncer nos dias atuais, tais como câncer de testículo, pulmão, útero e ovário. No entanto, durante o tratamento, devido à toxicidade desses compostos, vários efeitos colaterais são sentidos pelo paciente, tais como náuseas, vômitos, queda
5 de cabelo, e até problemas de neurotoxicidade.

Complexos de rutênio têm sido muito estudados como uma nova alternativa de agentes anticancerígenos, vide os artigos por Ang, W. H. et al.; "Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action". *J. Organomet. Chem.*, **696**: 989, 2011; Alberto, R.
10 "Medicinal inorganic chemistry". *Chimia*, **61**: 691, 2007; e Sava, G. et al.; "Antitumour Properties Of Dimethylsulfoxide Ruthenium(II) Complexes In The Lewis Lung-Carcinoma System". *Pharmacol. Res.*, **21**: 617, 1989.

Estes compostos possuem uma atividade anticancerígena superior à da cisplatina, além do mais, estes possuem uma menor toxicidade, pois o
15 rutênio é menos tóxico que a platina, vide Jayaraju, D. et al.; "Topoisomerase II is a cellular target for antiproliferative cobalt salicylaldehyde complex". *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**: 68, 1999.

A síntese de complexos de rutênio é bem desenvolvida, principalmente para compostos imínicos e amínicos, sendo que estes têm
20 sido oferecidos como uma nova alternativa de fármacos, vide Clarke, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.*, **232**: 69, 2002.

Complexos de rutênio apresentam a capacidade de sofrer hidrólise e, portanto se ligando no DNA. Além do mais, alguns compostos de rutênio mostram-se também eficientes em reações de intercalação à molécula de
25 DNA, vide Novakova, O. et al.; "DNA interactions of dinuclear Ru(II) arene antitumor complexes in cell-free media". *Biochem. Pharmacol.*, **77**: 364, 2009; e Kuwabara, T. et al.; "Classification of DNA-binding mode of antitumor and antiviral agents by the electrochemiluminescence of ruthenium complex". *Anal. Biochem.*, **314**: 30, 2003.

Três fatores básicos favorecem o rutênio como um forte candidato, dentre outros metais de transição, a uma provável nova série de compostos anticancerígenos, que são, (1) o fácil manuseio na troca de ligante, (2) facilidade de obtenção de compostos estáveis de estados de oxidação II, III, e (3) semelhança de sua química com ferro.

A semelhança do rutênio com o ferro evidencia um mecanismo de ação similar ao de transporte de metais de transição não tóxicos como o ferro, ligando-se a biomoléculas, o que faz com que este tenha uma menor toxicidade, vide Fontes, A. P. et al.; "Química inorgânica na terapia do câncer". *Cad. Tem. Quím. Nova Esc.*, **6**: 13, 2005.

Complexos de rutênio (III) provavelmente podem ser transportados pela transferrina, albumina ou alguma outra biomolécula tendo como alvo o DNA, vide Rosette, M. R., *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*. John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2002; p 670.

Clarke e colaboradores em seus estudos mostraram que compostos como $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ e *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ atuam como agentes anticancerígenos Collery, P.; "Gallium in cancer treatment". *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, **42**: 283, 2002 e Brabec, V.; NOVAKOVA, O. "DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity". *Drug Resist. Update*, **9**: 111, 2006 e podem ser transportados para o interior da célula pela transferrina, vide artigo citado acima de Ma, D.L. et al.; "DNA binding and cytotoxicity of ruthenium(II) and rhenium(I) complexes of 2-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine". *Inorg. Chem.*, **46**: 740, 2007.

Numerosos compostos de rutênio com propriedade anticancerígena são conhecidos, porém de muitos somente o *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\text{ImH}$ (NAMI-A) e *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{ImdH}$ (KP1019), vide Serli, B. et al.; "Coordination and release of NO by ruthenium-dimethylsulfoxide complexes - implications for antimetastases activity". *Coord. Chem. Rev.*,

245: 73, 2003 são os mais recentes sucessos de drogas anticâncer de rutênio (III). Devido à sua alta citotoxicidade, estes já estão na fase 3 de testes clínicos, no Instituto de Câncer Netherlands em Amsterdam.

Vários artigos de compostos de rutênio têm sido publicados pelo grupo de pesquisa que inclui os inventores do presente pedido, (Poelhsitz, G. et al.; "Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac- RuCl₃(NO)(dppf), dppf=1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene". *Polyhedron*, 26: 4707, 2007.; Dos Santos, Edjane R., et al., New ruthenium (II)/phosphines/diimines complexes: promising antitumor (human breast cancer) and Mycobacterium tuberculosis fighting agents. *Polyhedron*, v. 51, p. 292-297, 2013) revelando um alto potencial terapêutico desses compostos no combate ao câncer. Estudos em compostos como [RuCl₂NO(BPA)] e fac-[RuCl₃(NO)(dppf)] têm revelado bastante citotoxicidade em linhagens de células cancerígenas. Tais estudos sugerem que o mecanismo de atuação possivelmente tem origem na interação e/ou ligação do composto com o DNA, causando a fragmentação de moléculas biológicas e tendo como consequência a morte programada da célula (apoptose), vide Heinrich, T. A. et al.; "A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action". *Eur. J. Med. Chem.*, **46**: 3616, 2011 e Von Poelhsitz, G. et al.; "Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-RuCl₃(NO)(dppf) , dppf=1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene". *Polyhedron*, **26**: 4707, 2007.

Compostos contendo N, S e O como átomos doadores de elétrons têm um importante papel na atividade biológica como anticâncer e antiviral, vide Masoud, M. S. et al.; "Synthesis and characterization of some

pyrimidine, purine, amino acid and mixed ligand complexes". *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **69**: 230, 2008.

Os aminoácidos podem se coordenar aos metais de transição como ligantes bi, tri e tetradentados, N-O, S-N-O, S-S-N-O. vide Allardyce, C. S.;
 5 Dyson, P. J. "Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects". *Platinum Metals Rev.*, **45**: 62, 2001 e Sheldrick, W. S.; Exner, R. "Preparation And Structural Characterization Of Ruthenium(II) Complexes Of The Peptides Diglycine And Triglycine". *Inorg. Chim. Acta*, **184**: 119, 1991.

10 Embora alguns compostos de rutênio com aminoácidos sejam encontrados na literatura, como citado no artigo de Sheldrick, W. S e Exner, R. citado acima, e um artigo adicional pelos mesmos autores Sheldrick, W. S e Exner, R. "Reaction Of $RuCl_2(PPh_3)_3$ With Alpha-Amino-Acids - Synthesis And X-Ray Structural Characterization Of The Schiff-
 15 Base Complexes ($Ru(CH_3)_2C-Nch(H)COO_2(PPh_3)_2$), $Ru(CH_3)_2C-Nch(CH_3)COO_2(PPh_3)_2$ ". *Inorg. Chim. Acta*, **175**: 261, 1990, nada tem se apresentado em termos de atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas.

O sistema biológico apresenta sistema de renovação de células,
 20 processo este chamado de apoptose (morte programada). Nas células cancerígenas essa função não é ativada de forma controlada como é feito nas células normais, pois quantidades descontroladas de células cancerígenas vão se reproduzindo, sem que haja o processo de apoptose. O mecanismo de morte da célula pode ocorrer de duas maneiras:
 25 apoptose e/ou necrose. Apoptose caracteriza-se por retração celular, fragmentação do DNA nuclear, perda da aderência com a matriz extracelular, formação de corpos apoptóticos e fagocitose desses corpos por macrófagos, principalmente. É um processo altamente controlado.

A necrose caracteriza-se por ser um processo de morte celular acidental induzida por lesões agudas, que leva a uma resposta inflamatória durante o qual o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas. Além do mais, após a morte das células, várias biomoléculas são liberadas (DHL), ou ativadas (caspases) as quais são poderosas ferramentas que auxiliam os estudos na busca de novos fármacos no combate ao câncer.

A Tese de Mestrado em Química Inorgânica de Márcio Aurélio P. Almeida, "Complexos de Rutênio contendo aminoácidos com propriedades citotóxicas em células tumorais", UFSCar, 2009, descreve a preparação dos compostos utilizados nas presentes composições. No estudo descrito na referida Tese de Mestrado os testes se limitaram à linhagem MDA-MB-231. Portanto, tais estudos não antecipam os resultados obtidos com as linhagens de células descritas no presente pedido.

A literatura de patentes apresenta vários documentos que tratam de compostos de rutênio divalente como composto ativo para o tratamento de câncer.

Assim, o pedido brasileiro publicado BR0712715-4 A2 descreve um composto de rutênio, composição farmacêutica e uso do composto, além do método de tratamento de um indivíduo sofrendo de câncer com auxílio do dito composto e composição.

O pedido brasileiro publicado BR0708596-6 trata de um composto de rutênio (II) conforme a fórmula apresentada (I), em que X é halo ou um ligante doador de O, N ou S neutro ou negativamente carregado; Y é u contra-íon; m é 0 ou 1; q é 1, 2 ou 3; A é $(^{Ru}-NR^{N1}R^{N2}-R^{N3(N)})$, onde R^{N1} e R^{N2} são independentemente selecionados dentre H, C_{1-7} alquila, C_{3-20} heterociclo e C_{5-20} arila opcionalmente substituídas, e R^{N3} é C_{1-2} alquilenos, ou (ii) um anel aromático C_{5-6} contendo nitrogênio, em que o átomo de anel de nitrogênio é ligado ao átomo de rutênio, e o anel é também ligado ao

azo-nitrogênio, ou por uma ligação simples em que a ligação é α ou β para o anel de nitrogênio, ou por um grupo $-\text{CH}_2$ em que a ligação é α para o átomo de anel de nitrogênio; B é C_{1-7} alquila, C_{3-20} heterociclo ou C_{5-20} arila opcionalmente substituída.

5 A patente U.S. 6.936.634 descreve compostos úteis no tratamento de câncer, os compostos sendo de acordo com a fórmula (I) onde R^1 e R^2 junto com o anel ao qual estão ligados representam um grupo saturado ou insaturado carbocíclico ou heterocíclico.

A patente U.S. 5.409.893 trata de complexos de coordenação com
10 Ru(III) como metal central ligado a um ligante heterocíclico na posição apical trans a um sulfóxido e a suas composições farmacêuticas úteis em terapia antitumoral seja de modo isolado ou em combinação com complexos de platina.

Seria, portanto, interessante para a técnica dispor de compostos
15 contendo o íon rutênio divalente com boas atividades antitumorais, que possam atuar como agentes citotóxicos em linhagens celulares derivadas de tumores humanos, os compostos sendo por outro lado pouco tóxicos para os macrófagos. Tendo em vista o alto grau de citotoxicidade em células normais exibido pelos fármacos hoje usados no tratamento de diversos
20 tipos de câncer o mercado aguarda novos fármacos com baixo grau de toxicidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo amplo, as composições farmacêuticas à base de
derivados de rutênio divalente compreendem compostos onde o íon Ru(II)
25 é combinado ao íon hexafluoreto de fósforo, cloreto, acetato e nitrato, além de ligantes diimínicos e fosfínicos e um veículo farmacologicamente aceitável.

Os compostos de rutênio possuem boas atividades antitumorais em relação ao composto comercial, cis-platina (*cis*-[Pt(NH₃)Cl₂]).

O uso das composições farmacêuticas é para preparar medicamentos para tratar vários tipos de câncer.

A invenção provê portanto composições farmacêuticas á base de compostos de Rutênio (II) obtidos pela reação dos precursores do tipo *cis*-
5 [RuCl₂(P)₂(N-N)] com aminoácidos (AA).

A invenção provê também composições farmacêuticas á base de compostos de Rutênio (II) com boas atividades antitumorais, com atuação como agentes citotóxicos em linhagens celulares derivadas de tumores humanos.

10 A invenção provê também composições farmacêuticas á base de compostos de Rutênio (II), os compostos de Rutênio (II) sendo por outro lado pouco tóxicos para os macrófagos.

A invenção provê ainda composições farmacêuticas á base de compostos de Rutênio (II) úteis na preparação de medicamentos para o
15 tratamento de vários tipos de câncer em humanos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 anexa é um espectro de RMN ³¹P{¹H} de diastereoisômeros Λ, Δ -[Ru(Leu)(dppb)(bipy)]PF₆ em CH₂Cl₂/D₂O.

20 A FIGURA 2 anexa é um espectro de dicroísmo circular de diastereoisômeros; (a) (----) Δ -[Ru(Ser)(dppb)(bipy)]PF₆ e (b) (-) Λ -[Ru(L-Ser)(dppb)(bipy)]PF₆ em metanol.

A FIGURA 3 anexa ilustra a estrutura cristalina para os diastereoisômeros de Λ, Δ -[Ru(Leu)(dppb)(bipy)]PF₆ mostrando a numeração dos átomos e as elipsóides de 50 % de probabilidade.

25 A FIGURA 4 anexa é um espectro de RMN ³¹P{¹H} de [Ru(AA)(N-O)(P-P)(N-N)]X: (a) [Ru(Gly)(P-P)(N-N)]X, (b) [Ru(Trp)(P-P)(N-N)]X, (c) [Ru(Met)(P-P)(N-N)]X e (d) [Ru(Ala)(P-P)(N-N)]X.

A FIGURA 5 anexa é um Voltamograma de pulso diferencial de [Ru(N-O)(P-P)(N-N)]X: FIGURA 5A: a-[RuCl₂(P-P)(N-N)]; b-[Ru(Met)(P-

P)(N-N)]X, FIGURA 5B: [Ru(Gly)(P-P)(N-N)]X, FIGURA 5C: [Ru(Ala)(P-P)(N-N)]X e FIGURA 5D: [Ru(Trp)(P-P)(N-N)]X.

A FIGURA 6 anexa é uma curva dose-resposta para a determinação de IC₅₀ para [RuAla] (tempo de exposição de 48 horas; concentrações: 0,2
5 -200 µM): A) Determinação da Viabilidade celular da linhagem tumoral B15-F10; B) Determinação da Viabilidade celular da linhagem basal de L-929. Os resultados são expressos pela média ± o desvio padrão (SDs) de 3 experimentos independentes.

A FIGURA 7 anexa é um gráfico de barras que mostra a avaliação
10 de dano à membrana plasmática das células tumorais B16-F10 por quantificação da liberação de DHL nas concentrações de 20 e 40µM no tempo de exposição de 48 horas. Diferenças significativas em relação ao controle não tratado são indicadas por **p<0,01.

A FIGURA 8 anexa é um gráfico de barras que mostra a avaliação
15 do mecanismo de morte da linhagem B16-F10, nas concentrações de 10 e 20µM quando expostas ao composto RuAla, avaliado por citometria de fluxo. Os resultados são expressos pela média ± o desvio padrão (SDs) de 3 experimentos independentes. Diferenças significativas em relação ao controle não tratado são indicadas por ***p < 0.001.

A FIGURA 9 anexa é um gráfico de barras que mostra a análise da
20 Cinética do Ciclo Celular. Avaliação da interferência do composto RuAla nas concentrações de 10, 20 e 40µM frente à linhagem tumoral B16-F10. Tempo de exposição ao tratamento 48 horas. Todas as concentrações interferem na cinética do ciclo celular da linhagem testada, promovendo um arraste para a fase G1. Diferenças significativas em relação ao
25 controle não tratado são indicadas por * p<0,05 e ** p<0,01.

A FIGURA 10 anexa é um gráfico de barras que mostra a avaliação da expressão dos genes: FAS, caspase 3 e caspase 9, pela linhagem celular B16-F10 quando tratada com o composto RuAla (20µM). A

expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Os resultados são expressos pela média \pm o desvio padrão (SDs) de 3 experimentos independentes. Diferenças significativas em relação ao controle não tratado são indicadas por $*p < 0.05$.

5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme a invenção, a preparação dos compostos de rutênio contendo o íon hexafluoreto de fósforo, cloreto, acetato e nitrato, além de diiminas e fosfinas em suas estruturas se caracteriza pela reação dos precursores do tipo *cis*-[RuCl₂(P)₂(N-N)] [(P)₂ = fosfinas tais como

10 bis(difenilfosfina)metano; 1,2-bis(difenilfosfina)etano; 1,3-bis(difenilfosfina)propano; 1,4-bis(difenilfosfina)butano; 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno; trifenilfosfina. N-N = 2,2'-bipiridina e derivados]

com aminoácidos (AA), utilizando como solvente metanol/água (80:20) v/v.

Para a preparação dos compostos utiliza-se a seguinte metodologia:

15 dissolve-se o precursor desejado em metanol/água, e em seguida, adiciona-se, sob agitação constante, o aminoácido e o contra-íon. Após 72 horas de agitação o volume da solução é reduzido. Os compostos são precipitados com adição de éter dietílico, sendo obtidos sólidos amarelos alaranjados. Os sólidos são filtrados, sob vácuo, em funil de vidro

20 sinterizado e lavados três vezes com água e éter dietílico. Os compostos são secos em dessecador sob pentóxido de fósforo (P₄O₁₀).

A síntese dos compostos [Ru(AA)(dppb)(bipy)]PF₆ é como segue:

Numa reação típica, em um balão de 100 ml são adicionados *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] [dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e bipy = 2,2'-

25 bipiridina] (0,08 g, 0,10 mmol) em 50 mL de metanol previamente desoxigenado e glicina (0,011 g, 0,15 mmol) dissolvido em 10 mL de água, seguido da adição de NH₄PF₆ (0,025 g, 0,16 mmol), deixando a mistura em refluxo por 72 horas. Após o término da reação o solvente é removido em um rota-evaporador, dissolvido em 2 mL de diclorometano, após o que

10 mL de éter dietílico são adicionados para precipitar o produto desejado. O precipitado é removido em um funil de placa porosa, lavado com água, éter dietílico e seco em um dessêcador sob pressão reduzida, dando um rendimento de 75% (0,072 g).

5 Para a síntese dos demais compostos com aminoácido são seguidas as mesmas etapas deste método, sendo que os rendimentos são próximos de 80% para os compostos: [Ru(Ala)(dppb)(bipy)]X (RuAla), [Ru(Ser)(dppb)(bipy)]X (RuVal), [Ru(Val)(dppb)(bipy)]X (RuVal), [Ru(Leu)(dppb)(bipy)]X (RuLeu), [Ru(Lys)(dppb)(bipy)]X (RuLys),
10 [Ru(Met)(dppb)(bipy)]X (RuMet), [Ru(Tyr)(dppb)(bipy)]X (RuTry) e [Ru(Trp)(dppb)(bipy)]X (RuTrp).

Para a elucidação da estrutura e composição dos compostos de aminoácidos obtidos, estes são analisados através das técnicas de: RMN ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^{13}C , ^1H), voltametria (cíclica e voltametria de pulso diferencial),
15 análise elementar (C, H, N e S) e difração de raios X.

As medidas de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os compostos sintetizados são efetuadas em um instrumento BRUKER ARX200 ou DRX400. Os dados são processados empregando-se um software UXWIN-NMR versão 1.3. Para efetuar as análises de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, as amostras são dissolvidas em
20 diclorometano previamente deoxigenado, usando um capilar contendo D_2O .

Nas análises de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, é observado que para todos os compostos exceto o [Ru(Gly)(dppb)(bipy)]X quatro dubletos encontram-se presentes, indicando a existência de diastereoisômeros, o que é
25 comprovado pelo espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, espectro de dicroísmo circular (Ru(Ser)(dppb)(bipy)]X), e estrutura cristalina para o composto [Ru(Leu)(dppb)(bipy)]X (Figura 1, Figura 2 e Figura 3 respectivamente). Por exemplo, para o composto [Ru(Ala)(dppb)(bipy)]X, os deslocamentos

químicos encontrados referentes aos dubletos foram 39,0; 39,5; 45,5 e 47,5 ppm, conforme a Figura 4b.

As medidas eletroquímicas são efetuadas utilizando um potenciostato BAS-100B com tratamento de dados no software BAS 100W versão 1.0. É usada uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 3 mL para as análises dos compostos. Para as medidas, as amostras são dissolvidas em solução 10^{-3} mol.L⁻¹ de PTBA em diclorometano, usando como eletrodo de referência Ag/AgCl, e como eletrodo de trabalho e auxiliar o eletrodo de Pt.

As medidas de voltametria de pulso diferencial revelaram que todos os complexos de rutênio (II) apresentam processos de oxidação altos que conferem aos compostos a condição de estabilidade ao ar.

As medidas de voltametria de pulso diferencial indicam que todos os compostos sintetizados apresentam processos de oxidação mais elevados (<1000 mV) que o precursor, o qual apresenta processo de oxidação em 600 mV(Figura 5A(a)). Isso acontece por causa da substituição dos dois íons cloretos pelo aminoácido, deixando o centro metálico mais pobre em densidade eletrônica. Por exemplo, para o composto [Ru(Ala)(dppb)(bipy)]X, o potencial de oxidação encontrado foi de 1050 mV, Figura 5C. Os processos de oxidação elevados conferem aos compostos a condição de estabilidade ao ar.

As determinações dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre para todos os compostos sintetizados são determinadas em um analisador de CHNS modelo EA 1108 da Fisons.

Os resultados de microanálise revelam a composição química dos compostos de aminoácidos, resultados estes que estão condizentes com as composições químicas propostas.

São efetuados ensaios em células tumorais *in vitro* com os compostos de Rutênio (II) utilizados nas composições.

As culturas de células são como segue.

Para os ensaios biológicos são utilizadas as linhagens tumorais estabelecidas, B16-F10 (Melanoma Murino – ATCC® # CCL – 6475™), L-929 (Fibroblasto de Mama Murino – ATCC® # CCL – 1™), A20 (Linfoma Murino – ATCC® TIB – 208™), K-562 (Leucemia Mielóide Crônica Humana – ATCC® # CCL-243™), MRC-5 (Fibroblasto de Pulmão Humano – ATCC® # CCL-171™), A549 (Carcinoma de Pulmão Humano – ATCC® # CCL-185™), DU-145 (Carcinoma de Próstata Humano – ATCC® # HTB-81™) e cultura primária das linhagens Tumor de Ehrlich (Adenocarcinoma de Mama Murino – ATCC® # CCL-77™) e Sarcoma 180 (Sarcoma Murino – ATCC® # TIB-66™). Todas as linhagens celulares foram mantidas em cultura a 37°C, 5% CO₂ em meio RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-Gnl, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

A seguir são descritos os ensaios com células.

Para avaliar a atividade citotóxica dos complexos de rutênio(II) é utilizado o método colorimétrico de redução do MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método descrito por Mosmann, Tim (December 1983) "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods* **65** (1–2): 55–63 consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Para o teste do MTT, 2,5 x 10⁴ células tumorais A549 e H460, serão semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos complexos de rutênio(II) (0,2 a 200 µM) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, serão adicionados aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na

concentração de 5 mg.mL⁻¹, e após 3 h de incubação com o MTT, serão acrescentados 50 µL SDS a 10% diluído em HCl/0,01N.

A quantificação da densidade óptica (DO) é medida em espectrofotômetro.

5 A porcentagem de viabilidade celular é determinada a partir da seguinte fórmula:

% Viabilidade = Absorbância do Tratamento/Absorbância do controle negativo*100.

10 O valor de IC₅₀ (concentração em µM que inibe 50 % da viabilidade celular) é determinado por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A partir dos valores de IC₅₀ apresentados pelos compostos sobre as células A549 e H460, são selecionados os compostos com melhores valores de IC₅₀ para serem realizados os testes seguintes.

15 Análise estatística: a análise estatística dos resultados é efetuada usando os testes: ANOVA, seguida do pós teste de Dunnett para comparações múltiplas com um controle. Todas as análises estatísticas são efetuadas usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

20 Os ensaios de citotoxicidade dos complexos [Ru(AA)(P-P)(N-N)]X são efetuados pelo método MTT citado acima em várias linhagens de célula tumorais, dentre elas: células tumorais murinas *in vitro* B16-F10 (Melanoma murino), Ehrlich (Carcinoma mamário murino) e L929 (Fibroblasto adenoalveolar murino) (vide Tabela 2).

25 Os testes demonstram que os compostos [Ru(AA)(P-P)(N-N)]X inibem a viabilidade celular de vários tipos de células cancerígenas.

Para o composto [Ru(Ala)(P-P)(N-N)]PF₆, a inibição da viabilidade celular (IC₅₀) tem como valor encontrado 16,17 µM depois de 48 h de tratamento, enquanto que para a linhagem celular basal (L-929), o IC₅₀

encontrado é de 904,2 μM , sendo que para o composto de cis-diaminoplatina (II), o valor de IC_{50} é 86 μM para a célula *in vitro* B16-F10 e 37 μM para L-929.

5 Para o tratamento com várias concentrações (10, 20 e 40 μM) do composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ por 48 h, foi observado que a população de célula na fase G0/G1 aumenta em torno de 10%, Figura 6, mostrando assim a capacidade de aprisionar a célula na fase G1, pois no final da fase G1, a célula entra em apoptose celular caso sejam detectados erros no DNA impossíveis de reparar.

10 A liberação de desidrogenase láctica (DHL) também foi investigada para avaliar a toxicidade celular como um resultado do rompimento celular subsequente à ruptura da membrana. Todos os compostos apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das células cancerosas examinadas. Por exemplo, os resultados obtidos demonstram que o
15 tratamento da célula tumoral B16-F10 com o composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, nas concentrações de 20 e 40 μM , a liberação da DHL aumentou 2,7 vezes comparado com o controle, o que pode ser visto na Figura 7. Ademais, com o aumento da concentração (de 20 para 40 μM) do composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, não foi observada diferença significativa
20 na liberação da DHL no tratamento por 48 h como foi notado na Figura 7.

A liberação da desidrogenase láctica é uma das indicações que houve morte das células cancerígenas, porém esta não informa se a morte foi por apoptose ou necrose. Para um melhor entendimento a respeito de tal fato, a análise da indução de morte celular foi realizada por citometria de fluxo
25 utilizando coloração anexina V-FITC induzido. Os resultados mostram que a morte das células tratadas com os compostos $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{X}$, se dá por apoptose, sendo que poucas células morrem por necrose.

Para o composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, o tratamento durante 48 h mostrou-se independente da concentração, sendo a morte por apoptose sempre preferencial, Figura 8.

Também foram efetuados estudos de ciclo da vida celular, conjunto de processos que regulam a vida das células. O ciclo celular pode parar em determinados pontos e só avança se determinadas condições pré-estabelecidas pelo sistema biológico estiverem corretas, tais como: a presença de uma quantidade adequada de nutrientes ou quando a célula atinge determinadas dimensões. Para tais funções a serem realizadas, a regulação do ciclo muitas das vezes ocorre por meio das ciclinas e quinases ciclino.

No final de G_1 , a célula entra em apoptose celular, caso sejam detectados erros no DNA impossíveis de reparo. Em relação aos resultados obtidos para as células cancerígenas tratadas em 48 h, todos os compostos de aminoácidos mostram que o ciclo de fases de distribuição das células tumorais de linhagem B16-F10 aumenta algo em torno de 12% na população de células na fase do ciclo celular G_0/G_1 .

Para o tratamento efetuado com várias concentrações (10, 20 e 40 μM) do composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{PF}_6$ por 48 h, foi observado que a população de célula na fase G_0/G_1 aumentou em torno de 10 %, Figura 9, mostrando assim a capacidade de aprisionar a célula na fase G_1 , pois no final de fase G_1 , a célula entra em apoptose celular caso sejam detectados erros no DNA impossíveis de reparar.

No presente estudo também foram feitos ensaios de medidas de Caspase, pois estas enzimas participam diretamente na sinalização do processo de morte da célula, apoptose/necrose. Durante os experimentos que levaram ao presente pedido foram feitos somente os ensaios de medidas de caspase 3 e caspase 9. Para todos os ensaios com os compostos $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{X}$, foi observado um aumento tanto na

caspace 3 quanto na caspace 9, sendo que a primeira foi bem mais pronunciada para as medidas nas células (B16-F10) tratadas com composto $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{PF}_6$ por 48 h, Figura 10.

A Tabela 2 abaixo lista os valores aproximados de IC_{50} (μM) para 5 linhagens de células tratadas com os complexos RuAla, RuLeu, com diferentes biperidinas, e Cisplatina, por 48h.

A linhagem celular basal (L-929) também está incluída na Tabela para fins de comparação. Baixa citotoxicidade dos compostos de $[\text{Ru}(\text{Ala})(\text{P-P})(\text{N-N})]$ nessa linhagem de célula potencializa tais compostos 10 como possíveis fármacos.

TABELA 2

Linhagem Celular		Ru Ala (IC_{50})
L-929 Linhagem celular basal		904,2 $\mu\text{M} \pm 8,99$
B16-F10		16,17 $\mu\text{M} \pm 4,44$
A549		82,92 $\mu\text{M} \pm 0,86$
S180		70,08 $\mu\text{M} \pm 3,98$
Tumor de Ehrlich		242,6 $\mu\text{M} \pm 2,51$
Linhagem Celular		RuLeu (IC_{50})
L-929 Linhagem celular basal		47,15 $\mu\text{M} \pm 5,94$
B16-F10		18,52 $\mu\text{M} \pm 2,03$
A549		52,97 $\mu\text{M} \pm 7,81$
S180		38,19 $\mu\text{M} \pm 7,0$
Tumor de Ehrlich		15,18 $\mu\text{M} \pm 4,31$
Cisplatina	B16-F10	L-929
Cisplatina	86 $\mu\text{M} \pm 3,40$	37,07 $\mu\text{M} \pm 3,39$

Em conclusão, os compostos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{AA})(\text{P})_2(\text{N-N})]\text{X}$ 15 (aminoácidos; P-P = fosfinas; X = contra-íon), apresentam excelentes

resultados com elevada citotoxicidade em linhagens tumorais, e resultados ainda mais promissores, considerando que a citotoxicidade para células não tumorais (L-929) apresentou-se extremamente baixa.

5 Os compostos de rutênio com aminoácidos são bastante estáveis ao ar e quando dissolvidos em dimetilsulfóxido e possuem alta citotoxicidade em células tumorais, sendo que para células normais, estes se apresentam com baixa citotoxicidade.

Esses compostos induzem a morte das células cancerígenas, o que é comprovado pelos ensaios de LDH.

10 Ainda, com tais compostos foi observado que a morte da célula cancerosa é via apoptose e não via necrose.

REIVINDICAÇÕES

1. Composições farmacêuticas à base de derivados de rutênio divalente, caracterizadas por compreenderem a) compostos de acordo com a fórmula $[\text{Ru}(\text{AA})(\text{N-O})(\text{P-P})(\text{N-N})]\text{X}$ onde AA é um aminoácido, P-P é um derivado fosfina, N-N é 2,2'-bipiridina e derivados e X é um contra-íon; e b) um veículo farmaceuticamente aceitável.
2. Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por o aminoácido ser selecionado dentre Glicina, Leucina, Isoleucina, Valina, Treonina, Metionina, e Tripsina.
3. Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por o derivado fosfina ser selecionado dentre bis(difenilfosfina)metano; 1,2-bis(difenilfosfina)etano; 1,3-bis(difenilfosfina)propano; 1,4-bis(difenilfosfina)butano; 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno; e trifenilfosfina.
4. Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por o contra-íon X ser selecionado dentre hexafluoreto de fósforo, cloreto, acetato, nitrato, e ligantes diimínicos e fosfínicos.
5. Uso das composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar as linhagens tumorais B16-F10.
6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral L-929.
7. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral A20.

8. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral K-562.
9. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral MRC-5.
10. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral A549.
11. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a linhagem tumoral DU-145.
12. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a cultura primária das linhagens Tumor de Ehrlich.
13. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar a cultura primária de Sarcoma 180.

FIG. 1

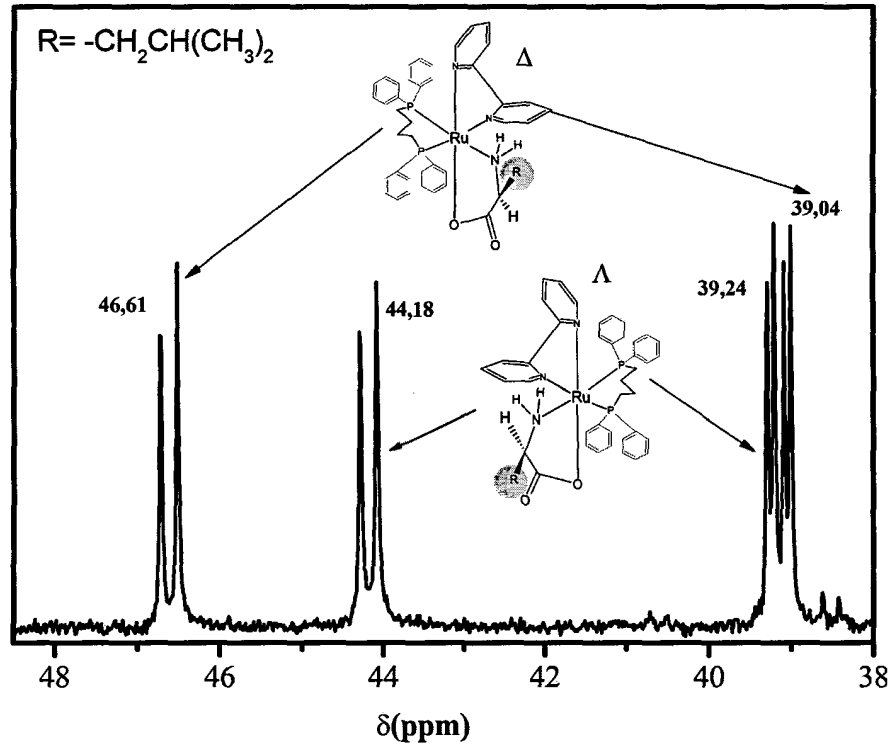


FIG. 2

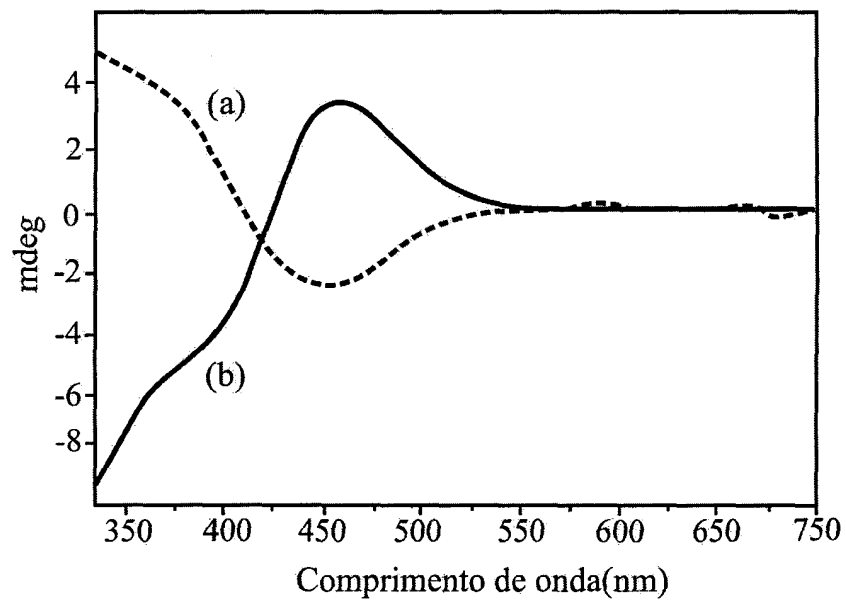


FIG. 3

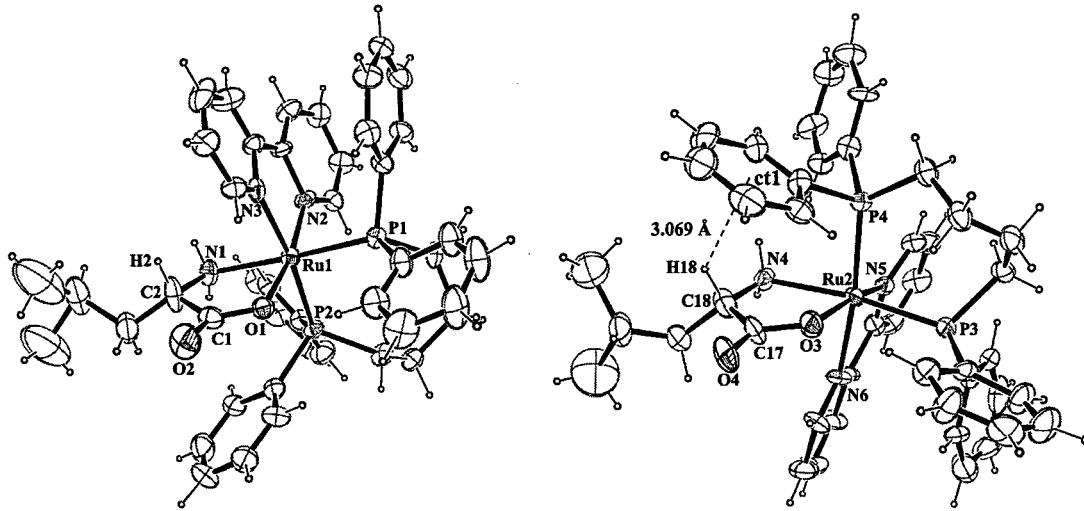


FIG. 4

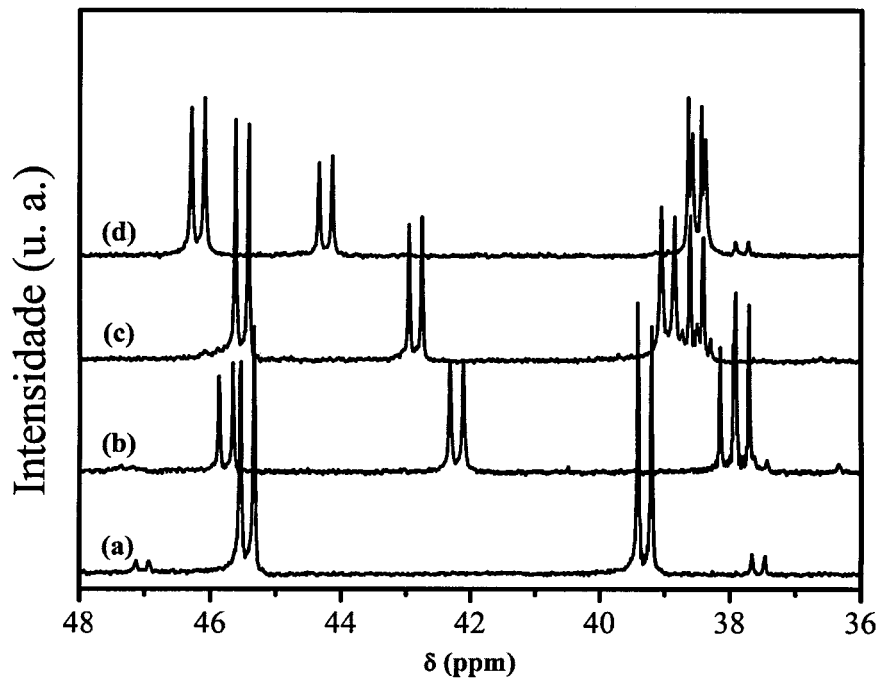


FIG. 5A

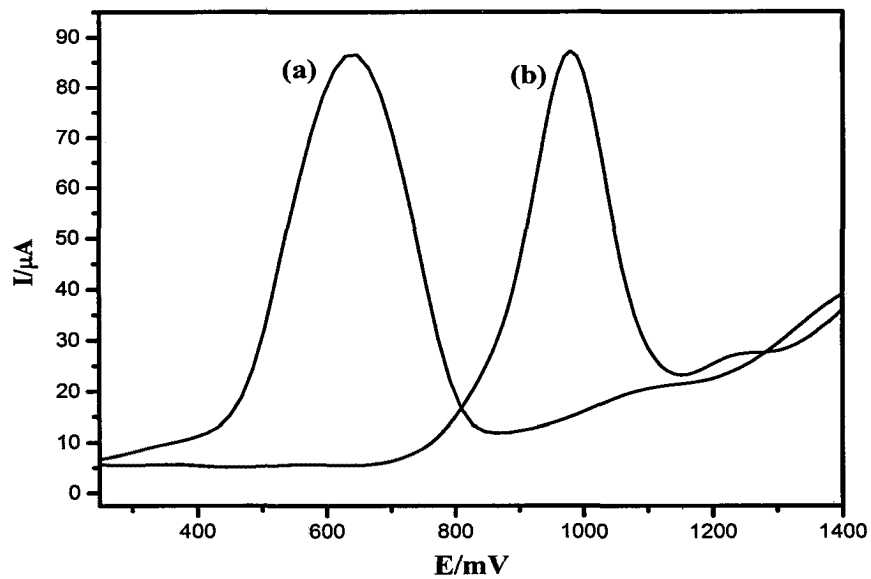


FIG. 5B

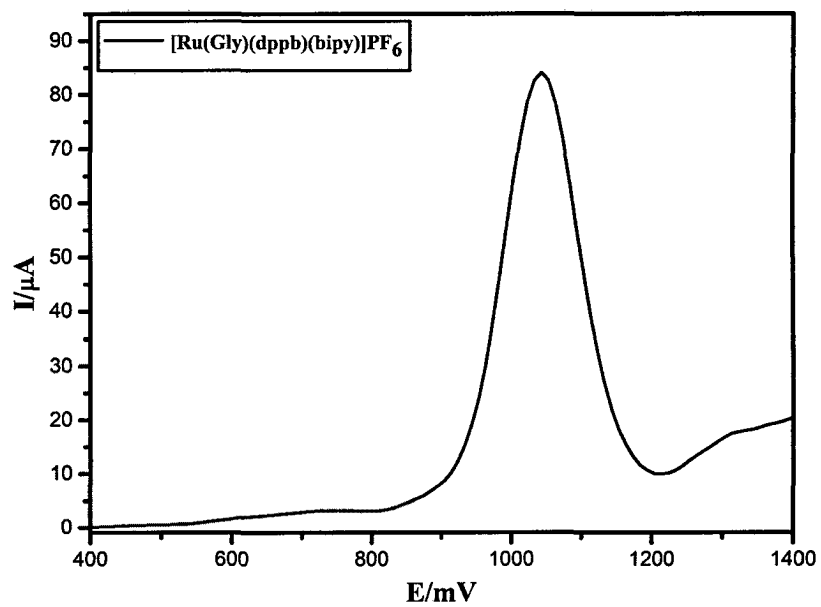


FIG. 5C

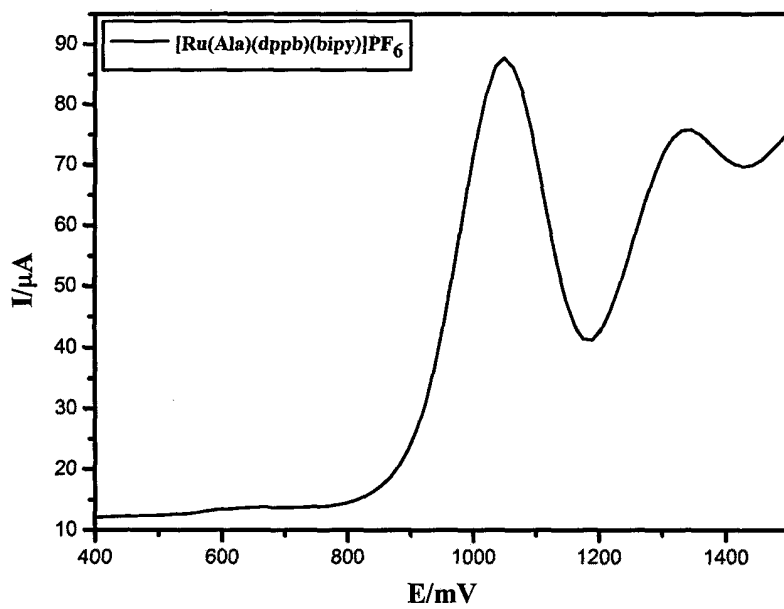


FIG. 5D

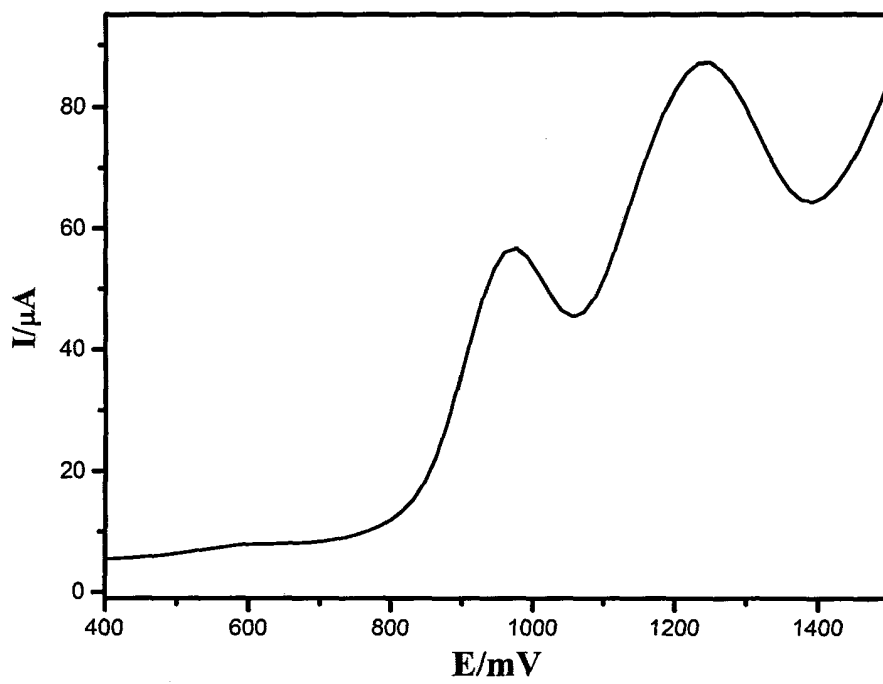


FIG. 6A

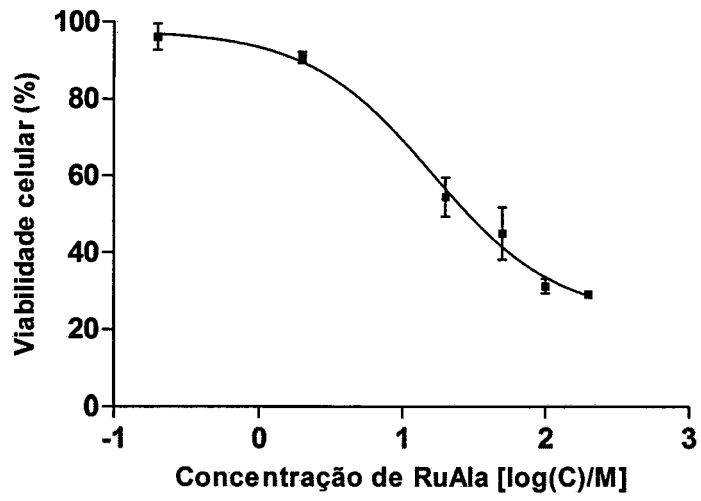


FIG. 6B

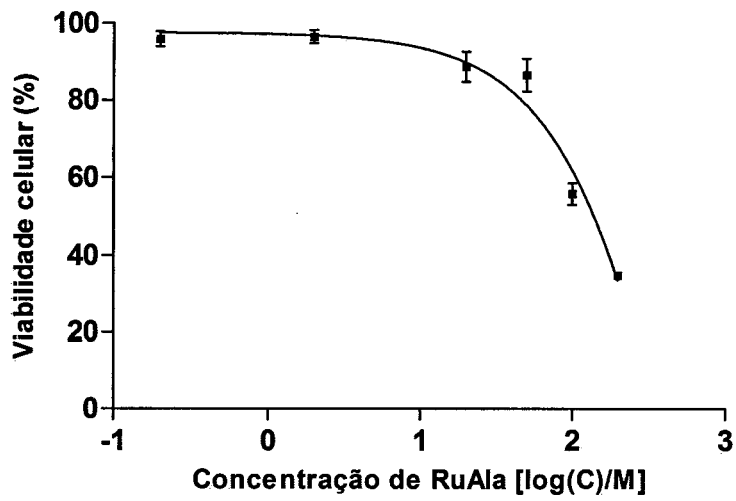


FIG. 7

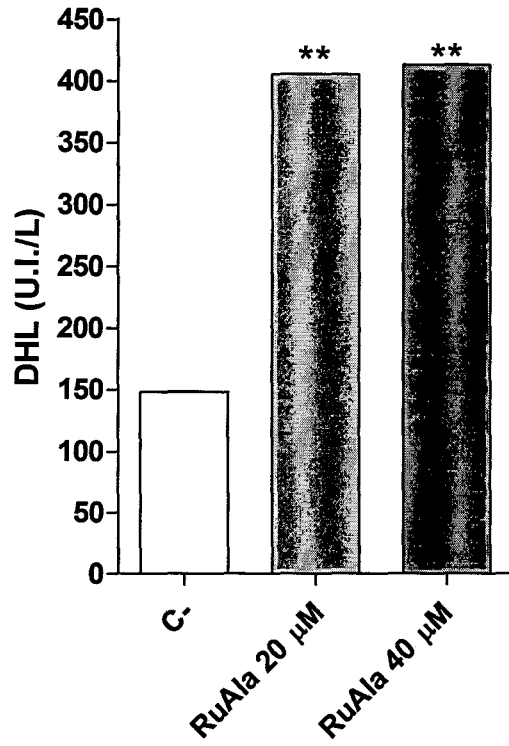


FIG. 8

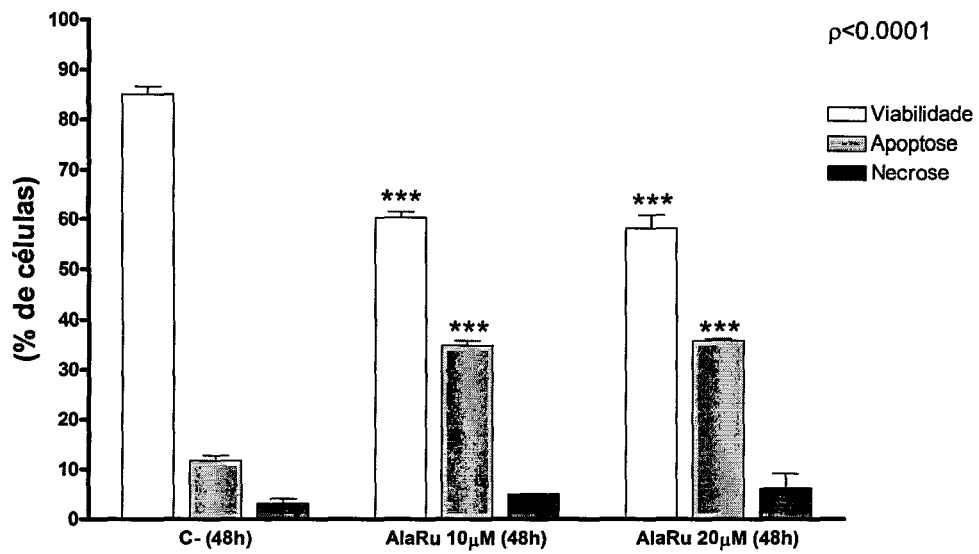


FIG. 9

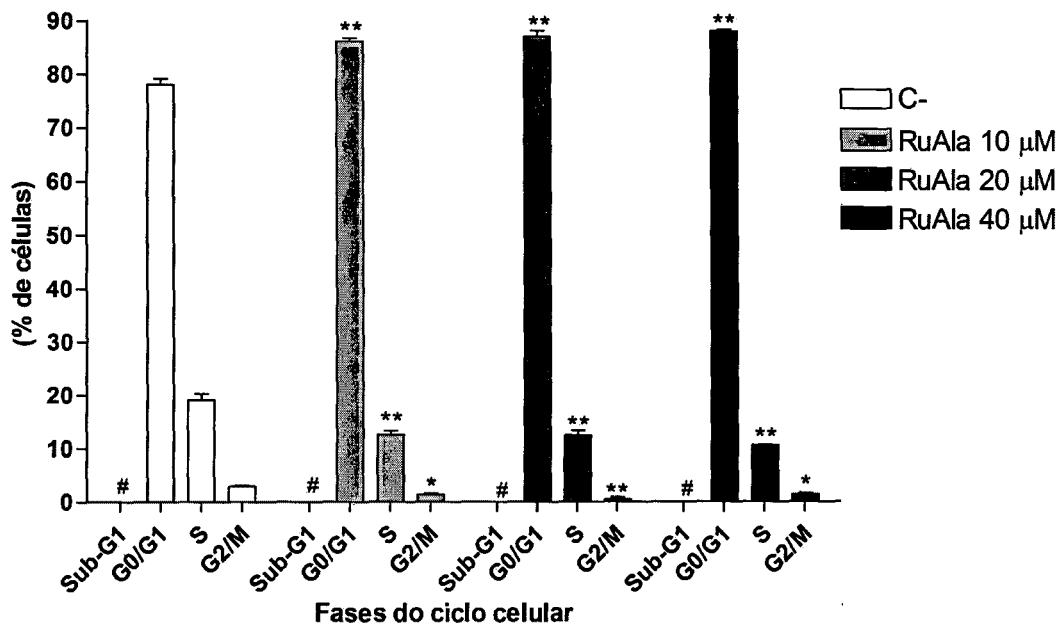
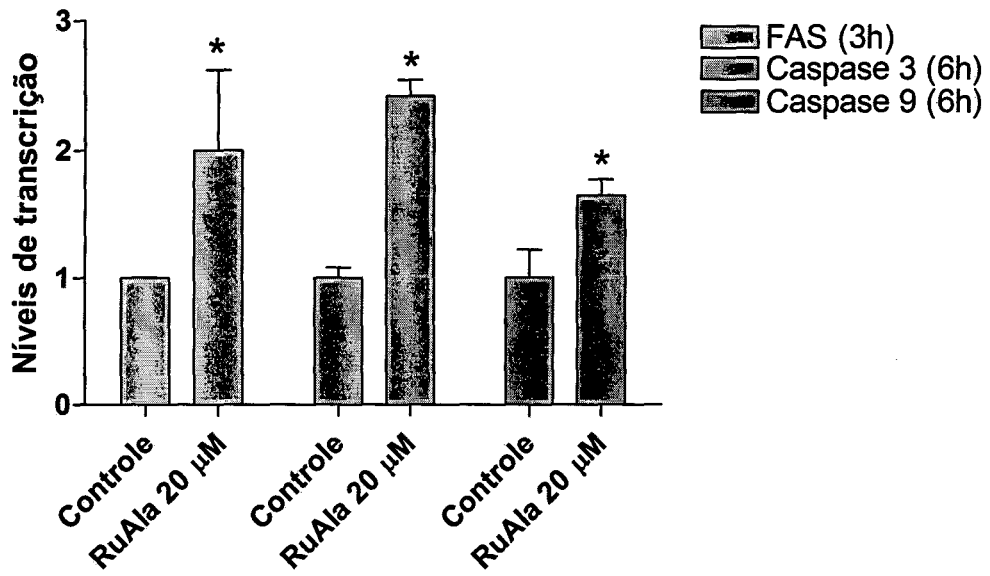


FIG. 10



RESUMO
COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE DERIVADOS DE
RUTÊNIO DIVALENTE E USO DAS MESMAS

São descritas composições farmacêuticas à base de derivados de
5 rutênio divalente, as composições compreendendo: a) compostos de
fórmula geral $[Ru(AA)(N-O)(P-P)(N-N)]X$ onde o íon $Ru(II)$ é combinado a
um amino ácido, fosfinas e derivados bipyridina, e onde X é o íon
hexafluoreto de fósforo, cloreto, acetato e nitrato, além de ligantes
diimínicos e fosfínicos e b) um veículo farmacologicamente aceitável.
10 É igualmente descrito o uso das composições da invenção em um
medicamento para tratar câncer.