



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

(21) BR 102014022630-3 A2

(22) Data do Depósito: 12/09/2014

(43) Data da Publicação: 26/04/2016

(RPI 2364)



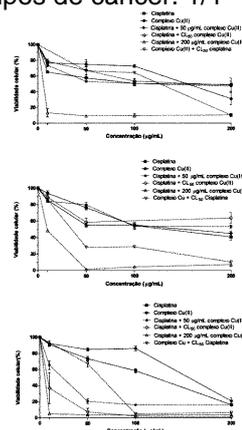
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO DE UM COMPLEXO DE COBRE (II) E LIGANTE -[BIS(PIRIDIN-2-ILMETIL)AMINO]-3-CLOROPROPAN-2-OL E USO DA MESMA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/44; A61K 33/24; A61P 35/02; A61P 35/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

(72) **Inventor(es):** MARCOS DIAS PEREIRA, DIANA MARIANI, CHRISTIANE FERNANDES HORN, ADOLFO HORN JUNIOR, MILTON MASAHIKO KANASHIRO, WILLIAM RODRIGUES DE FREITAS

(57) **Resumo:** RESUMO COMPOSIÇÃO DE UM COMPLEXO DE COBRE (II) E LIGANTE - [BIS(PIRIDIN-2-ILMETIL)AMINO]-3-CLOROPROPAN-2-OL E USO DA MESMA A presente invenção refere-se a uma composição de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis (piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina, para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias. O efeito sinérgico demonstrado por tal composição torna a mesma uma alternativa nova e eficiente de terapia antitumoral para diferentes tipos de câncer. 1/1



**“COMPOSIÇÃO DE UM COMPLEXO DE COBRE (II) E LIGANTE -  
[BIS (PIRIDIN-2-ILMETIL) AMINO]-3-CLOROPROPAN-2-OL E USO DA  
MESMA”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se insere no campo de aplicação da química, farmácia, medicina, mais especificamente, na área de preparações medicinais contendo ingredientes ativos, uma vez que se refere a uma composição de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] A atividade antitumoral da Cisplatina foi descoberta por Rosenberg e colaboradores em 1969 apresentando-se como uma nova alternativa para a terapia de diferentes tipos de câncer. Desde então, o interesse no desenvolvimento de novos compostos derivados de metais para terapia antitumoral teve um enorme crescimento. Dentre os metais estudados nos últimos anos, o cobre vem ganhando uma posição de destaque por ser pouco tóxico e mostrar-se essencial para diversos processos biológicos. Portanto, acredita-se que por estas razões este metal apresente uma menor toxicidade para o organismo quando comparado com a Cisplatina. Alguns compostos utilizando metais essenciais como ferro, zinco e cobre já mostraram bons resultados chegando até mesmo a testes de fase pré-clínico. Em geral, a indução da inibição da proliferação celular, apoptose e clivagem do DNA reforçam a atenção direcionada para o

desenvolvimento de novos compostos de coordenação com atividade antitumoral.

[3] O ligante HPCINOL (1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol) foi desenvolvido com o intuito de gerar um ambiente de coordenação insaturado ao centro de cobre, ou contendo ligantes lábeis, o que possibilita a interação do mesmo com macromoléculas biológicas como, por exemplo, o DNA, proteínas, ácidos graxo, etc. Além disso, a presença de grupos doadores nitrogenados e oxigenados possibilita o controle da acidez de Lewis do átomo central, o que também influencia a interação composto de coordenação-macromolécula biológica.

[4] Na presente invenção é reportada pela primeira vez uma composição de um complexo de cobre (II) e ligante - [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias.

#### ESTADO DA TÉCNICA

[5] O artigo "Synthesis, crystal structure, nuclease and *in vitro* antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N3O ligand" refere-se a um complexo de cobre (II) - [Cu(HPCINOL)(Cl)]Cl.MeOH, que exhibe atividade antitumoral *in vitro*, bem como sua estrutura cristalina e síntese. Tal documento não entra em conflito com a presente invenção, pois o mesmo não revela uma composição que compreende a associação de tal complexo com outro fármaco antitumoral bem como seu uso no tratamento de tumores sólidos.

[6] O pedido de patente US20110287110 descreve um método para a redução da proliferação de células cancerígenas, mediante o contato com quelatos de cobre e quimioterápicos de base platina, tal como cisplatina. Apesar de tal documento revelar uma combinação de quelatos de cobre com cisplatina para tratamento de tumores sólidos, o mesmo não descreve a sinergia de uma composição compreendendo a associação de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) com um outro fármaco antitumoral para o referido tratamento e, portanto, não entra em conflito com a presente invenção.

#### OBJETIVO E VANTAGENS DA INVENÇÃO

[7] Muitos tipos de câncer são de difícil tratamento, uma vez que muitos deles desenvolvem resistência aos tratamentos disponíveis. Além disso, o excessivo uso de um mesmo medicamento pode trazer sérios efeitos colaterais ao paciente. Desta forma, a presente invenção tem por objetivo proporcionar um tratamento alternativo com uma nova composição de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina.

[8] A composição compreendendo a associação do complexo com a cisplatina apresentou eficácia superior bem como menor toxicidade, quando ao uso de ambos compostos isolados. Sendo assim, aos pacientes que estarão sendo submetidos à quimioterapia contra o câncer, a composição vai promover a redução tumoral bem como minimizar os efeitos colaterais que são sempre encontrados na

administração de grandes quantidades de cisplatina. A combinação testada é uma das terapias em que o complexo pode ser utilizado.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[9] A presente invenção refere-se a uma composição de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias, bem como o protocolo de administração da mesma.

[10] O efeito sinérgico demonstrado por tal composição torna a mesma uma alternativa nova e eficiente de terapia antitumoral para diferentes tipos de câncer.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[11] A Figura 1 representa graficamente a análise da fragmentação do DNA por TUNEL durante o tratamento com cisplatina e com complexo cobre(II): (A) porcentagem de células em apoptose após o tratamento com 50, 100 ou 200 µg/mL de Cisplatina. (B) porcentagem de células em apoptose após o tratamento com 50 µg/mL, CL<sub>50</sub> ou 200 µg/mL do Complexo de Cobre (II). (\*)diferença estatística em relação ao controle. (\*\*)diferença estatística em relação aos tratamentos com apenas um (\*).

[12] A Figura 2 representa graficamente a citotoxicidade do complexo de cobre(II) e Cisplatina isolados e/ou combinados. (A) linhagem celular A549, câncer de pulmão. (B) linhagem celular MCF-7, câncer de mama. (C) linhagem celular B16-F10, melanoma murino.

[13] A Figura 3 representa graficamente a análise da redução do tumor durante o tratamento com o complexo de cobre (II) e a Cisplatina sozinhos ou combinados: (A) linhagem B16-F10 em camundongos C57Bl/6. (B) linhagem A-549 em camundongos Nude. (\*) significa diferente estatisticamente em relação ao controle.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### Síntese do complexo de cobre (II) e ligante - [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL)

[14] O ligante HPCINOL (1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol) foi sintetizado a partir da reação entre BMPA (bis-(2-piridilmetil) amina) e epicloridrina. O complexo de cobre foi obtido pela reação de solução metanólica do ligante HPCINOL (1 mmol, 0.29 g) e solução metanólica de  $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]\text{Cl}_2$  (1 mmol, 0.2 g) resultando numa solução azul esverdeada. A análise de raios X de monocristal revela um composto onde o átomo metálico está ligado a uma molécula de ligante HPCLNOL e a um haleto (cloro). O composto apresenta absorção no UV-VIS em 257, 281 e 727 nm.

##### Atividade antitumoral do complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL)

[15] Para avaliar a atividade do complexo de cobre(II),  $1 \times 10^6$  células de câncer de mama (MCF-7), pulmão (A-549), próstata (PC-3) e de melanoma murino (B16-F10) foram expostas a concentrações crescentes (10 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) do complexo. A Cisplatina foi usada como controle de quimioterápico por ser uma droga amplamente empregada na clinica e também por ser, até hoje, o melhor representante

dos compostos de coordenação com atividade antitumoral já sintetizado. Após 24 h de tratamento foi realizado o teste de citotoxicidade pelo método de MTT, que após metabolizado por células vivas é convertido em cristais de formazan de coloração púrpura. A sobrevivência das células foi calculada como porcentagem de células vivas em relação às células não tratadas com nenhum composto.

[16] A eficiência do complexo foi avaliada, através de regressão logarítmica não linear, calculando-se a concentração necessária para matar 50% das células tratadas ( $CL_{50}$ ). O complexo de cobre (II) quando administrado às células humanas tumorais e de animal (murino) apresentou citotoxicidade da mesma ordem de grandeza às encontradas para a Cisplatina (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração letal capaz de matar 50% das células de câncer.

Compostos	$CL_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	A549	MCF-7	B16-F10
Cisplatina	84,34 (281,07) $\pm$ 15,15	146,23 (487,23) $\pm$ 7,39	99,53 (331,70) $\pm$ 8,98
Complexo Cu(II)	128,33 (301,08) $\pm$ 14,03	76,65 (179,83) $\pm$ 6,46	149,2 (350,04) $\pm$ 10,18

[17] Para confirmar se a morte das células humanas tumorais foi causada pelo processo de apoptose, utilizou-se métodos para determinar a fragmentação do DNA (Sub-G1 e TUNEL). Após o tratamento as células foram incubadas com iodeto de propídeo contendo RNase A e a fragmentação quantificada por intensidade de fluorescência no citômetro de fluxo. Em ambos os ensaios fica claro que as células estão sendo mortas pelo complexo através do processo de apoptose (Figura 1). Inclusive a ativação do processo de

apoptose é maior em células tratadas com o complexo (Figura 1B) do que com a Cisplatina (Figura 1A).

Composição do complexo de cobre (II) e ligante - [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com cisplatina

[18] Para avaliar o tratamento combinado entre o complexo de cobre (II) e a Cisplatina as células MCF-7, A549 e B16-F10 foram submetidas a uma condição em que concentrações crescentes de Cisplatina foram administradas juntamente com concentrações fixas do complexo (50 µg/mL, CL<sub>50</sub> de cada linhagem e 200 µg/mL) ou com concentrações crescentes de complexo combinado a concentração fixa de CL<sub>50</sub> da Cisplatina. Após 24h de exposição os dados foram obtidos por MTT. Os resultados mostraram que as combinações (linhas pontilhadas) apresentaram maior toxicidade às células tumorais quando comparadas ao tratamento com o complexo ou a Cisplatina isolado (Figura 2).

[19] A toxicidade do complexo de cobre foi testada em modelo animal de camundongos Nude. Os animais foram separados em grupos com 5 indivíduos e inoculados intraperitonealmente com concentrações crescentes (10 a 100 mg/Kg) do composto. A sobrevivência foi acompanhada ao longo de 15 dias. A dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL<sub>50</sub>) encontrada foi de 43,75 mg/Kg do animal. Este valor é muito superior ao descrito na literatura para Cisplatina, 6,6 mg/Kg do animal, o que significa que o complexo de cobre é cerca de 7 vezes menos tóxico aos animais quando comparado a Cisplatina. Outro fato a ser relatado é que os animais não apresentaram nenhuma alteração de comportamento mostrando que o complexo com

cobre apresenta menor efeito colateral. Os testes Xenográficos foram realizados com a injeção subcutânea de  $1 \times 10^6$  células da linhagem B16-F10 para camundongos C57-B16 (machos e fêmeas) e  $1 \times 10^6$  células da linhagem A549 para camundongos Nude (fêmeas). Após uma semana de desenvolvimento do tumor os animais foram tratados com injeções intraperitoneais do complexo, da Cisplatina e de ambos, todos diluídos em salina. Para a linhagem B16-F10 as concentrações testadas foram de 3,3 mg/Kg de complexo de cobre(II), 3,3 mg/Kg de Cisplatina ou a combinação de 3,3 mg/Kg de Cisplatina + 1,65 mg/Kg do complexo de cobre(II). Já para a Linhagem A549 as concentrações foram de 22,5 mg/Kg de complexo de cobre (II), 3,3 mg/Kg de Cisplatina ou a combinação de 3,3 mg/Kg de Cisplatina + 22,5 mg/Kg do complexo de cobre (II). Após 11 e 25 dias respectivamente os animais foram sacrificados e o tumor foi retirado e pesado. Os resultados mostraram que tanto o tratamento com Cisplatina como o tratamento com o composto de cobre(II) foram capazes de reduzir significativamente o peso do tumor quando comparado com os animais que não receberam o tratamento. Além disso, o tratamento combinado (Cisplatina + composto de cobre(II)) foi claramente mais capaz de reduzir o tamanho do tumor quando comparado aos tratamentos isolados (Figura 3).

[20] De acordo com os resultados obtidos com a combinação do complexo de cobre (II) e do ligante - [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) com a cisplatina e a avaliação de diversos protocolos contra câncer, foi proposta uma nova formulação de composição de um complexo de cobre (II) e ligante -

[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias, bem como o protocolo de administração da mesma.

[21] Como agente terapêutico, a dose da combinação deverá estar compreendida entre 50 - 100 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal do fármaco antitumoral acrescida de 50 -700 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal do complexo de cobre em infusão intravenosa única, a cada 3 - 4 semanas.

[22] Desta forma, como compreendido nos resultados, as taxas de diluição da nova composição estarão compreendidas entre: 1 (parte do fármaco antitumoral):0,5 - 7,0 (partes do complexo de cobre) e 0,5 (parte de do fármaco antitumoral): 0,5-7,0 (partes do complexo de cobre).

[23] A composição é utilizada no preparo de uma solução injetável composta por ambas as drogas e deve ser administrada exclusivamente por infusão intravenosa.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Composição de um complexo de cobre (II) e ligante - [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol

**CARACTERIZADA POR** compreender a associação com um outro fármaco antitumoral, na qual as taxas de diluição dos componentes estão compreendidas entre: 1 parte do fármaco antitumoral:0,5 - 7,0 partes do complexo de cobre e 0,5 partes do fármaco antitumoral: 0,5-7,0 partes do complexo de cobre.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA POR** o fármaco antitumoral compreender, preferencialmente, Cisplatina.

3. Uso da composição, conforme definida nas reivindicações 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** ser na fabricação de um medicamento para tratar neoplasias de tumores sólidos ou leucemias.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO POR** o medicamento ser uma solução injetável para aplicação intravenosa.

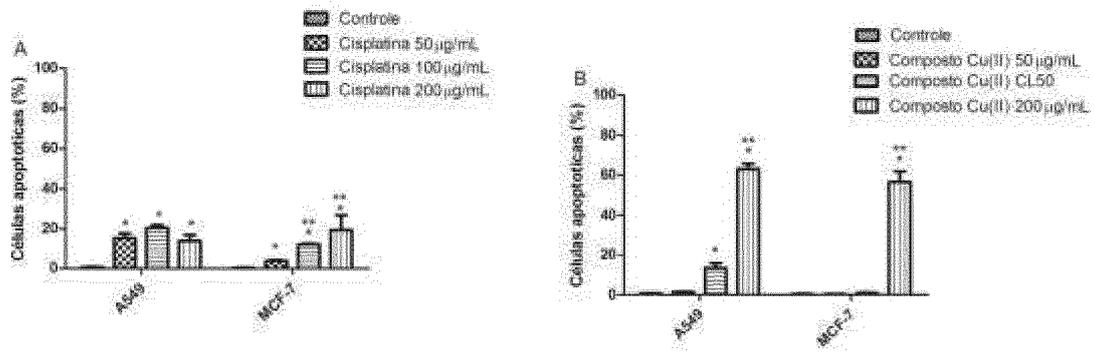


Figura 1

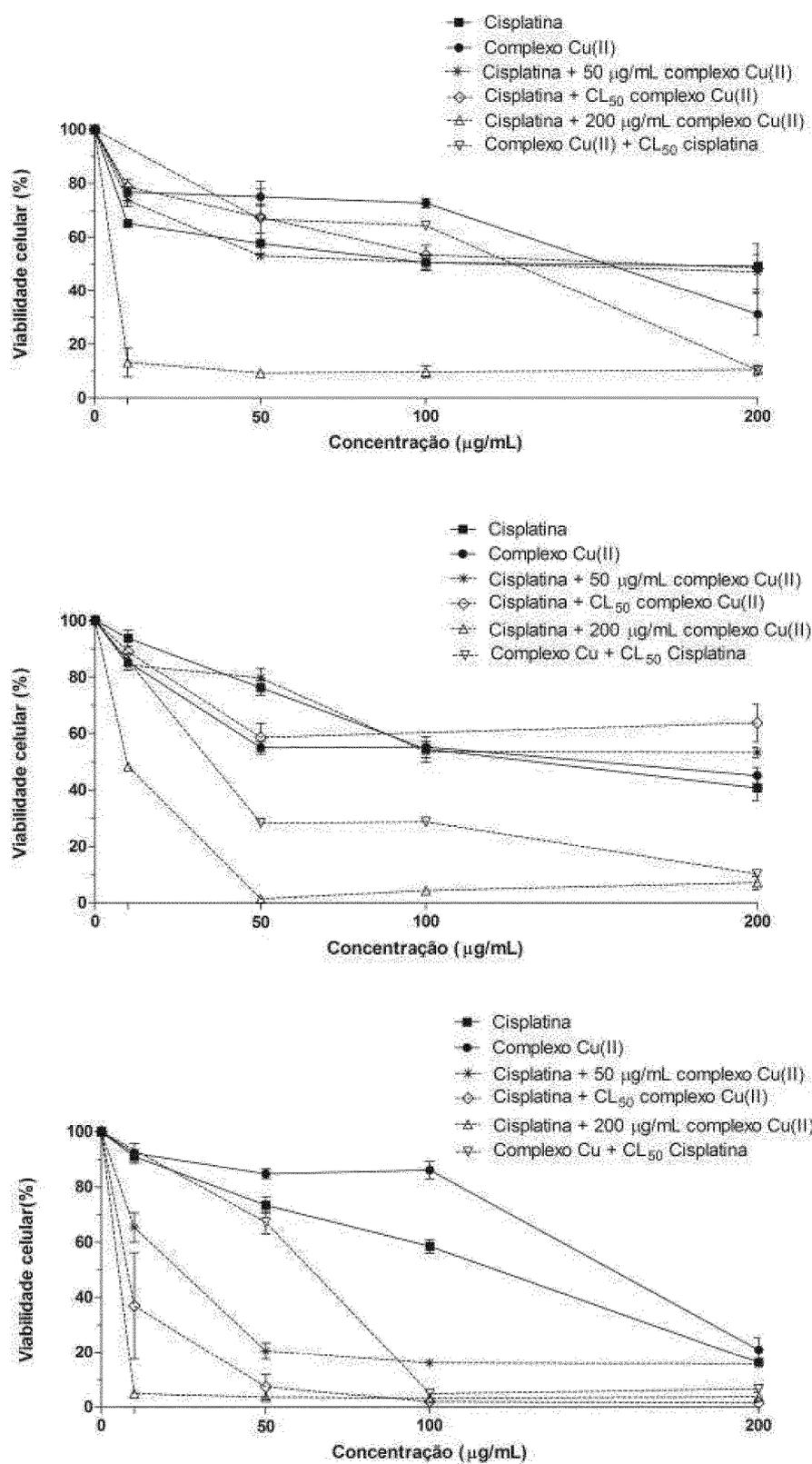


Figura 2

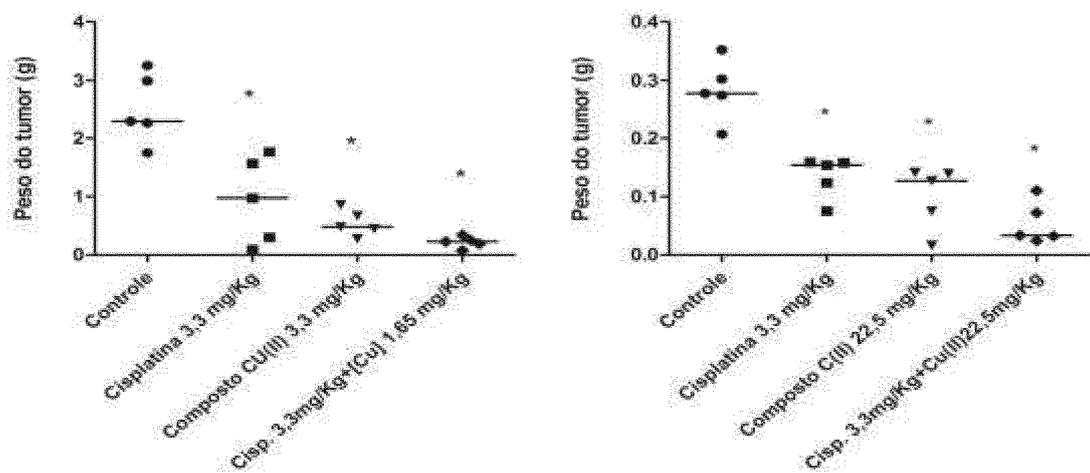


Figura 3

RESUMO

"COMPOSIÇÃO DE UM COMPLEXO DE COBRE (II) E LIGANTE -  
[BIS(PIRIDIN-2-ILMETIL)AMINO]-3-CLOROPROPAN-2-OL E USO DA  
MESMA"

A presente invenção refere-se a uma composição de um complexo de cobre (II) e ligante -[bis(piridin-2-ilmetil)amino]-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) compreendendo a associação com um outro fármaco antitumoral, preferencialmente, Cisplatina, para tratamento de neoplasias de tumores sólidos ou leucemias. O efeito sinérgico demonstrado por tal composição torna a mesma uma alternativa nova e eficiente de terapia antitumoral para diferentes tipos de câncer.