



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 112014016497-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 112014016497-5

(22) Data do Depósito: 04/12/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 13/06/2017

(51) Classificação Internacional: C07F 19/00; A61K 33/32; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: US 61/721,575 de 02/11/2012; US 61/583,377 de 05/01/2012; US 61/656,178 de 06/06/2012; US 61,668,679 de 06/07/2012.

(54) Título: COMPLEXOS DE METAL MISTURADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO E USO

(73) Titular: PLEDPHARMA AB. Endereço: GREV TUREGATAN 11C, 3RD. FLOOR, S-114 46 STOCKHOLM, SUÉCIA(SE)

(72) Inventor: JAN OLOF KARLSSON; KARL REINEKE; TINO KURZ; ROLF ANDERSSON; MICHAEL HALL; CHRISTINA MCLAUGHLIN; SVEN JACOBSSON; JACQUES NÄSTRÖM.

(87) Publicação PCT: WO 2013/102806 de 11/07/2013

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/12/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 23/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

COMPLEXOS DE METAL MISTURADOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
COMPREENDENDO OS MESMOS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO E USO
CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção é direcionada a um complexo de metal misto de um composto de dipiridoxila, por exemplo, ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP ou fodipir) ou outros compostos de Fórmula I (daqui em diante derivados de piridoxil etildiamina ou derivados de PLED), em que os metais misturados compreendem um metal transição do Grupo III-XII e um metal do Grupo II. Nas formas de realização específicas, o complexo de metal misturado é um complexo de cálcio e manganês. A presente invenção também é direcionada às composições que contêm um tal complexo de metal misturado, aos métodos para a preparação de um tal complexo de metal misturado, por exemplo, em uma cristalização de uma só etapa, e métodos de tratamento que empregam um tal complexo de metal misturado. Tais métodos de tratamento incluem métodos que convencionalmente empregam os complexos de manganês-DPDP para efeito terapêutico. Em uma forma de realização específica, as composições podem ser utilizadas no tratamento de condições patológicas motivadas pela presença de radicais livres derivados de oxigênio no corpo, isto é, estresse oxidativo. Os complexos metálicos misturados, e em particular o complexo de cálcio-manganês misturado calmangafodipir complexo aqui descrito, constituem novas entidades químicas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] O estresse oxidativo começa com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) como uma parte da função celular normal. Existem múltiplas fontes celulares de geração de ROS, mas as mais importantes são os complexos de transporte de elétron mitocondrial I e III, as enzimas P450 dentro do retículo endoplasmático, e NADPH oxidase ligada à membrana. A produção de ROS por cada uma destas fontes pode ser estimulada por citocinas, inflamação, proteínas virais, e outros mecanismos, como medicamentos quimioterápicos, isquemia-reperfusão, e sobrecarga de ferro e cobre.

Importantemente, estes processos inicialmente geram o superóxido de radical livre ($\bullet\text{O}_2^-$) que é seqüencialmente reduzido para formar o peróxido de hidrogênio, o radical de hidroxila e, por fim, água. Sob condições de grande stress oxidativo e conseqüentemente elevada produção de superóxido, estes intermediários reativos, no entanto, facilmente interagem com outras moléculas para formar a ROS secundária prejudicial, tal como os produtos de peroxidação de lipídeo e peroxinitrito (Singal et al., *Liver Int.* 2011; 31:1432-1448). Isso indica a importância de manter a quantidade celular de superóxido sob rígido controle. Sob condições normais isso é alcançado através de superóxido dismutases (SODs). Embora as SODs tenham a taxa de reação mais rápida de enzimas conhecidas, sob condições de alto estresse oxidativo, estas enzimas podem ser superadas e mesmo irreversivelmente inativadas por ROS e RNS. Este, por sua vez, abre-se para o uso terapêutico dos medicamentos de baixo peso molecular que imitam as enzimas SOD, isto é, os assim chamados miméticos de SOD, para combater o stress oxidativo patológico.

[0003] Os radicais livres derivados do oxigênio de vida curta, mas altamente reativos, são conhecidos para participar do dano ao tecido patológico, especialmente durante o tratamento com citotóxicos/citostáticos e radioterapia em pacientes com câncer (Towart et al., *Arch Pharmacol* 1998; 358 (Suppl 2):R626, Laurent et al., *Cancer Res* 2005; 65:948-956, Karlsson et al., *Cancer Res* 2006; 66:598, Alexandre et al., *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:236-244, Doroshov, *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:223-225, Citrin et al, *Oncologist*, 2010; 15:360-371, Kurz et al, *Transl Oncol* 2012; 5:252-259), insuficiência hepática induzida por acetaminofeno (Bedda et al., *J Hepatol* 2003; 39:765-772; Karlsson, *J Hepatol* 2004; 40:872-873), na doença cardíaca isquêmica (Cuzzocrea et al., *Pharmacol Rev* 2001; 53: 135-159) e em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Parkinson, e esclerose múltipla (Knight, *Ann Clin Lab Sci.* 1997, 27: 11-25). A superprodução de radicais livres derivados do oxigênio também é implicada nas condições patológicas de sobrecarga de ferro (Rachmilewitz et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054:118-23), por exemplo, em talassemia, anemia falciforme e hemosiderose transfusional. Os radicais livres

derivados de oxigênio também são implicados na cirrose hepática induzida por hepatite (Farrell et al., *Anat Rec* 2008; 291:684-692) e na perda auditiva induzida por ruído (Wong et al., *Hear Res* 2010; 260:81-88).

[0004] O uso de agentes quelantes com base em dipiridoxila e seus quelatos metálicos e certos compostos contendo manganês, em particular quelatos de manganês, na medicina é conhecido. Ver a EP 0910360, US 6147094, EP 0936915, US 6258828, EP 1054670, US 6310051, EP 1060174 e US 6391895, por exemplo, que divulgam que certos agentes quelantes, em particular agentes quelantes de dipiridoxila, e seus quelatos metálicos, são eficazes no tratamento ou prevenção da cardiotoxicidade induzida por antraciclina, toxicidade induzida por radiação, lesões induzidas por isquemia-reperfusão e insuficiência hepática induzida por paracetamol (acetaminofeno), ou a partir de um ponto de vista mais geral, cada condição patológica motivada pela presença de radicais livres derivados de oxigênio, isto é, o estresse oxidativo, em seres humanos e animais. Ademais, o composto de dipiridoxila mangafodipir (MnDPDP) foi, além disso e surpreendentemente, observado de possuir efeitos citotóxicos contra as células cancerosas (EP 16944338). No entanto, como descrito no documento WO 2009/078794 A1 e em Kurz et al., 2012, esta é uma propriedade inerente de fodipir (DPDP) isoladamente ou suas contrapartes desfosforiladas DPMP e PLED, e não do complexo de metal MnDPDP ou suas contrapartes desfosforiladas, MnDPMP e MnPLED.

[0005] Um dos derivados de MnPLED, isto é, ácido manganês N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (Manganês Dipiridoxil DiFosfato; MnDPDP), também conhecido como mangafodipir, é aprovado para o uso como um agente de contraste MRI de diagnóstico em seres humanos. Curiosamente, o mangafodipir também foi demonstrado de proteger camundongos contra os efeitos colaterais graves de vários medicamentos citotóxicos/citostáticos (doxorubicina, oxaliplatina, 5-fluorouracila e paclitaxel), sem interferir negativamente com os efeitos anti-câncer destes medicamentos (Towart et al., 1998, Laurent et al., 2005, Karlsson et al., 2006, Alexandre et al., 2006, Doroshov, 2006, Kurz et al., 2012). O mangafodipir foi testado em um paciente com câncer do cólon passando por

tratamento paliativo com uma combinação de folinato, 5-fluorouracila e oxaliplatina (Yri et al., *Acta Oncol.* 2009; 48:633-635). Os dados pré-clínicos e os resultados deste único paciente foram tão promissores que testes clínicos em pacientes com câncer começaram. Quando se chega ao efeito colateral mais perturbador de oxaliplatina, isto é, neurotoxicidade sensorial induzida por oxaliplatina, não existe nenhum dado pré-clínico, com o melhor de nosso conhecimento, que mostra os efeitos protetores do mangafodipir (Karlsson et al., *Transl Oncol.* 2012; 05:32-38). Yri et al., 2009, descreveram que o paciente recebeu 15 doses completas de “Nordic FLOX”. Em 14 dos ciclos, o paciente recebeu o pré-tratamento com mangafodipir. O paciente recebeu uma dose acumulada de 1275 mg/m² de oxaliplatina, que é uma dose provável de dar sintomas neurotóxicos. Nenhum sintoma neurotóxico foi detectado, exceto durante o quinto ciclo quando o mangafodipir foi deliberadamente deixado de lado e o paciente experimentou a neuropatia sensorial periférica. Isto sugere que o mangafodipir pode proteger contra a neurotoxicidade periférica. Após cinco ciclos, o estado de desempenho para o paciente foi drasticamente melhorado, e a demanda por analgésicos foi significativamente reduzida. A neutropenia não ocorreu durante qualquer um dos ciclos de quimioterapia.

[0006] Um primeiro estudo de viabilidade (MANFOL I) foi concluído e os resultados positivos, incluindo os efeitos mieloprotetores, foram relatados pela Swedish Medical Agency e foram publicados (Karlsson et al., 2012).

[0007] O mangafodipir também foi descrito de proteger camundongos contra a insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos (ALF) (Bedda et al., 2003; Karlsson, 2004). A ALF é caracterizada pela morte celular de hepatócitos maciça, uma condição provocada pela depleção de glutatona, radicais livres derivados de oxigênio e danos mitocondriais.

[0008] O mangafodipir é um pró-medicação no sentido de que provavelmente deve ser metabolizado em ácido N,N'-dipiridoxal etilenodiamina-N,N'-diacético (MnPLED) antes que ele possa exercer os efeitos citoprotetores durante as condições *in vivo* (por exemplo, ver Karlsson et al., *Acta Radiol* 2001; 42:540-547; Kurz et al., 2012). O manganês é um metal essencial assim como potencialmente

neurotóxico. Sabe-se há muitos anos que sob condições de exposição crônica em níveis elevados de manganês, uma síndrome de disfunção extrapiramidal semelhante à síndrome de Parkinson, embora clinicamente uma entidade de doença diferente, ocorre com frequência (ver Scheuhammer & Cherian, Arch Environm Contam Toxicol 1982; 11:515-520). Quando uma dose de diagnóstico por imagem MR de mangafodipir é injetada por via intravenosa em seres humanos, cerca de 80 % do manganês administrado é liberado (Toft et al., Acta Radiol 1997; 38:677-689). A liberação de manganês paramagnético é na verdade um pré-requisito para as propriedades de diagnóstico por imagem MR de mangafodipir (Wendland, NMR Biomed 2004; 17:581-594). Elizondo et al., 1991 (Radiology 1991; 178:73-78) mencionaram que o componente de fodipir se liga ao receptor de piridoxil 5' fosfato em hepatócitos e garante uma elevada concentração intracelular de mangafodipir no fígado. Esta hipótese também foi recentemente sugerida em um artigo de Coriat et al., (PLoS One 2011; 6:1-6, e27005). Esta é uma hipótese agradável, mas infelizmente não comprovada e um pouco improvável, que caiu de moda logo depois de ter sido apresentada. Quando o mangafodipir é injetado por via intravenosa (i.v.), cerca de 80 % do complexo de metal se desfaz (Toft et al., Radiol 1997), e em cada dose de Mn equimolar, o $MnCl_2$ possui uma eficácia de contraste de formação de imagem de MR do fígado igual ou melhor do que o mangafodipir (Southon et al. Acta Radiol 1997). Além disso, após a injeção de mangafodipir quase todo o fodipir é recuperado na urina (a sua maior parte como PLED), enquanto que a maior parte do manganês é recuperada nas fezes (Hustvedt et al., Acta Radiol 1997; 38:690-699). Por outro lado, os efeitos terapêuticos do mangafodipir (MnDPDP) e as suas contrapartes desfosforiladas MnDPMP (N,N'-dipiridoxiletlenodiamina-N,N'-diacetato-5-fosfato) e MnPLED dependem do complexo de metal intacto (Brurok et al., Biochem Biophys Res Commun. 1999; 254:768-721, Karlsson et al 2001; 42:540-547).

[0009] Os derivados de PLED imitam a enzima manganês superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) (Brurok et al., 1999). A MnSOD protege a célula de mamífero a partir do radical de superóxido, um subproduto do metabolismo de oxigênio, o qual

é produzido em quantidades razoavelmente elevadas durante as condições aeróbicas normais; nenhum mamífero sobrevive sem uma MnSOD funcional. A MnSOD possui o número de movimento mais rápido (taxa de reação com o seu substrato) do que qualquer enzima conhecida ($> 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Fridovich, *J Exp Biol.* 1998; 201:1203-1209). Os miméticos de MnSOD de baixo peso molecular podem ter taxas de movimento próximas daquelas da MnSOD nativa (Cuzzocrea et al., 2001). Curiosamente, os tampões fisiológicos contendo metais de transição como o manganês podem ter números elevados de movimento semelhantes (Cullota et al., *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763:747-758). No entanto, a importância das enzimas SOD nativas é consistente com um processo de seleção que favorece organismos que elaboram um meio de localizar o catalisador de metal de transição para a dismutação de superóxido em partes da célula, onde existe uma elevada necessidade de tal dismutação, por exemplo, nas mitocôndrias. Além disso, os resultados de isquemia-reperfusão do miocárdio em porcos anestesiados inevitavelmente mostram que a MnSOD intacta, mas não o manganês por si só, protege contra o estresse oxidativo, visto como a redução da dimensão do enfarte (Karlsson et al., 2001). A inativação eficaz de superóxido é essencial na prevenção da geração de radicais de hidroxila muito devastadores e peroxinitrito (Cuzzocrea et al., 2001). Durante o estresse oxidativo patológico, a formação de radicais superóxidos frequentemente excede a capacidade endógena para a inativação. Além disso, o superóxido estimula a produção de peroxinitrito os quais os nitratos endógenos MnSOD. Esta proteína é submetida a nitrato por peroxinitrito em Tyr-34 (Radi, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:4003-4008). Assim que a MnSOD submetida a nitrato perde a sua atividade enzimática, um evento que favorece ao acúmulo de superóxido e dano impulsionado por dismutase (Muscoli et al., *Br J Pharmacol* 2003; 140:445-460).

[0010] Os resultados recentes indicam que a inativação de MnSOD por nitração é um evento precoce na toxicidade hepática induzida por paracetamol (Agarwal et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 110-116). Os resultados antigos, além disso, indicam que a nitração e a inativação de MnSOD estão envolvidas na rejeição

crônica dos rins transplantados em seres humanos (MacMillan-Crow et al., Proc Natl Acad Sci USA de 1996; 93:11853-11858). Também pode ser relevante observar que a actina, a qual pode constituir 5 % ou mais da proteína celular, é pesadamente submetida a nitrato na anemia falciforme e que o grau de nitração observada é suficiente para induzir a polimerização do citoesqueleto (Radi, 2004). Os níveis de circulação de 3-nitrotirosina podem, além disso, servir como um biomarcador para avaliar os riscos de aterosclerose. Ademais, além da aterosclerose, o peroxinitrito e a 3-nitrotirosina são supostos de estarem envolvidos na isquemia do miocárdio, e pulmões sépticos e aflitos, doença inflamatória do intestino, esclerose lateral amiotrófica (Beckman et al., Am J Physiol 1996; 271:0424-0437) e diabetes (Fonstermann et al, Br J Pharmacol. 2011; 164:213-223).

[0011] Os mecanismos antioxidantes de defesa prejudicados, incluindo a atividade de SOD reduzida, e uma produção subsequente aumentada de peroxinitrito, podem ser um fator importante na patogênese da esteato-hepatite não alcoólica (NASH) (Koruk et al., Ann Clin Lab Sci. 2004; 34:57-62). Uma importante associação epidemiológica e clínica entre as infecções por vírus da hepatite B ou hepatite C e o desenvolvimento de hepatite crônica e o aparecimento do carcinoma hepatocelular é evidente. Curiosamente, a nitração de tirosina induzida por peroxinitrito é marcadamente aumentada em pacientes com hepatite viral crônica (Garcia-Monzon et al., J Hepatol. 2000; 32:331-338). Atualmente, o mecanismo geralmente citado de desenvolvimento de patologia na doença de Wilson envolve o dano oxidativo devido à sobrecarga de cobre. A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) assim como a oxidação lipídica e dano do DNA foi detectada no fígado, particularmente nos estágios avançados desta doença (Burkhead et al., Biometals 2011; 24:455-466).

[0012] Os derivados de MnPLED não são alvos para o peroxinitrito e a adição de derivados de MnPLED exógenos pode em tais situações para re-estabelecer o potencial protetor. Os derivados de PLED são além de fortes aglutinantes de ferro, como descrito na EP 1054670, US 6310051 e por Rocklage et al., (Inorg Chem 1989; 28:477-485), e alguns derivados de MnPLED podem ter atividades de catalase

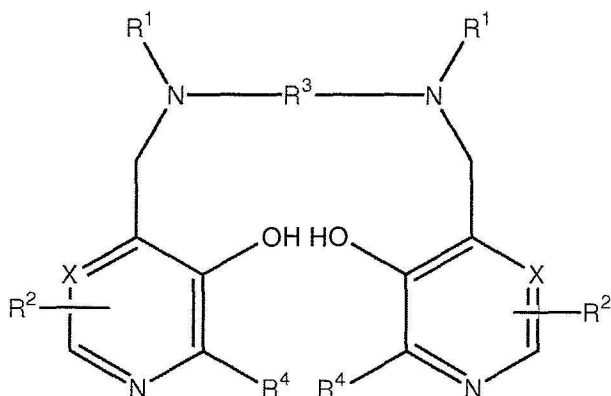
e glutathione redutase (Laurent et al., 2005), podem aumentar ainda mais a sua capacidade antioxidante.

[0013] Para uso no diagnóstico por imagem e outro uso esporádico, a dissociação de manganês de mangafodipir não apresenta nenhum grande problema toxicológico. Devido à absorção no CNS, no entanto, para uso mais freqüente, por exemplo, em métodos terapêuticos, a toxicidade de manganês acumulada pode representar um sério problema neurotoxicológico (Crossgrove et al, NMR Biomed. 2004; 17:544-53). Assim, para uso terapêutico mais freqüente, os compostos que facilmente se dissociam do manganês devem ser evitados e há uma necessidade de desenvolver meios para a obtenção de efeitos terapêuticos desejáveis, enquanto reduz os efeitos colaterais indesejáveis associados com tal uso terapêutico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] Os complexos, composições e métodos da presente invenção fornecem melhoras na preparação e uso de complexos metálicos de derivados de PLED. Em uma forma de realização, a invenção é direcionada a um complexo de metal misturado de um composto de Fórmula I, ou um sal deste, em que os metais misturados compreendem um metal de transição do Grupo III-XII e um metal do Grupo II:

Fórmula I



[0015] em que

[0016] X representa CH ou N;

[0017] cada R¹ independentemente representa hidrogênio ou -CH₂COR⁵;

[0018] R^5 representa hidróxi, alcóxi, amino ou alquilamido opcionalmente submetido à hidróxi;

[0019] cada R^2 independentemente representa ZYR^6 em que Z representa uma ligação ou um grupo de alquilenos ou oxoalquilenos C_{1-3} , opcionalmente substituído por R^7 ;

[0020] Y representa uma ligação, um átomo de oxigênio ou NR^6 ;

[0021] R^6 é um átomo de hidrogênio, $COOR^8$, grupo de alquila, alquênica, cicloalquila, arila ou aralquila, opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados de $COOR^8$, $CONR^8_2$, NR^8_2 , OR^8 , $=NR^8$, $=O$, $OP(O)(OR^8)R^7$ e OSO_3M ;

[0022] R^7 é hidróxi, grupo de alquila ou aminoalquila opcionalmente submetido a hidróxi, opcionalmente alcoxilado;

[0023] R^8 é um átomo de hidrogênio ou um grupo de alquila, opcionalmente submetido a hidróxi, opcionalmente alcoxilado;

[0024] M é um átomo de hidrogênio ou um equivalente de um cátion fisiologicamente tolerável;

[0025] R^3 representa um grupo de alquilenos C_{1-8} , 1,2-cicloalquilenos ou 1,2-arilenos, opcionalmente substituído com R^7 ; e

[0026] cada R^4 independentemente representa hidrogênio ou alquila C_{1-3} ,

[0027] ou um sal deste.

[0028] Em outra forma de realização, a invenção é direcionada a um complexo de cálcio e manganês de um composto de Fórmula I. Os complexos metálicos misturados, e particularmente o complexo de cálcio-manganês misturado calmangafodipir aqui descrito, constituem novas entidades químicas.

[0029] A presente invenção também é direcionada aos métodos de produção de um complexo de metal misturado que compreende uma cristalização de uma só etapa a partir de uma solução de metal de transição do Grupo III-XII, de metal do Grupo II, e um composto de Fórmula I.

[0030] Em outra forma de realização, a invenção é direcionada a um método de tratamento de uma condição patológica em um paciente, compreendendo a administração ao paciente de um complexo de metal misturado de acordo com a

invenção, opcionalmente em conjunto com um ou mais portadores e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis.

[0031] Os complexos de acordo com a invenção são vantajosos pelo fato de que o metal do Grupo II estabiliza o complexo a partir da liberação do metal de transição do Grupo III-XII. Isto reduz os efeitos tóxicos associados com o uso de complexos de metal de transição do Grupo III-XII anteriores, por exemplo, derivados de MnPLED tais como mangafodipir. Os complexos da invenção também podem apresentar tratamento melhorado e/ou proteção contra as condições patológicas, particularmente aquelas motivadas pela presença de radicais livres derivados do oxigênio, isto é, o estresse oxidativo. Melhorias adicionais e vantagens da presente invenção serão mais evidentes à vista da Descrição Detalhada abaixo apresentada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0032] A seguinte descrição detalhada será mais completamente entendida em vista dos desenhos, em que:

[0033] A Fig. 1 mostra os padrões de difração em pó de raio-X (XRPD) para três formas cristalinas de um complexo de cálcio e manganês de fodipir (DPDP), tendo uma relação molar Ca:Mn aproximada de cerca de 4:1, aqui referido como "calmangafodipir", obtido em um método de cristalização de uma só etapa de acordo com a invenção, como descrito no Exemplo 1.

[0034] A Fig. 2 mostra os padrões de XRPD de misturas de fodipir cálcico (calfodipir) e fodipir manganês (mangafodipir), em vez de um complexo de acordo com a invenção; estes padrões de XRPD indicam que todos os produtos eram amorfos e foram mostrados de absorver água rapidamente, como descrito no Exemplo 2.

[0035] A Fig. 3 mostra o espectro de absorção de infravermelho de transformação Fourier (FT-IR) de calmangafodipir, lote # 7755-C-R0-01-30-01, com as faixas características de absorção de infravermelho (total de onda) e as designações correspondentes descritas no Exemplo 3.

[0036] As Figs. 4A e 4B mostram o espectro de massa (Fig. 4A) e o espectro de massa expandida (Fig. 4B) do calmangafodipir, lote # 7755-C-R0-01-30-01 (660 a

850 m/z), como descrito no Exemplo 3.

[0037] A Fig. 5 mostra a estrutura química de calmangafodipir, como descrito no Exemplo 3.

[0038] A Fig. 6A mostra o aumento no teor de manganês (Mn) na urina de 0 a 24 h, expresso como o teor total de Mn menos o teor basal de Mn, de ratos injetados com mangafodipir ou calmangafodipir contendo 2,59 μmol e 2,52 μmol de Mn, respectivamente. A Fig. 6B mostra o aumento no teor de Mn na urina expresso em porcentagem da dose injetada. A Fig. 6C mostra o aumento no teor de zinco da urina em 24 h nos mesmos animais. Os resultados são expressos como média \pm S.E.M.; $n = 4$ em cada grupo. Estes números são mais completamente descritos no Exemplo 4.

[0039] As Figs. 7A a 7D mostram os efeitos mielossupressores nas glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYM), neutrófilos (NEU) e plaquetas (PLC), respectivamente, de uma única injeção intravenosa de doses crescentes (7,5, 10,0 e 12,5 mg/kg) de oxaliplatina em 3 e 6 dias após a injeção. Os resultados expressos como média \pm S.E.M.; $n = 5$ em cada grupo, como descrito no Exemplo 5.

[0040] As Figs. 8A a 8D mostram WBC, LYM, NEU e CP, respectivamente após o tratamento isolado de oxaliplatina ou em combinação com calmangafodipir ou mangafodipir em camundongos balb/c. Os controles receberam apenas o tratamento com veículo. Os resultados expressos como média \pm S.E.M.; $n = 5$ em cada grupo, como descrito no Exemplo 5.

[0041] As Figs. 9A e 9B mostram a atividade citotóxica de vários derivados de PLED e CaCl_2 nas concentrações crescentes de células CT26 de câncer do cólon. Os resultados são expressos como a média \pm S.D.; $n = 3$), como descrito no Exemplo 6.

[0042] A Fig. 10A mostra o efeito antitumoral de uma oxaliplatina de alta dose (20 mg/kg) em camundongos balb/c singênicos CT26 na ausência e presença de uma dose relativamente elevada de calmangafodipir (50 mg/kg). A Fig. 10B mostra o efeito antitumoral de uma dose baixa de oxaliplatina (10 mg/kg) na ausência e na presença de uma dose relativamente baixa de calmangafodipir. Os resultados são

expressos como a média \pm S.E.M.; n = 10 nos grupos de veículo e oxaliplatina de 20 mg/kg na Fig. 10A; n = 5 em todos os outros grupos), como descrito no Exemplo 7.

[0043] As Figs. 11A a 11C mostram o teor de Mn do cérebro, pâncreas e fígado, respectivamente, após 39 doses de NaCl (controles), mangafodipir ou calmangafodipir (que corresponde em ambos os casos a uma dose acumulada de 2800 μ mol/kg de manganês). Os resultados são expressos como média \pm S.E.M.; n = 17 a 18 em cada grupo, como descrito no Exemplo 8.

[0044] As Figs. 12A a 12D mostram os efeitos mielossupressores de glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYM), neutrófilos (NEU) e plaquetas (PLC), respectivamente, de uma única injeção intravenosa de doses crescentes (75, 100 e 125 mg/kg) de carboplatina em 3 e 6 dias após a injeção. Os resultados expressos como média \pm S.E.M.; n = 5 em cada grupo, como descrito no Exemplo 9.

[0045] As Figs. 13A a 13D mostram WBC, LYM, NEU e CP, respectivamente, após a carboplatina em combinação com calmangafodipir em camundongos balb/c. Os controles receberam apenas o tratamento com veículo. Os resultados expressos como média \pm S.E.M.; n = 5 em cada grupo, como descrito no Exemplo 9.

[0046] A Fig. 14 mostra o efeito antitumoral de uma baixa dose de oxaliplatina (10 mg/kg) em camundongos balb/c competentes imunes que carregam CT26 e camundongos balb/c nus deficientes imunes (nu/nu) na ausência e na presença de uma dose relativamente baixa de calmangafodipir. Os resultados são expressos como \pm S.E.M.; n = 5 em cada grupo, como descrito no Exemplo 10.

[0047] As Figs. 15A e 15B mostram a atividade citotóxica de calmangafodipir e mangafodipir em células cancerosas do pulmão de células não pequenas U1810 e LLC1, respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm S.D.; n = 3, como descrito no Exemplo 11.

[0048] Os desenhos serão mais completamente compreendidos à vista dos exemplos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0049] Os complexos, composições e métodos da presente invenção fornecem melhoras na preparação e uso de complexos metálicos de derivados de PLED, isto

é, derivados de piridoxil etildiamina, embora seja reconhecido que os derivados também atuam como pró-medicamentos de PLED, visto que eles podem metabolizar para formar PLED in vivo.

[0050] A WO 2011/004325 A1 demonstra como o excesso adicionado de fodipir (DPDP) ao mangafodipir (MnDPDP) o estabiliza na liberação de manganês após a administração, e assim reduz a absorção no CNS, e desse modo reduz consideravelmente o potencial neurotóxico do mangafodipir. Visto que é o complexo contendo manganês intacto que exerce efeitos SOD-miméticos e citoprotetores, o excesso de fodipir, portanto, não apenas diminui o potencial neurotóxico, mas também irá aumentar consideravelmente a eficácia citoprotetora.

[0051] Na liberação in vivo de manganês a partir dos derivados de MnPLED, incluindo ácido manganês N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (Mangafodipir), depende da presença de zinco livre ou facilmente dissociável no corpo. O zinco possui cerca de 1000 vezes mais afinidade do que o manganês para o fodipir ou suas contrapartes desfosforiladas (Rocklage et al., 1989). Estudos experimentais sugerem que a liberação do manganês in vivo do mangafodipir satura em doses excedentes a 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Southon et al., 1997). A formação de imagem cardíaca e hepática com mangafodipir em voluntários saudáveis indica uma dose de saturação semelhante no homem (Skjold et al., J. Magn. Reson. Imaging 2004, 20:948-952, Toft et al., 1997).

[0052] Na invenção descrita na WO 2011/004325 A1, a composição terapêutica particular foi assumida de ser obtida pela mistura de dois ingredientes farmacêuticos ativos (APIs), por exemplo, mangafodipir e fodipir, em uma solução pronta para uso, ou administrando-os separadamente. Demonstrou-se que o fodipir em um nível de dose ao redor de de 5 a 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ tinha um considerável efeito de estabilização in vivo sobre o mangafodipir. As primeiras experiências clínicas (Yri et al., 2009 e Karlsson et al., 2011) mostram que o mangafodipir é terapeuticamente eficaz em um nível de dose entre 2 e 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ no homem. Levando-se em consideração a maior eficácia do mangafodipir acrescido de fodipir, é razoável presumir que o mangafodipir deve ser terapeuticamente eficaz em pacientes em um nível de dose

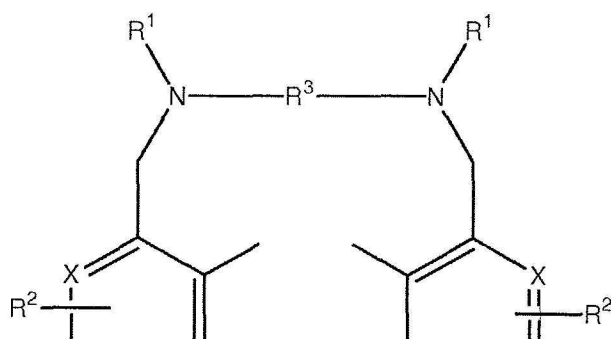
próximo a 1 $\mu\text{mol/kg}$. Este, por sua vez, nos ensina que uma relação de (fodipir + mangafodipir) / mangafodipir próxima a 5, isto é, uma formulação pronta para uso contendo 4 vezes mais fodipir do que mangafodipir, seria eficaz. Além disso, isto sugere que uma formulação pronta para uso contendo 40 mM fodipir e 10 mM mangafodipir - administração de 0,1 a 0,2 ml desta formulação por kg de peso corporal - resultaria em uma dose de 1 a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de mangafodipir e 4 a 8 $\mu\text{mol/kg}$ de fodipir.

[0053] O cálcio possui cerca de 10^9 vezes afinidade mais baixa para fodipir do que o zinco e cerca de 10^6 vezes afinidade mais baixa para fodipir do que o manganês. No entanto, levando-se em consideração que o cálcio está presente em concentrações extracelulares muito mais elevadas do que o zinco e manganês, a administração de bolo intravenosa rápida de fodipir pode induzir a redução aguda na concentração extracelular de cálcio livre. Visto que o coração é absolutamente dependente de cálcio extracelular para sua atividade de bombeamento do sangue, a redução no teor extracelular de cálcio livre pode por sua vez induzir a insuficiência cardíaca aguda. No entanto, como debatido na WO 2011/004325 A1, este problema pode ser facilmente resolvido por meio da utilização do DPDP, isto é, CaDPDP.

[0054] Surpreendentemente, descobriu-se que o CaDPDP pode ser empregado em um complexo com o manganês nos derivados de PLED. Além disso, surpreendentemente, os complexos de cálcio e manganês, por exemplo, calmangafodipir, e complexos de outros metais do Grupo II e metais de transição do Grupo III-XII, podem ser obtidos.

[0055] Assim, de acordo com um aspecto, a invenção é direcionada a um complexo de metal misturado de um composto de Fórmula I, ou um sal deste, em que os metais misturados compreendem um metal de transição do Grupo III-XII e um metal do Grupo II:

Fórmula I



OH HO

- [0056]** em que
- [0057]** X representa CH ou N;
- [0058]** cada R^1 independentemente representa hidrogênio ou $-\text{CH}_2\text{COR}^5$;
- [0059]** R^5 representa hidróxi, alcóxi, amino ou alquilamido opcionalmente submetido à hidróxi;
- [0060]** cada R^2 independentemente representa ZYR^6 em que Z representa uma ligação ou um grupo de alquilenos ou oxoalquilenos C_{1-3} , opcionalmente substituído por R^7 ;
- [0061]** Y representa uma ligação, um átomo de oxigênio ou NR^6 ;
- [0062]** R^6 é um átomo de hidrogênio, COOR^8 , grupo de alquila, alquenila, cicloalquila, arila ou aralquila, opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados de COOR^8 , CONR^8_2 , NR^8_2 , OR^8 , $=\text{NR}^8$, $=\text{O}$, $\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)\text{R}^7$ e OSO_3M ;
- [0063]** R^7 é hidróxi, grupo de alquila ou aminoalquila opcionalmente submetido a hidróxi, opcionalmente alcoxilado;
- [0064]** R^8 é um átomo de hidrogênio ou um grupo de alquila, opcionalmente submetido a hidróxi, opcionalmente alcoxilado;
- [0065]** M é um átomo de hidrogênio ou um equivalente de um cátion fisiologicamente tolerável;
- [0066]** R^3 representa um grupo de alquilenos C_{1-8} , 1,2-cicloalquilenos ou 1,2-arilenos, opcionalmente substituído com R^7 ; e
- [0067]** cada R^4 independentemente representa hidrogênio ou alquila C_{1-3} .
- [0068]** Como aqui utilizado os termos “alquil” e “alquilenos” incluem cadeia hidrocarbonetos de cadeia reta e ramificada, saturados e insaturados. O termo “1,2-cicloalquilenos” inclui os grupos de cicloalquilenos e os grupos de cicloalquilenos

substituídos por alquila tanto cis quanto trans tendo de 5 a 8 átomos de carbono. O termo "1,2-arileno" inclui os grupos de fenila e naftila e seis derivados substituídos por alquila tendo de 6 a 10 átomos de carbono. A não ser que de outra maneira especificada, qualquer componente de alquila, alquilenos ou alquenilas pode convenientemente conter de 1 a 20, mais especificamente de 1 a 8, mais especificamente de 1 a 6, e ainda mais especificamente, de 1 a 4 átomos de carbono. Os componentes de cicloalquila podem convenientemente conter de 3 a 18 átomos do anel, especificamente de 5 a 12 átomos do anel, e ainda mais especificamente de 5 a 8 átomos do anel. Os componentes de arila compreendendo grupos de fenila ou naftila são preferíveis. Como grupos de aralquila, alquil fenil C₁₋₈, especialmente benzila, é preferível. Onde os grupos podem opcionalmente ser substituídos por grupos de hidroxila, estes podem ser de monossubstituição ou polissubstituição e, no caso de polissubstituição, os substituintes de alcóxi e/ou hidroxila podem ser carregados pelos substituintes de alcóxi.

[0069] O composto de Fórmula I pode ter os mesmos ou diferentes grupos de R² nos dois anéis de piridila, e estes podem ser ligados nas mesmas ou diferentes posições do anel. Em uma forma de realização específica, a substituição está nas posições 5 e 6, ou mais especificamente, na posição 6, isto é, posição para em relação ao grupo de hidroxila. Em uma forma de realização específica, os grupos de R² são idênticos e identicamente localizados, e mais especificamente, estão nas posições 6,6'. Nas formas de realização ainda mais específicas, cada R⁶ é um grupo de alquila mono- ou poli(hidróxi ou alcoxilado) ou um grupo da fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷.

[0070] Em outra forma de realização, a invenção é direcionada a um complexo de cálcio e manganês de um composto de Fórmula I. Em uma forma de realização, R⁵ é hidróxi, alcóxi C₁₋₈, etileno glicol, glicerol, amino ou alquilamido C₁₋₈; Z é uma ligação ou um grupo selecionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO e CH₂COCH₂; Y é uma ligação; R⁶ é um grupo de alquila mono- ou poli(hidróxi ou alcoxilado) ou da fórmula OP(O)(OR⁸)R⁷; e R⁷ é hidróxi, ou um grupo de alquila ou aminoalquila não substituído. Em uma forma de realização mais específica, R³ é

etileno e cada grupo R^1 representa $-CH_2COR^5$ em que R^5 é hidróxi. Em uma outra forma de realização, o composto de Fórmula I é o ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP), ou um sal farmaceuticamente aceitável deste. Em mais outras formas de realização, a matéria farmacêutica é um complexo de manganês e cálcio misturado de ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético, ou um sal deste.

[0071] O complexo de metal misturado pode incluir qualquer combinação de metais dos Grupos indicados. Em uma forma de realização específica, o metal de transição do Grupo III-XII é Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e/ou Ni^{2+} e o metal do Grupo II é Ca^{2+} e/ou Mg^{2+} . Em uma forma de realização mais específica, o metal de transição do Grupo III-XII é Mn^{2+} e o metal do Grupo II é Ca^{2+} ou uma mistura de Ca^{2+} e Mg . Nas formas de realização mais específicas, o metal do Grupo II é uma mistura de Ca^{2+} e Mg^{2+} em uma relação molar de Ca^{2+}/Mg^{2+} ao redor de 0,1 a 50, mais especificamente ao redor de 0,1 a 10.

[0072] Em outras formas de realização, o complexo de metal misturado contém uma relação molar de metal do Grupo II para o metal de transição do Grupo III-XII de cerca de 1 a 10. Em uma forma de realização específica, o metal de transição do Grupo III-XII é Mn^{2+} e o metal do Grupo II é Ca^{2+} e a relação molar de Ca^{2+}/Mn^{2+} é de cerca de 4. Em uma forma de realização mais específica, o metal de transição do Grupo III-XII é Mn^{2+} e o metal do Grupo II é Ca^{2+} e a relação molar de Ca^{2+}/Mn^{2+} é de cerca de 4, e o composto de Fórmula I é DPDP, isto é, o complexo é o calmangafodipir composto como aqui descrito.

[0073] Em outro aspecto, a invenção é direcionada a um método de produção de um complexo de metal misturado da invenção, em uma etapa de preparação/cristalização. O método compreende uma cristalização de uma só etapa a partir de uma solução do metal de transição do Grupo III-XII, do metal do Grupo II, e de um composto de Fórmula I. Em uma forma de realização específica, a cristalização de uma só etapa de uma solução de manganês, cálcio e um composto de fórmula I é conduzida. Em uma forma de realização mais específica, a solução possui uma relação de $(Ca + Mn)/Mn$ próxima a $(4 + 1)/1 = 5$, isto é, com uma

estequiometria de composição próxima a $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$.

[0074] A Difração em Pó de Raio-X (XRPD) é a mais amplamente utilizada na identificação e caracterização de sólidos cristalinos, cada um dos quais produz um padrão de difração distinto. Ambas as posições (que correspondem aos espaçamentos de treliça) e a intensidade relativa das vias são indicativas de uma fase e material particular, fornecendo uma “impressão digital” para comparação. Como mostrado nos Exemplos, uma análise de XRPD de calmangafodipir demonstra sem dúvida de que o calmangafodipir é uma entidade química, isto é, um complexo, em vez de uma simples mistura, ver o Exemplo 1. A Fig. 1 mostra um gráfico empilhado das três formas cristalinas de calmangafodipir que interconverte de acordo com a umidade ambiental. A análise de XRPD de umidade variável demonstrou que a Forma B é estável em 40 % de umidade relativa (RH), a Forma A é estável em 0 a 10 % de RH, e a Forma C é estável entre 6 a 36 % de RH. As misturas das Formas B e C foram observadas entre 38 a 44 % de RH, e a conversões da forma foram observadas de ocorrer dentro de 3 horas em uma escala de 10 mg.

[0075] A preparação de uma só etapa pode ser executada com ou sem sementeira, mas a sementeira (como exemplificada no Exemplo 1) leva em conta um melhor controle da cristalização.

[0076] A preparação de uma só etapa brevemente mencionada acima é superior àquela da mistura de complexos metálicos individuais. Assim, em uma forma de realização específica, o complexo de cálcio e manganês é um material cristalino e facilmente distinto de uma mistura simples de mangafodipir (MnDPDP) e calfodipir (CaDPDP) nas quantidades desejadas, como mostrado no Exemplo 2.

[0077] Os exemplos também mostram melhoras e vantagens dos complexos de acordo com a invenção, como representado pelo complexo de cálcio-manganês calmangafodipir. No que diz respeito à estabilidade de manganês in vivo, o calmangafodipir é pelo menos tão estável quanto uma verdadeira mistura de mangafodipir e fodipir, como demonstrado no Exemplo 4. Isto irá resultar em retenção significativamente menor de manganês no cérebro, como demonstrado no

Exemplo 8. Visto que a eficácia citoprotetora depende principalmente do complexo de manganês mangafodipir intacto ou suas contrapartes desfosforiladas, o MnDPMP e o MnPLED, a eficácia do calmangafodipir é superior àquela do mangafodipir, como exemplificado no Exemplo 5. Além disso, o mangafodipir foi surpreendentemente observado de possuir efeitos citotóxicos contra as células cancerosas, por exemplo, células CT26 (Laurent et al., 2005; Alexandre et al., 2006; EP 16944338). No entanto, como descrito na WO 2009/078794 A1 e em Kurz et al., 2012, esta é uma propriedade inerente de fodipir isoladamente ou de suas contrapartes desfosforiladas, DPMP e PLED, e não do complexo de metal intacto mangafodipir ou as suas contrapartes desfosforiladas, MnDPMP e MnPLED. No Exemplo 6 demonstra-se que o fodipir é ao redor de 20 vezes mais eficaz do que o mangafodipir em neutralizar as células de câncer do cólon CT26, e no Exemplo 11 mostra que o calmangafodipir é ao redor de 28 vezes mais eficaz do que o mangafodipir em neutralizar as células de câncer do pulmão de células não pequenas U1810. A dissociação em certa medida do manganês de fodipir, sob condições in vitro, mais provavelmente explica a eficácia de neutralização do câncer de mangafodipir. O calmangafodipir como descrito nos Exemplos 1, 2 e 3, em comparação com o mangafodipir em concentrações equimolares de manganês, é por outro lado tão eficaz quanto o fodipir isoladamente, isto é, a eficácia de neutralização do calmangafodipir é muito mais elevada do que aquela do mangafodipir em concentrações equimolares de manganês. Esta descoberta sugere duas propriedades importantes. Em primeiro lugar, o PLED desfosforilado é provavelmente tão eficaz quanto a sua contraparte fosforilada fodipir no que diz respeito à sua capacidade de neutralização das células de câncer, e em segundo lugar, a menor estabilidade da MnPLED em comparação com aquela do mangafodipir (Rocklage et al., 1989), provavelmente explica a eficácia mais elevada de MnPLED. A ausência de qualquer atividade citotóxica de ZnDPDP e ZnPLED é devido à estabilidade 1000 vezes mais elevada destes complexos em comparação com as suas contrapartes de manganês (Rocklage et al., 1989).

[0078] Durante o desenvolvimento de mangafodipir como um agente de

contraste de MRI, descobriu-se que o MnDPDP causou anormalidades esqueléticas fetais em ratos, mas não em coelhos. Importante ainda, este efeito teratogênico visto em ratos não é provocado pelo mangafodipir intacto per se, mas pelo manganês dissociado (Grant et al., Acta Radiol. 1997; 38:759-769). Embora seja incerto que manganês irá causar anormalidades esqueléticas no feto humano, é evidentemente essencial proteger as mulheres potencialmente grávidas de serem expostas ao mangafodipir. Isso representa um problema secundário para a maioria das aplicações clínicas, mas um grande problema ocupacional, em particular durante a produção onde medidas dispendiosas devem ser tomadas a fim de proteger as mulheres férteis e potencialmente grávidas da exposição ao mangafodipir. O mais importante ainda, o fato de que o calmangafodipir irá liberar o manganês em um grau muito menor do que o mangafodipir após ser acidentalmente absorvido pelo corpo, naturalmente reduzirá o risco consideravelmente de que um feto desenvolva malformações esqueléticas. Em segundo lugar, visto que o calmangafodipir é significativamente mais eficaz do que o mangafodipir em doses equimolares de manganês, a necessidade de manganês é consideravelmente reduzida para cada dose de calmangafodipir produzido, o que irá resultar em menor exposição ao manganês durante a produção.

[0079] Além disso, a preparação de um único ingrediente farmacêutico ativo reduz o custo de fabricação de uma dose de tratamento. Além disso, a necessidade para a dosagem de um único material reduz a possibilidade de erros na formulação do produto. No teste de estabilidade, a estabilidade de um produto cristalino tem sido demonstrada de ser superior ao material amorfo, tal como aquele formado pela secagem por pulverização de uma mistura dos dois API's. Conforme ilustrado no Exemplo 2, o material amorfo obtido a partir da secagem por pulverização foi mostrado absorver água rapidamente, formando partículas fundidas e/ou sólidos pegajosos dentro de 24 h da exposição a 25 °C/60 RH e 40 °C/75 RH. Em contraste, o calmangafodipir cristalino permaneceu um sólido de circulação livre mesmo após 7 dias sob as mesmas condições de exposição.

[0080] Descobriu-se, como descrito na WO 2011/004325 A1, que a adição de

excesso de derivado de PLED não contendo manganês, por exemplo, DPDP, à terapia derivada de MnPLED, protege o mangafodipir da liberação de manganês neurotóxico in vivo. Embora o mecanismo atrasado de absorção de manganês no cérebro não seja totalmente compreendido, o excesso do derivado de PLED não contendo manganês tal como fodipir administrado em combinação com o derivado de PLED contendo manganês tal como mangafodipir, significativamente reduz a absorção de manganês no cérebro. Embora não desejando ser limitado pela teoria, acredita-se que a combinação de acordo com a invenção de WO 2011/004325 A1 mantenha a forma quelante do MnPLED, por meio do qual maiores quantidades de quelatos são disponíveis para excreção e a quantidade de Mn livre para a absorção no cérebro e outros órgãos é reduzida. Os quelatos de manganês de baixo peso molecular, como os derivados de MnPLED, e as suas contrapartes de Zn, facilmente serão excretados pelo rim, regido pela taxa de filtração glomerular (GFR), enquanto que o manganês não ligado a um quelante de baixo peso molecular será retido por um bom tempo no corpo e excretado lenta e principalmente através da via biliar (Toft et al., 1997). Como mostrado no seguinte Exemplo 8 anexo, repetidas (39 vezes ao longo de 3 meses) injeções intravenosas de uma dose elevada (36 vezes a dose clínica assumida) de calmangafodipir em ratos causou significativamente menos retenção de manganês no cérebro, em comparação com aquela provocada pelo mangafodipir. A dose total em ambos os casos correspondeu aproximadamente a 2800 $\mu\text{mol/kg}$ de manganês. Este exemplo também mostra que o pâncreas absorve e retém o manganês dissociado em uma grau relativamente grande, uma propriedade previamente descrito por Ni et al. (*Acta Radiol* 1997; 38:700-707) e utilizada como um método promissor de diagnóstico MRI do pâncreas (Ahlström et al, *Acta Radiol* 1997; 38:660-664). O nível de manganês significativamente mais baixo no pâncreas de ratos tratados com calmangafodipir em comparação com aqueles tratados com mangafodipir confirma ainda mais o perfil toxicológico melhorado do calmangafodipir. Embora o teor de Mn do fígado tenha sido significativamente elevado de forma estatística no grupo de mangafodipir, a elevação relativa foi muito menor do que aquela no cérebro e pâncreas. Uma dose

única de diagnóstico de mangafodipir (5 $\mu\text{mol/kg}$ b.p.) é conhecida der causar rápido aumento no teor de Mn tanto do pâncreas quanto do fígado de ratos - após 2 horas o teor de Mn do pâncreas foi aproximadamente 10 vezes maior do que o valor basal, e o valor correspondente do fígado foi aumentado cerca de 2 vezes (Ni et al., 1997). Enquanto que Ni et al observaram o teor de Mn ainda elevado após 24 horas no pâncreas (cerca de 5 vezes o valor basal), ele estava de volta ao valor de referência no fígado nesse momento. Isto presumivelmente reflete a alta capacidade do fígado de tratar o manganês e o seu importante papel fisiológico na homeostasia do manganês. Isto ainda é sustentado pelos presentes resultados que mostram apenas um aumento modesto no Mn do fígado após a exposição pesada ao mangafodipir. O perfil toxicológico melhorado de calmangafodipir é claramente ilustrado pelo Exemplo 8 anexo.

[0081] Quando uma dose clínica de um derivado de MnPLED tal como mangafodipir (isto é, 5 a 10 $\mu\text{mol/kg}$ p.b., administração intravenosa) é utilizada como um agente de contraste para a MRI em um ser humano, ao redor de 80 % do manganês ligado ao fodipir (DPDP) é trocado com zinco (Toft et al., 1997). Quando doses menores de mangafodipir são administradas, a porcentagem de manganês que se dissocia será ainda maior. O mangafodipir se comporta nessa perspectiva de um modo semelhante em ratos e cães (Hustvedt et al., 1997); no entanto, quase todo o manganês no mangafodipir é trocado pelo zinco, quando o composto é administrado em porcos e é, conseqüentemente, sem efeitos citoprotetores em suínos (Karlsson et al., 2001). Por outro lado, a administração de doses baixas de MnPLED provoca profundos efeitos citoprotetores em porcos, visto como uma dimensão do infarto do miocárdio significativamente reduzida após a isquemia-reperfusão. Embora a constante de estabilidade relatada entre Mn^{2+} e PLED seja consideravelmente mais baixa do que a figura correspondente para o Mn^{2+} e fodipir (Rocklage et al., 1989), o MnPLED por alguma razão desconhecida escapa da troca de metal. O deslocamento de manganês é um pré-requisito e, portanto, desejável para uso como um agente de contraste de MRI, por exemplo, para os propósitos de diagnóstico do fígado e pâncreas. No entanto, o efeito terapêutico de SOD-mimético

contra várias formas de estresse oxidativo depende totalmente do complexo derivado de manganês PLED intacto (Brurok et al., 1999; Karlsson et al., 2001). Por exemplo, enquanto que a administração in vivo de mangafodipir protege contra vários estressores oxidativos, por exemplo, isquemia-reperfusão, medicamentos citotóxicos/citostáticos e intoxicação por acetaminofeno, ele não protege o coração de porcos contra o infarto do miocárdio induzido por isquemia-reperfusão (Karlsson et al., 2001), cujos resultados podem ser concluídos pelo fato de que os efeitos citoprotetores in vivo de derivados de MnPLED são uma propriedade inerente do complexo de manganês intacto.

[0082] A presença de Ca em um excesso de aproximadamente 4 vezes com relação ao Mn, como no calmangafodipir, profundamente estabiliza o complexo ou suas contrapartes desfosforiladas de liberação de manganês após as injeções, e assim fornece uma outra vantagem importante, isto é, a eficácia terapêutica aumentada. Por exemplo, quando uma dose de contraste clinicamente relevante de MnDPDP (5 a 10 $\mu\text{mol/kg}$) é injetada por via intravenosa, cerca de 80 % do manganês originalmente ligado ao DPDP é liberado, o que contribui para a eficácia de contraste. Conseqüentemente menos do que 20 % permanece ligado ao DPDP ou suas contrapartes desfosforiladas, o que contribui com a atividade terapêutica de MnDPDP. Visto que a liberação de manganês do complexo pode ser eficazmente reduzida por um excesso de aproximadamente 4 vezes de Ca, em comparação com o Mn, no calmangafodipir, isto significa que o manganês pode ser reduzido consideravelmente para um efeito terapêutico equípote, como claramente exemplificado na presente invenção. Em doses terapêuticas relevantes mais baixas e em certas formas de realização, o efeito de estabilização de Ca será ainda mais acentuado. Isso, por sua vez, significa que o uso de calmangafodipir em comparação com mangafodipir irá ter efeitos profundos sobre o potencial neurotóxico - tanto como um resultado de um efeito de estabilização in vivo quanto como um resultado da eficácia terapêutica aumentada da nova matéria farmacêutica calmangafodipir, com uma estequiometria de composição próxima a $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$.

[0083] O zinco está presente em todos os tecidos e fluidos corporais. O teor total

de zinco no corpo de seres humanos tem sido estimado em 2 a 3 g (Folin et al., BioMetals 1994; 7:75-79). O zinco no plasma representa cerca de 0,1% do teor total de zinco no corpo, e é principalmente esta pequena fração de zinco que concorre com o manganês para a ligação ao fodipir ou suas contrapartes desfosforiladas, DPMP e PLED, após a administração. O corpo humano possui uma capacidade muito elevada de manter a homeostasia de zinco por meio de ajustes sinérgicos na absorção e excreção gastrointestinal (King et al., J Nutr 2000; 130:1360S-1366S).

[0084] Embora não desejando ser limitado pela teoria, a partir dos trabalhos pré-clínicos (Southon et al., 1997) e dos trabalhos clínicos (Skjold et al., 2004), pode ser razoável assumir que o corpo contém de 5 a 10 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal (p.c.) de zinco que é facilmente trocável por manganês em um derivado de MnPLED tal como mangafodipir. Isso substancialmente corresponde ao teor de zinco no plasma como descrito acima. Os derivados de PLED tais como fodipir contêm um sítio de ligação para o manganês/zinco por molécula. Assim, em vista da afinidade 1000 vezes mais elevada para o zinco com relação ao quelante, a presença de cálcio no calmangafodipir em uma relação de cerca de 4 em comparação com o manganês irá proteger contra a liberação de manganês após administração parentérica a um paciente.

[0085] Em outra forma de realização, a invenção é direcionada aos métodos para o tratamento de uma condição patológica em um paciente, incluindo, mas não limitado a estes, uma condição patológica provocada pela presença de radicais livres derivados de oxigênio, isto é, o estresse oxidativo, através da administração do complexo. Em uma forma de realização específica, a condição patológica é provocada por superóxido resultando em subsequente peroxidação de lipídeo e/ou nitração de proteína. Em uma forma de realização específica, o complexo pode ser administrado para o tratamento terapêutico de uma tal condição patológica em um paciente humano ou outro mamífero. Em outra forma de realização específica, um complexo de acordo com a invenção é administrado para o tratamento de uma condição patológica provocada pela presença de radicais livres derivados de oxigênio, isto é, o estresse oxidativo, em um mamífero.

[0086] Em uma forma de realização, o complexo é empregado no tratamento de medicamento citotóxico ou citostático, em que o complexo é administrado para fornecer proteção contra os efeitos colaterais desvantajosos dos medicamentos citotóxicos/citostáticos, por exemplo, um ou mais medicamentos contra o câncer em pacientes com câncer. Em uma forma de realização mais específica, o medicamento citotóxico ou citostático compreende pelo menos um de doxorubicina, epirrubina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, 5-fluorouracila, docetaxel ou paclitaxel. Nas formas de realização adicionais, a condição patológica é a mielossupressão ou neurotoxicidade, ou ambas.

[0087] Os métodos de acordo com a invenção também podem incluir, mas não são limitados a estes, o tratamento de insuficiência hepática induzida por acetaminofeno, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), hepatite crônica induzida por vírus, doença de Wilson, diabetes, doença cardíaca isquêmica, incluindo a lesão induzida por isquemia-reperfusão, ou lesão induzida por isquemia-reperfusão do miocárdio, tanto na forma aguda assim como eletiva, uma condição associada com um tratamento trombolítico, um desvio cardiopulmonar, ou angioplastia transluminal percutânea, ou é um resultado de uma cirurgia de transplante cardíaco ou de órgão ou acidente vascular cerebral. Nas formas de realização adicionais, os métodos de acordo com a invenção também podem incluir o tratamento de condições relacionadas com ferro, incluindo a sobrecarga de ferro, por exemplo, talassemia, anemia falciforme ou hemosiderose transfusional, cirrose do fígado induzida por hepatite, lesão induzida por radiação, por exemplo, resultante da terapia de radiação, várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Parkinson, e esclerose múltipla, e outros mais.

[0088] Em mais outras formas de realização, os métodos de acordo com a invenção são administrados como terapia de substituição para uma condição patológica de baixa atividade de manganês superóxido dismutase (MnSOD), tal como ocorre em várias formas de câncer (Buettner, *Anticancer Agents Med Chem* 2011, 11:341-346). Assim, em uma forma de realização, a invenção é direcionada a

um método para o tratamento do câncer do pulmão de células não pequenas mediante a administração do complexo da invenção, ou, mais especificamente, calmangafodipir. Nas formas de realização adicionais, a invenção é direcionada a um método para o tratamento de câncer colorretal, câncer da próstata, câncer da mama, câncer do pâncreas ou melanoma maligno, mediante a administração do complexo da invenção, ou, mais especificamente, calmangafodipir.

[0089] Uma propriedade interessante e provavelmente importante para o efeito antitumoral do mangafodipir pode ser a sua propriedade de proteção de linfócitos, como mostrado no Exemplo 5, e por Laurent et al., 2005 e Alexandre et al., 2006. Embora os processos inflamatórios secundários danifiquem o tecido normal por estresse oxidativo, eles podem de fato ser benéficos para o tecido tumoral através da criação do microambiente rico em fator do crescimento e promoção do crescimento de clones cancerosos (Anscher, *Oncologist* 2010; 15:350-359; Kareva, *Transl Oncol* 2011; 4:266-270; Kerkar et al., *Cancer Res* 2012; 72:3125-3130). Um exemplo surpreendente é a existência de macrófagos associados ao tumor que se acumulam preferencialmente nas regiões mal vascularizadas de tumores e secretam citocinas que realmente promovem o crescimento do tumor. Além disso, não apenas podem estas citocinas promover o crescimento do tumor, mas elas também foram mostradas de suprimir a ativação dos linfócitos CD8⁺ T, que são mais eficazes na eliminação de tumores. De fato, existe um interesse crescente com relação à importância da resposta imune mediada pelos linfócitos T para o resultado da quimioterapia de câncer (Zitvogel et al., *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:151-160; Kerkar et al., 2012). Sabe-se que a linfopenia grave (< 1000 células/ μ l) negativamente afeta a resposta de quimioterapia. Uma coleção de cânceres de camundongo, incluindo o câncer de cólon CT26, fibrossarcomas MCA205, cânceres da mama de linhagem celular TSA, osteossarcomas de linhagem celular GOS e timonas EL4, respondem à quimioterapia com doxorrubicina e oxaliplatina muito mais eficientemente quando são implantadas em camundongos imuno-competentes singênicos do que em hospedeiros imuno-deficientes, isto é, camundongos nus (Zitvogel et al., 2011). Isto está de acordo com os estudos clínicos que revelam que os linfócitos CD8⁺ T

produtores de IFN- γ são potentes efetores imunes ao câncer. Além disso, uma relação elevada de neutrófilos/linfócitos é associada com uma baixa sobrevivência global para os pacientes com câncer colorretal avançado (Chua et al., Br J Cancer 2011; 104:1288-1295). Levando-se em consideração que o mangafodipir e em particular o calmangafodipir são agentes protetores de linfócitos altamente eficientes durante a quimioterapia, é plausível que esta propriedade seja de particular importância durante as condições in vivo.

[0090] Para ser clinicamente útil, um protetor de quimioterapia ou um protetor de radioterapia utilizado em pacientes oncológicos deve satisfazer três critérios: (i) o agente deve proteger o tecido normal da toxicidade induzida por quimioterapia/radioterapia, mas não proteger o tecido do tumor (pelo menos não em qualquer extensão maior) – caso contrário nenhum benefício será obtido; (ii) o agente deve ser liberado com relativa facilidade e com toxicidade mínima; e (iii) o agente deve proteger os tecidos normais contra a toxicidade limitativa da dose ou aqueles responsáveis pela redução significativa na qualidade de vida (Citrin et al., 2010). Os compostos da invenção, e em particular calmangafodipir, preenchem todos estes critérios, assim como os exemplos aqui apresentados demonstram. A razão pela qual o mangafodipir e o calmangafodipir protegem as células não malignas, mas danificam as células cancerosas, é aparentemente um paradoxo. Embora não desejando ser limitado pela teoria, pode ser, no entanto, que a proteção de células não malignas e as ações citotóxicas contra as células cancerosas sejam apenas dois lados da mesma moeda. Um estado oxidativo elevado é indispensável para a estimulação mitogênica nas células transformadas (Irani et al., Science 1997;275:1649-1652). Vários estudos relataram que as espécies oxigênio reativas (ROS) desempenham um papel importante na promoção da metástase do tumor (por exemplo, Behrend et al., Mol Cell Biol 2005; 25:7758-7769). Estes dados são consistentes com um grande corpo de literatura que sugere que o equilíbrio de oxirredução de muitas células tumorais epiteliais favorece um ponto definido elevado de oxidante (Doroshov, 2006), incluindo as células CT26 (Laurent et al., 2005; Alexandre et al., 2006). A MnSOD suprime o crescimento de células em uma

variedade de linhagens celulares de câncer e em modelos de camundongo. Além disso, a super-expressão de MnSOD induziu a interrupção do crescimento na linhagem celular de câncer colorretal humana HCT116 e aumentou a senescência que requereu indução de p53 (Behrend et al., 2005). A introdução do gene de MnSOD normal nas células cancerosas altera o fenótipo e as células perdem a sua capacidade de formar colônias na cultura e tumores em ratos nus (Church et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:3113-3117). O estado oxidativo elevado visto nas células cancerosas tipicamente leva à produção aumentada de $\bullet\text{O}_2^-$, que facilmente reage com $\bullet\text{NO}$ para formar ONOO^- altamente tóxico, resultando em nitração de tirosina, o lado “desagradável” de $\bullet\text{NO}$ (Beckman et al, 1996; Radi, 2004). Curiosamente, uma evidência convincente sugere que a nitração de tirosina esteja envolvida na supressão descrita acima da resposta imunológica mediada por linfócito CD8+ em tumores (Bronte et al., J Exp Med 2005; 201, 1257-1268;. Molon et al., J Exp Med 2011; 208:1949-1962). Pode ser que o calmangafodipir através da sua atividade SOD mimética iniba a produção de ONOO^- e conseqüentemente à supressão imunológica, que explica o aumento do efeito anti-tumoral observado em ratos imuno-competentes, mas não camundongo imuno-incompetentes, como demonstrado pelo Exemplo 10. O peroxinitrito não é capaz de nitração de proteína diretamente, mas tipicamente precisa de um metal de transição ativo de oxirredução como o ferro ou o cobre (e ainda o manganês podem satisfazer esta necessidade) (Radi, 2004). O fodipir e os seus metabólitos desfosforilados possuem uma afinidade extremamente elevada para Fe^{3+} (Rocklage et al., 1989). Esta propriedade pode, além da atividade de SOD mimética de calmangafodipir, ser de uma importância particular para a atividade anti-tumoral. Além da ação dependente de linfócitos T, a ação imune-independente direta de DPDP e PLED, pode ser devido à inibição da topoisomerase II, como um artigo recente de Kurz (2012) pode sugerir.

[0091] O complexo pode ser administrado em uma composição farmacêutica. Opcionalmente, as composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir um ou mais portadores e/ou excipientes fisiologicamente aceitáveis, de uma maneira bem conhecida para aqueles versados na técnica. Em uma forma de realização, o

complexo pode, por exemplo, ser suspenso ou dissolvido em um meio líquido, opcionalmente com a adição de excipientes farmacologicamente aceitáveis. Os excipientes adequados as composições farmacêuticas incluem quaisquer excipientes de formulação farmacêutica ou veterinária convencionais, incluindo, mas não limitado a estes, estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste da osmolalidade, tampões, agentes de ajuste do pH, aglutinantes, cargas, e outros mais. As composições farmacêuticas podem estar em uma forma adequada para a administração, incluindo a administração tanto parentérica quanto entérica. Em uma forma de realização específica, a composição está em uma forma adequada, por exemplo, injeção ou infusão. Assim, as composições farmacêuticas da presente invenção podem estar em uma forma de administração farmacêutica convencional tal como um comprimido, cápsula, pó, solução, suspensão, dispersão, xarope, supositório, aerossol, pomada, emplastro, ou coisa parecida. Em uma outra forma de realização, o complexo está na forma liofilizada e, se desejável, pode ser reconstituído antes da administração. O complexo liofilizado pode estar em composição liofilizada contendo um ou mais estabilizantes, e/ou outros excipientes conhecidos para uso na liofilização.

[0092] Tais composições de acordo com a presente invenção podem ser administradas por várias vias, por exemplo, por via oral, transdérmica, retal, intratecal, tópica ou por meio de inalação ou injeção, em particular a injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravascular. Outras vias de administração também podem ser utilizadas, incluindo Intratimpânica e intranasal, e as vias que aumentam a eficácia, a biodisponibilidade ou a tolerância dos produtos são preferíveis. A via mais apropriada pode ser selecionada por aqueles versados na técnica de acordo com a formulação particular que é utilizada. As dosagens adequadas serão evidentes em relação ao tratamento selecionado. Em uma forma de realização, o método de tratamento de acordo com a invenção compreende a administração de cerca de 0,01 a 50 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal do complexo de metal misturado. Nas formas de realização mais específicas, o método de tratamento de acordo com a invenção compreende a administração de cerca de 0,1 a 10 $\mu\text{mol/kg}$,

ou cerca de 0,1 a 5 $\mu\text{mol/kg}$, peso do corpo do complexo de metal misturado.

[0093] Os exemplos que se seguem demonstram as várias formas de realização e aspectos da invenção.

Exemplo 1

Método

[0094] Um reator de 100-L revestido esguichado com N_2 foi carregado com fodipir (DPDP) (4,0 kg baseado em anidro, 6,27 mol, 1 equiv) e água deionizada (DI) (19,2 L, 4,88 vol). O pH do lote foi ajustado para 5,7 com NaOH diluído (8,9 L total, 17,5 mol de NaOH, 2,8 equiv; preparado de 1,41 kg de 50 % em peso de NaOH e 8,0 L de água DI) durante 35 min (21,0 a 23,3 °C; esfriamento externo). A pasta fluida foi agitada durante 1 h em 20 a 25 °C durante cujo tempo uma solução se formou. Para isso foi sequencialmente carregado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (361,1 g, 4,87 mol, 0,78 equiv), ácido L-ascórbico (55,1 g, 0,313 mol, 5 % molar), e MnO (80 g, 1,13 mol, 0,18 equiv). Após a adição de cada reagente o lote foi agitado durante 30 a 60 minutos em 20 a 25 °C e o pH foi medido (depois Ca = 6,24, amarelo claro à cor de ferrugem ligeiramente turva; depois ascórbico = 6,28 cor de ferrugem menos turva; depois Mn = 6,38, ferrugem turva a verde amarelado). O lote turvo foi agitado durante 16 h em 20 a 25 °C, o pH foi medido (6,36) e o lote foi filtrado através de um filtro em linha de 0,3 μ em um reator limpo de 100 L. Enquanto isso, uma solução de etanol (EtOH) 23A foi preparada com acetona (5,9 L, 1,47 vol) e EtOH (74 L, 18,5 vol). Uma parte da solução de EtOH 23A (8,0 L, 2 vol) foi carregada no lote durante 30 minutos em 20 a 25 °C durante cujo tempo a solução tornou-se turva. O lote foi semeado com calmangafodipir (40 g, 1 % em peso) e agitado durante 30 minutos em 20 a 25 °C para garantir sólidos persistentes.

[0095] A temperatura do lote foi ajustada para 15 °C durante o curso de 1 h e depois amadurecido durante 30 min em 13,8 a 15,5 °C. Ao lote foi carregado EtOH 23A (56 L, 14 vol) durante 10 h (11 a 14 °C). A pasta fluida foi misturada durante 13 horas em 5 a 10 °C e depois filtrada para coletar os sólidos. O reator e os sólidos foram enxaguados com EtOH 23A gelado (0 a 10 °C) (14 L, 3,5 vol), os sólidos foram condicionados durante 2 h e depois secados em um forno a vácuo em 45 °C

durante 72 h para proporcionar 4,819 kg (93 % de rendimento ajustado com relação ao teor de água) de calmangafodipir (lote # 11AK0105B) como um sólido amarelo. A análise de HPLC revelou uma pureza de 98,8 %. A análise de Karl Fisher do forno (@ 170 °C) apresentou 10,1 % de água. A análise ICP indicou 4,27 % de Ca, 1,37 % de Mn, 8,64 % de Na para uma relação de Ca/Mn de 4,27, isto é, com uma estequiometria de composição próxima a $\text{Ca}_4\text{Mn}(\text{DPDP})_5$.

Resultados

[0096] A análise de XPPD (Difração em Pó de Raio X) foi conduzida e os padrões resultantes são mostrados na Fig. 1. Os padrões de XRPD demonstram que o calmangafodipir é uma entidade química única em vez de uma mistura simples. A Fig. 1 mostra um gráfico empilhado das três formas cristalinas conhecidas de calmangafodipir que interconverte de acordo com a umidade ambiental. A análise de XRPD da umidade variável demonstrou que a Forma B é estável com mais de 40 % RH, a Forma A estável em 0 a 10 % RH, e a Forma C estável entre 6 a 36 % RH. Misturas das Formas B e C foram observadas entre 38 a 44 % de RH, e as conversões de forma foram observadas de ocorrer dentro de 3 horas em uma escala de 10 mg.

Conclusão

[0097] Uma XRPD demonstrou surpreendentemente o calmangafodipir como sendo uma entidade química em vez de uma mistura simples (Fig. 1).

Exemplo 2

Método

[0098] Em uma relação de 4:1 aproximadamente 200 mg de calfodipir (CaDPDP) e 50 mg de mangafodipir (MnDPDP) foram pesados em um frasco de 40 ml e dissolvidos em 40 ml de água DI na temperatura ambiente para gerar uma solução amarela. A solução aquosa amarela foi secada utilizando um Buchi Mini Spray Dryer B-290 enquanto ligado ao desumidificador Buchi B-296 como um condicionador de ar que permite a entrada de ar do laboratório. As experiências de otimização da secagem por pulverização foram executadas em temperaturas elevadas de entrada (220 °C) com taxas de alimentação variáveis (20, 30, 40, 50 e 60 %). A recuperação

do produto variou 180 a 230 mg.

Resultados

[0099] Os materiais resultantes foram analisados por XRPD (Figura 2) que indicou que todos os produtos eram amorfos e foram mostrados de absorver água rapidamente, formando partículas fundidas e/ou sólidos pegajosos dentro de 24 horas de exposição a 25 °C/60 RH e 40 °C/75 RH.

Exemplo 3

[00100] Este exemplo elucida a estrutura da nova entidade química calmangafodipir, fazendo uso de: Espectroscopia de Absorção de Infravermelho; Espectroscopia de Massa; e Análise Elementar. A análise de NMR não pode ser utilizada para a análise de calmangafodipir devido à natureza paramagnética do Mn.

Métodos

[00101] As análises descritas neste exemplo foram conduzidas em um produto produzido de acordo com o método de uma só etapa aqui descrito. O produto é identificado como o lote # 7755-C-RO-01-30-01, e foi preparado essencialmente como descrito no Exemplo 1. Uma parte deste produto foi certificado como um padrão de referência para o calmangafodipir.

[00102] Espectroscopia de Absorção de Infravermelho. O espectro de absorção de infravermelho (FT-IR) de transformação de Fourier de calmangafodipir, lote # 7755-C-R0-01-30-01 foi obtido utilizando a reflexão total atenuada (ATR) em um espectrômetro Thermo-Nicolet Avatar 370.

[00103] Espectroscopia de Massa. O espectro de massa de calmangafodipir, lote # 7755-C-R0-01-30-01, foi adquirido em um sistema Waters Q-ToF Micro MS/MS. A ionização por Eletropulverização (ESI) (modo de polaridade iônica positiva) foi selecionada para a análise de MS. A amostra foi dissolvida em uma solução de 50:50 acetonitrila/água + 0,1 % ácido fórmico em uma concentração de 10 µg/ml. A solução foi infundida diretamente na fonte em uma taxa de 10 µl/minuto.

[00104] Análise Elementar. O calmangafodipir lote # 7755-C-R0-01-30-01 foi fabricado utilizando uma relação molar de Ca/Mn de 4,26 e 2,8 mol de Na/mol de fodipir. O teor de metais teórico do complexo com esta composição é de 1,41 % Mn,

4,38 % Ca e 8,69 % Na.

Resultados

[00105] O espectro de absorção de infravermelho é mostrado na Fig. 3, e as faixas de absorção de infravermelho características (total de ondas) e as designações correspondentes são como se segue:

Total de ondas (cm^{-1})	Designação
3250	N – H
3027 – 2848	C – H
1581	C = O
1528	C = C
1471, 1437	CH ₂ , CH ₃
1383	CH ₃
1277	P = O
1092	P – OH
1038, 977, 933, 913	P – O – C
827, 813, 770, 751	C – H aromático

[00106] O espectro de massa e um espectro de massa expandido da amostra são apresentados nas Figs. 4A e 4B, respectivamente. O espectro se apresenta como aquele de calfadipir e mangafodipir sobrepostos entre si. A massa exata do calfadipir totalmente protonado é 676 e uma massa de 677 para $[M + I]$ é observada. As massas exatas para monossódico, dissódico, trissódico e tetrassódico são 698, 720, 742 e 764, respectivamente. O espectro apresenta $[M + I]$ para cada espécie em 699, 721, 743 e 765, respectivamente. A massa exata de mangafodipir totalmente protonado é de 691, com as espécies de monossódio, dissódio trissódio, trissódio e tetrassódio correspondentes em 713, 735, 757 e 779, respectivamente. O espectro apresenta massas em 692, 714, 736, 758 e 780 para $[M + I]$ para cada espécie.

[00107] Os resultados de teor de metais para o lote # 7755-C-RO-OI -30-01 foram 1,48 % Mn, 4,44 % Ca e 8,56 % Na e estão de acordo com os valores esperados, confirmando que tanto o manganês quanto o cálcio são complexos, com o sódio como o contra-íon, e que pouco ou nenhum de cálcio está presente simplesmente

como um contra-íon.

Conclusão

[00108] Estes resultados são consistentes com a estrutura mostrada na Fig. 5. A Fig. 5 mostra o Ca/Mn ideal e genérico 4:1 com 3 Na como contra-íons, o que fornece o peso molecular de 745,43 mostrado na Fig. 5. O peso molecular médio para o material preparado como descrito e estudado neste Exemplo possui uma relação de Ca/Mn de 4,26 e Na de 2,8 como contra-íons, tendo um peso molecular de 740,89.

Exemplo 4

[00109] Este exemplo mediu a excreção de manganês (Mn) e zinco (Zn) na urina em animais que receberam calmangafodipir ou mangafodipir, em doses equimolares de Mn.

Método

[00110] Oito ratos Wistar machos (aproximadamente 250 g) foram injetados por via intravenosa, através de uma das veias da cauda, com 0,25 ml de uma solução de calmangafodipir 50 mM (lote # 11AK0105B), contendo aproximadamente 10 mM Mn e 40 mM Ca, ou 0,25 ml de mangafodipir 10 mM (lote # 02090106), contendo 10 mM Mn. Após a injeção, os ratos foram imediatamente colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina durante um período de 0 a 24 horas. Para obter o teor basal de manganês (Mn) e zinco (Zn) na urina, dois ratos adicionais (controles) receberam 0,25 ml de solução salina e foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina durante o mesmo de tempo. As amostras de urina foram então armazenadas a -80 °C até a análise de Mn. Antes da análise, as amostras foram descongeladas e extensivamente agitadas para se obter amostras homogêneas. Uma alíquota de cinco ml foi tomada de cada amostra de 5 ml de ácido nítrico concentrado foram adicionados. As amostras foram então desintegradas em um forno de microondas e depois disso diluídas com água destilada para um volume final de 50 ml. O teor de Mn de cada amostra foi analisado por ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Amostras idênticas de calmangafodipir e mangafodipir como aquelas injetadas nos ratos (isto é, 0,25 ml) foram retiradas e injetadas dentro de tubos de

teste. Estas amostras foram tratadas de uma maneira idêntica àquela das amostras de urina e analisadas quanto ao seu teor de Mn. Os resultados são apresentados como o teor total de Mn na urina em 0 a 24 h (expressos como $\mu\text{mol}/\text{kg} \pm \text{S.E.M.}$) e como porcentagem ($\pm \text{S.E.M.}$) da dose injetada. A diferença estatística entre os animais que receberam calmangafodipir e mangafodipir, em relação à excreção de manganês na urina, foi testada por um teste t de Student não pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

[00111] Os resultados são apresentados nas Figs. 6A, 6B e 6C. Vinte e quatro horas após a injeção iv de 0,25 ml de mangafodipir 10 mM contendo 2,59 μmol de manganês (Mn), $0,60 \pm 0,04 \mu\text{mol}$ de Mn foi recuperado na urina (Fig. 6A), o que corresponde a $23,1 \pm 1,4 \%$ da dose injetada (após a excreção basal de $0,035 \mu\text{mol}$ ter sido subtraída, Fig. 6B). A figura correspondente após a injeção de 0,25 ml de calmangafodipir 50 mM contendo 2,52 μmol de Mn foi de $1,27 \pm 0,07 \mu\text{mol}$ de Mn (Fig. 6A), o que corresponde a $50,5 \pm 2,6 \%$ da dose injetada (Fig. 6B). A diferença entre o mangafodipir e o calmangafodipir foi altamente significativa ($p < 0,0001$). A diferença na excreção renal de Mn foi mais ou menos refletida na diferença da excreção renal de zinco (Zn); expressa como aumento de excreção de Zn, isto é, a excreção basal de 24 h ($0,068 \mu\text{mol}$) é subtraída (Fig. 6C).

Conclusão

[00112] Assim, em uma dose de Mn equivalente, excreção de Mn duplicada de calmangafodipir na urina em comparação com mangafodipir. A porcentagem de Mn excretado na urina durante 0 a 24 h após a injeção intravenosa de mangafodipir corresponde muito bem com as números anteriormente relatados em ratos (Hustvedt et al., 1997) e seres humanos (Toft et al., 1997). Os presentes resultados demonstram que o calmangafodipir libera muito menos Mn sob condições in vivo do que o mangafodipir. Isto fornece vantagens significativas pelo fato de a quantidade de Mn livre disponível para a absorção pelo cérebro e outros órgãos é reduzida e de que o índice terapêutico é significativamente aumentado quando mais de

mangafodipir terapêutico ou suas contrapartes desfosforiladas, MnDPMP e MnPLED, estão disponíveis in vivo. Assim, o calmangafodipir torna um tratamento terapêutico consideravelmente menos tóxico e muito mais eficaz do que aquele de mangafodipir.

Exemplo 5

[00113] Este exemplo compara o efeito citoprotetor do calmangafodipir com aquele do mangafodipir e MnPLED no que diz respeito aos efeitos mielossuppressores de oxaliplatina em camundongos balb/c.

Método

[00114] Em uma primeira série de experiências, 3 grupos cada um consistindo de 5 camundongos fêmea balb/c foram tratados uma vez por via intraperitoneal com oxaliplatina de 7,5, 10,0 e 12,5 mg/kg de oxaliplatina, respectivamente. Um dia antes (valor de referência) assim como 3 e 6 dias após o tratamento com oxaliplatina, 50 µl de amostras de sangue EDTA foram tomadas do plexo venoso orbital com um tubo capilar de vidro. As amostras de sangue foram analisadas utilizando o sistema automatizado CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics) com relação ao teor de glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYM), neutrófilos (NEU) e plaquetas (PLC). A partir dos resultados (Figuras 7A a 7D), concluiu-se que outras experiências que testam os efeitos mieloprotetores de calmangafodipir, mangafodipir e MnPLED devem ser executadas em 12,5 mg/kg de oxaliplatina e que as análises de amostra de células sanguíneas devem ser executadas no dia anterior e 6 dias após a administração de oxaliplatina em cada camundongo. Trinta minutos antes da administração de oxaliplatina (12,5 mg/kg) e 24 horas após, os camundongos receberam salina, calmangafodipir (5 mg/kg; lote # 11AK0105B), mangafodipir (1 e 10 mg/kg; lote # 02090106) ou MnPLED (1 mg/kg), por via intravenosa (5 camundongos em cada grupo). Uma dose de 5 mg/kg de calmangafodipir continha a mesma quantidade de manganês como aquela de 1 mg/kg de mangafodipir, isto é, 1,3 µmol; 1 mg/kg de MnPLED continha um pouco mais de manganês (aproximadamente 2 µmol). Um grupo de controle recebeu em lugar da oxaliplatina veículo (5 % de glicose) e soro fisiológico. Os resultados são apresentados nos

gráficos como mudanças relativas a partir do valor de referência para os vários tratamentos e células do sangue (\pm S.E.M.). As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, onde apropriado, foram testadas por um teste t de Student não pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Os resultados

[00115] Os resultados são apresentados nas Figuras 8A-8D. Em uma dose equivalente de manganês, isto é, 5 mg/kg de calmangafodipir foi significativamente de forma estatística mais eficaz do que 1 mg/kg de mangafodipir para proteger os camundongos da queda induzida por oxaliplatina no número total de glóbulos brancos (WBC) (Fig. 8A). Uma única dose de 12,5 mg/kg de oxaliplatina fez com que os WBC caíssem mais do que 80 %, enquanto que a queda em animais tratados com calmangafodipir foi apenas de cerca de 25 %. A queda correspondente em camundongos tratados com 1 ou 10 mg/kg de mangafodipir foi de cerca de 50 %. Estes resultados presumivelmente também sugerem que o MnDPDP deve ser desfosforilado no MnPLED antes que ele possa exercer os efeitos mieloprotetores; 1 mg/kg de MnPLED foi, como calmangafodipir, significativamente mais eficaz do que 1 e 10 mg/kg de mangafodipir que protege os WBC. Quedas semelhantes foram observadas nos linfócitos (LYM; Fig. 8B) e nos neutrófilos (NEU; Fig. 8C) após o tratamento de oxaliplatina. Resultados qualitativamente semelhantes também foram obtidos quando os neutrófilos (NEU) foram analisados (Fig. 8C). Quanto às plaquetas (PLC; Figs. 7D e 8D, em comparação com WBC, LYM e NEU) elas diferiam tanto na sensibilidade para a oxaliplatina quanto nos efeitos citoprotetores das substâncias de teste.

Conclusão

[00116] O calmangafodipir foi em uma dose de manganês equimolar significativamente mais potente do que o mangafodipir para proteger os camundongos balb/c contra os efeitos mielossupressores da oxaliplatina do medicamento anticancerígeno.

Exemplo 6

[00117] A atividade citotóxica nas células de câncer do cólon de murino de calmangafodipir foi comparada com aquela do mangafodipir, fodipir, MnPLED, ZnPLED, ZnDPDP, calfodipir (CaDPDP), PLED, e CaCl₂.

Método

[00118] A viabilidade das células foi medida utilizando o ensaio MTT. Resumidamente, 8000 células CT26 (carcinoma do cólon de camundongo) foram semeadas por reservatório em uma placa de 96 reservatórios e cultivadas durante a noite em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contendo 10 % de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C em ar úmido com 5 % de CO₂. As células foram então expostas durante 48 h em 1 a 1000 µM de calmangafodipir (lote # 11AK0105B), fodipir (DPDP; lote # RDL02090206), PLED (lote # KER-AO-122 (2)), calfodipir (CaDPDP), mangafodipir (lote # 02090106), MnPLED, ZnPLED, ZnDPMP e CaCl₂ a 37 °C. A viabilidade das células foi então avaliada através da adição de 5 mg/ml de metiltiazoltetrazólio (MTT) para uma concentração final de 0,5 mg/ml e incubação de células de por mais 4 horas a 37 °C. O azul de formazano que é formado por desidrogenases mitocondriais de células viáveis foi então dissolvido durante a noite a 37 °C mediante a adição de 10 % de SDS e 10 mM de HCl até uma concentração final de 5 % de SDS e 5 mM de HCl. Por fim, a absorvência da solução foi lida a 570 nm com uma referência a 670 nm em uma leitora de microplacas Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) conectada a um computador Apple Macintosh executando o programa Softmax Pro VI.2.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Resultados

[00119] A atividade citotóxica de fodipir, PLED, calfodipir ou calmangafodipir foi ao redor de 20 vezes mais elevada do que aquela do mangafodipir (Figs. 9A e 9B). O MnPLED foi quase 10 vezes mais potente do que o mangafodipir na sua capacidade para neutralizar as células cancerosas CT26 (Fig. 9A). Nem ZnDPDP, ZnPLED nem CaCl₂ apresentaram qualquer atividade citotóxica em todas as concentrações utilizadas (Fig. 9A e 9B).

Conclusão

[00120] Quando o calmangafodipir e o mangafodipir foram comparados, o calmangafodipir foi observado de ser cerca de 20 vezes mais potente do que o mangafodipir para neutralizar as células cancerosas CT26. A dissociação de manganês em certa medida do fodipir provavelmente explica a eficácia de neutralização de câncer do mangafodipir. O calmangafodipir como definido nos Exemplos 1 e 3, em concentrações equimolares de manganês, é por outro lado tão eficaz quanto o fodipir isoladamente, isto é, a eficácia de neutralização do calmangafodipir é muito mais elevada do que aquela do mangafodipir em concentrações equimolares de manganês. Esta descoberta sugere duas propriedades importantes. Em primeiro lugar, o PLED é desfosforilado provavelmente tão eficaz quanto a sua contraparte fosforilada fodipir no que diz respeito à sua capacidade de neutralizar as células do câncer, e em segundo lugar, a estabilidade mais baixa de MnPLED em comparação com aquela do mangafodipir (Rocklage et al., 1989) provavelmente explica a maior eficácia de MnPLED. A ausência de qualquer atividade citotóxica de ZnDPDP e ZnPLED é presumivelmente devido à estabilidade 1000 vezes mais elevada destes complexos em comparação com as suas contrapartes de manganês (Rocklage et al., 1989).

Exemplo 7

[00121] Este exemplo compara a atividade antitumoral da oxaliplatina em um modelo de camundongo que carrega câncer do cólon de murino (CT26) na presença e na ausência de calmangafodipir.

Método

[00122] As células CT26 foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contendo 10 % de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C em ar umidificado com 5 % de CO₂. Quando as células alcançaram ~50 % de confluência elas foram colhidas por tripsinização. Resumidamente, as células foram lavadas com salina baseada em fosfato (PBS) (pH 7,3) e expostas a 0,05 % de tripsina/EDTA 0,53 mM a 37 °C durante ~5 min. A tripsinização foi interrompida pela

adição de meio de cultura RPMI1640. As células foram contadas e centrifugadas a 200xg durante 5 min. Depois disso, elas foram lavadas em PBS, centrifugadas novamente e colocadas novamente em suspensão em PBS a uma concentração de $2 \times 10^6/350 \mu\text{l}$ para injeção em camundongos. Os camundongos fêmeas balb/c entre 6 e 8 semanas de idade foram utilizados, como descrito por Laurent et al., 2005. Resumidamente, cada camundongo foi injetado por via subcutânea na parte de trás do pescoço com 2×10^6 de células CT26 no dia 0. Após 7 dias (dia 7), quando os tumores foram detectáveis, o tamanho do tumor foi determinado com um compasso de calibre e os camundongos foram agrupados (5 em cada grupo) de modo que os tamanhos dos tumores não fossem estatisticamente diferentes por grupo. Oxaliplatina + calmagafodipir (lote # 11AK0105B) foi injetado e um grupo de camundongos recebeu tratamento com veículo (0,9 % de salina + 5 % de glicose) isoladamente. Em uma primeira série de experiências, os camundongos foram injetados i.v. com salina ou 50 mg/kg de calmagafodipir 30 minutos antes da administração de i.p. de 20 mg/kg de oxaliplatina (diluída em glicose a 5 %) ou 5 % de glicose. Estes camundongos receberam, além disso, salina ou 50 mg/kg de calmagafodipir 24 horas mais tarde (dia 8). Em outra série de experiências, os camundongos foram injetados i.v. com salina ou 5 mg/kg de calmagafodipir 30 minutos, 10 mg/kg de oxaliplatina (diluída em glicose a 5 %) ou 5 % de glicose, e salina ou 5 mg/kg de calmagafodipir 24 horas mais tarde (dia 8). Os camundongos foram sacrificados no dia 10 e os tumores foram extirpados e os pesos úmidos foram determinados. As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, onde apropriado, foram testadas por um teste t de Student não pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

[00123] Os resultados são apresentados nas Figs. 10A e 10B. Na primeira série de experiência os camundongos receberam 20 mg/kg de oxaliplatina, que é próxima à dose máxima tolerada. Tratamento isolado com oxaliplatina resultou em uma redução estatisticamente significativa e mais do que 50 % no peso do tumor. O tratamento com calmagafodipir (50 mg/kg) não teve qualquer influência negativa

sobre o efeito antitumoral da oxaliplatina em uma dose elevada (Fig. 10A). No entanto, em uma segunda série de experiências em que 10 mg/kg de oxaliplatina foram utilizados, o tratamento com uma dose relativamente baixa de calmangafodipir (5 mg/kg) resultou em um melhor efeito antitumoral estatisticamente significativo (Fig. 10B); o efeito combinado de 10 mg/kg de oxaliplatina acrescida de 5 mg/kg de calmangafodipir foi quase tão eficaz quanto 20 mg/kg de oxaliplatina isoladamente.

Conclusão

[00124] O calmangafodipir não interfere negativamente com a atividade antitumoral de oxaliplatina, e, ao contrário, em uma dose relativamente baixa de oxaliplatina (10 mg/kg), o calmangafodipir realmente aumentou a eficácia antitumoral.

Exemplo 8

[00125] Este exemplo compara os níveis de manganês após injeções intravenosas repetidas de calmangafodipir e mangafodipir (39 vezes durante 33 semanas) no cérebro, pâncreas e fígado de camundongos.

Método

[00126] Ratos Wistar machos e fêmeas foram injetados por via intravenosa com NaCl 0,9 %, 72,0 $\mu\text{mol/kg}$ de mangafodipir (lote # 02090106; que corresponde a 72 $\mu\text{mol/kg}$ de manganês) ou 374,4 $\mu\text{mol/kg}$ de calmangafodipir (lote # 11AK0105B; que corresponde a 72 $\mu\text{mol/kg}$ de manganês) 3 vezes por semana durante 13 semanas (cada grupo de tratamento consistia de 9 machos + 9 fêmeas). Cada dose de calmangafodipir correspondeu a cerca de 36 vezes a dose clínica assumida (ACD). Após o período de administração de 13 semanas, os ratos foram sacrificados e os cérebros e pâncreas foram dissecados e aproximadamente 0,5 g das amostras foram armazenadas congeladas até a análise de Mn. O teor de Mn de cada amostra foi analisado por ICP-MS. Os resultados são expressos como $\mu\text{g/g}$ de peso úmido + S.E.M. A diferença estatística entre o grupo de mangafodipir e o grupo de calmangafodipir, com respeito ao teor de Mn, foi testada por um teste t de Student pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

[00127] Os resultados são apresentados nas Figs. 11 A-C. O teor de Mn no cérebro em ratos de controle tratados com NaCl, ratos tratados com mangafodipir, e ratos tratados com calmangafodipir foi de $0,38 \pm 0,01$, $0,99 \pm 0,02$ e $0,74 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ p.p, respectivamente. O teor de Mn correspondente no pâncreas foi de $1,66 \pm 0,06$, $5,54 \pm 0,45$ e $3,35 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente. Embora, o teor de Mn do fígado foi significativamente elevado de forma estatística no grupo de mangafodipir (Fig. 11C), a elevação relativa foi muito menor do que aquela observada no cérebro e pâncreas.

Conclusão

[00128] A administração de uma dose acumulada elevada de calmangafodipir em ratos resulta significativamente em menos retenção de manganês no cérebro e do pâncreas em comparação com mangafodipir (a dose total em ambos os casos correspondeu a cerca de 2800 $\mu\text{mol/kg}$ de manganês). Estes resultados demonstram o perfil toxicológico melhorado do calmangafodipir em comparação com aquele do mangafodipir.

Exemplo 9

[00129] Este exemplo mostra o efeito citoprotetor do calmangafodipir no que diz respeito aos efeitos mielossupressores de carboplatina em camundongos balb/c.

Método

[00130] Em uma primeira série de experiências, 3 grupos, cada um consistindo de cinco camundongos fêmeas balb/c, foram tratados uma vez por via intraperitoneal com a carboplatina em 75, 100 e 125 mg/kg de carboplatina, respectivamente. Um dia antes (valor de referência), assim como 3 e 6 dias após o tratamento com carboplatina, 50 μl de amostras de sangue EDTA foram tomadas a partir do plexo venoso orbital com um tubo capilar de vidro. As amostras de sangue foram analisadas utilizando o sistema automatizado CELL-DYN® Emerald (Abbott Diagnostics) com relação ao conteúdo de glóbulos brancos (WBC), linfócitos (LYM), neutrófilos (NEU) e plaquetas (PLC). A partir dos resultados (Figuras 12A-12D), concluiu-se que outras experiências para testar o efeito mieloprotetor do

calmangafodipir devem ser executadas em 125 mg/kg de carboplatina e que, no caso de WBC, NEU e LYM, as análises de amostra de células do sangue devem ser executadas no dia anterior e três dias após a administração de carboplatina, e, no caso de PLC, a análise da amostra de células do sangue deve ser executada um dia antes e 6 dias após a administração de carboplatina. Trinta minutos antes da administração de carboplatina (125 mg/kg) e 24 horas após, os camundongos receberam salina ou calmangafodipir (1, 3, 10 ou 30 mg/kg; lote # 11AK0105B). Um grupo de controle recebeu veículo (salina) e soro fisiológico em lugar de carboplatina. Os resultados são apresentados nos gráficos como mudanças relativas a partir do valor de referência para os diversos tratamentos (média \pm S.E.M.). As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, onde apropriado, foram testadas por um teste t de Student não pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

[00131] Os resultados são apresentados nas Figs. 13A-13D. A carboplatina (125 mg/kg) causou uma diminuição de aproximadamente 50 % no WBC, assim como em NEU e LYM. O tratamento com calmangafodipir em uma dose de 3 mg/kg aboliu essas reduções. A dose-resposta de calmangafodipir apresentou uma aparência em forma de campânula em cada caso, de um modo semelhante como anteriormente descrito para o mangafodipir em relação ao seu efeito cardioprotetor contra doxorubicina em camundongos CD (Kurz et al., *Transl Oncol* 2012; 5:252-259).

[00132] Quanto às plaquetas (PLC, Figs. 12D e 13D), em comparação com WBC, LYM e NEU, elas diferem na sensibilidade para com respeito a carboplatina.

Conclusão

[00133] O calmangafodipir profundamente protege os camundongos balb/c contra os efeitos mielossupressores da carboplatina do medicamento anticâncer.

Exemplo 10

[00134] Este exemplo compara a atividade antitumoral da oxaliplatina nos camundongos balb/c imune competentes que transportam o câncer do cólon (CT26) e camundongos balb/c nus imune deficientes (nu/nu) na presença e ausência de

calmangafodipir.

Método

[00135] As células CT26 foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C em ar umidificado com 5 % de CO₂. Quando as células alcançaram ~50 % de confluência elas foram colhidas por tripsinização. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS (pH 7,3) e expostas a 0,05 % de tripsina/EDTA 0,53 mM a 37 °C durante ~5 min. A tripsinização foi interrompida pela adição de meio de cultura RPMI1640. As células foram contadas e centrifugadas a 200xg durante 5 min. Depois disso, elas foram lavadas em PBS, centrifugadas novamente e colocadas novamente em suspensão em PBS a uma concentração de $2 \times 10^6/350 \mu\text{l}$ para injeção em camundongos. Os camundongos fêmeas balb/c imune competentes e camundongos balb/c fêmeas nus imune incompetentes entre 6 e 8 semanas de idade foram utilizados, como descrito por Laurent et al., 2005. Resumidamente, cada camundongo foi injetado por via subcutânea na parte de trás do pescoço com 2×10^6 de células CT26 no dia 0. Após 7 dias (dia 7), quando os tumores foram detectáveis, o tamanho do tumor foi determinado com um compasso de calibre e os camundongos foram agrupados (5 em cada grupo) de modo que os tamanhos dos tumores não fossem estatisticamente diferentes por grupo. Grupos de camundongos (5 em cada grupo, como ilustrado na Fig. 14) foram injetados i.v. com salina ou 5 mg/kg de calmangafodipir (lote # 11AK0105B) 30 minutos antes da administração i.p. de 10 mg/kg de oxaliplatina (diluída com glicose 5 %). Os camundongos receberam, além disso, salina ou 50 mg/kg de calmangafodipir 24 horas mais tarde (dia 8). Os camundongos foram sacrificados no dia 10 e os tumores foram extirpados e os pesos úmidos foram determinados. Os resultados são apresentados em um gráfico com relação aos vários tratamentos (média ± S.E.M.) As diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento, onde apropriado, foram testadas por um teste t de Student não pareado. Um valor p mais baixo do que 0,05 foi considerado como uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

[00136] Os resultados são apresentados na Fig. 14. Houve clara tendência de que os tumores cresceram mais nos camundongos balb/c imune deficientes do que nos camundongos imune competentes balb/c nu/nu, mas esta diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,0870$). Um único tratamento com 10 mg/kg de oxaliplatina resultou em redução estatisticamente insignificante de 20 a 30 % nos pesos do tumor em camundongos balb/c imune competentes e imune deficientes. O tratamento com 5 mg/kg de calmangafodipir não teve qualquer influência negativa sobre o efeito antitumoral de oxaliplatina nos camundongos imune competentes ou imune incompetentes. O peso médio do tumor foi de fato significativamente reduzido de forma estatística nos camundongos imune competentes tratados com 5 mg/kg de calmangafodipir em comparação com os controles. No entanto, nenhuma tal redução foi observada nos camundongos imunodeficientes.

Conclusão

[00137] O calmangafodipir não interferiu negativamente com a atividade antitumoral de oxaliplatina em camundongos imune competentes ou imune deficientes, mas foi apenas nos camundongos imune competentes que o calmangafodipir realmente aumentou a eficácia antitumoral.

Exemplo 11

[00138] A atividade citotóxica de calmangafodipir para células U1810 de câncer de pulmão de células não pequenas humano (NSCLC) e câncer de pulmão células não pequenas de murino (LLCI) foi comparada com aquela do mangafodipir.

Métodos

[00139] A viabilidade das células foi medida utilizando o ensaio MTT. Resumidamente, 8.000 células U1810 NSCLC ou LLCI NSCLC humanas foram semeadas por reservatório em uma placa de 96 reservatórios e cultivadas durante a noite em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contendo 10 % de soro fetal bovino, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C em ar umidificado com 5 % de CO₂. As células foram então expostas durante 48 h em 1 a 1000 µM de calmangafodipir (lote #11AK0105B) ou

mangafodipir (lote #02090106). A viabilidade das células foi então avaliada através da adição de 5 mg/ml de metiltiazoltetrazólio (MTT) para uma concentração final de 0,5 mg/ml e incubação de células durante mais 4 horas a 37 °C. O azul de formazano que é formado por desidrogenases mitocondriais de células viáveis foi dissolvido em seguida durante a noite a 37 °C mediante a adição de 10 % SDS e 10 mM HCl até uma concentração final de 5 % SDS e 5 mM HCl. Por fim, a absorvência da solução foi lida a 570 nm com uma referência a 670 nm em um leitora de microplacas Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ligada a um computador Apple Macintosh executando o programa Softmax Pro VI.2.0 (Molecular dispositivos, Sunnyvale, CA, USA). A viabilidade das células U1810 ou LLC1 na presença de concentrações crescentes de calmangafodipir ou mangafodipir é apresentada como curvas de resposta da concentração (média \pm S.D.). As curvas individuais foram ajustadas para a equação logística de resposta de inclinação variável sigmoideal (Graphpad Prism, version 5.02). A partir desta análise as concentrações que provocam 50 % de inibição (IC₅₀) das substâncias de teste foram calculadas.

Resultados

[00140] A atividade citotóxica de calmangafodipir e mangafodipir com respeito às células NSCLC U1810 e LLC1 é mostrada nas Figs. 15A e 15B. A relação de IC₅₀ calculada entre mangafodipir e calmangafodipir (0,0006329/0,00002274) mostrou que o calmangafodipir foi de cerca de 28 vezes mais potente do que o mangafodipir para neutralizar as células U1810 (Fig. 15A). Embora o calmangafodipir fosse significativamente mais potente do que o mangafodipir para neutralizar as células LLC1, por causa da aparência ambígua da curva de mangafodipir (Fig. 15B), ele não foi significativo para calcular uma relação de IC₅₀ entre o mangafodipir e o calmangafodipir.

Conclusões

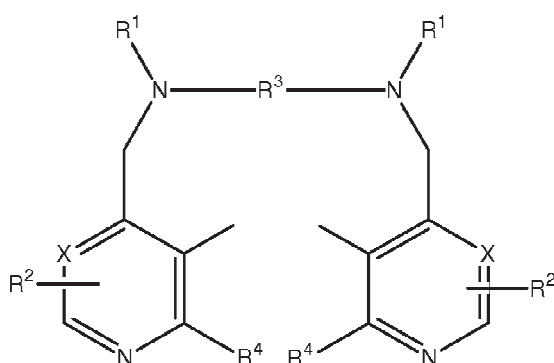
[00141] Os resultados demonstram a eficácia superior de calmangafodipir em comparação com o mangafodipir para neutralizar as células de câncer do pulmão de células não pequenas, U1810 e LLC1.

[00142] Os exemplos e as formas de realização específicas aqui apresentadas são ilustrativos apenas por natureza e não devem ser tomados como limitativas do escopo da invenção definida pelas seguintes reivindicações. As formas de realização específicas e vantagens adicionais da presente invenção serão evidentes a partir da presente divulgação e estão dentro do escopo da invenção reivindicada.

REIVINDICAÇÕES

1. Complexo de metal misturado, caracterizado pelo fato de ser de um composto de Fórmula I, ou um sal deste, em que os metais misturados compreendem cálcio e manganês, em que a relação molar de cálcio para manganês é 1-10:

Fórmula I



em que

X representa CH ou N,

cada R¹ independentemente representa hidrogênio ou -CH₂COR⁵;

R⁵ representa hidróxi;

cada R² independentemente representa ZYR⁶ em que Z representa uma ligação ou um grupo selecionado de CH₂, (CH₂)₂, CO, CH₂CO, CH₂CH₂CO e CH₂COCH₂;

Y representa uma ligação;

R⁶ é um grupo de alquila mono- ou poli(hidróxi ou alcoilado) ou da fórmula OP(O) (OR⁸)R⁷;

R⁷ é hidróxi ou um grupo de alquila ou aminoalquila não substituído;

R⁸ é um átomo de hidrogênio ou um grupo de alquila, opcionalmente submetido a hidróxi, opcionalmente alcoilado;

R³ é etileno; e

cada R⁴ independentemente representa hidrogênio ou alquila C₁₋₃.

2. Complexo de metal misturado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R⁶ é da fórmula OP(O) (OR⁸)R⁷; e R⁷ é hidróxi.

3. Complexo de manganês metálico misturado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R⁴ é metil.

4. Complexo de metal misturado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto de Fórmula I é o ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP) ou o ácido N,N'-dipiridoxil etilenodiamina-N,N'-diacético (PLED), ou um sal farmacêuticamente aceitável destes.

5. Complexo de metal misturado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo de metal misturado é um complexo de metal misturado de um sal de sódio de ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)-etilenodiamina-N,N'-diacético (DPDP ou fodipir) e em que a relação molar de cálcio para manganês é 4:1.

6. Complexo de metal misturado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a relação molar de Ca²⁺/Mn²⁺ está ao redor de 4.

7. Complexo de metal misturado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o complexo é liofilizado.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e um ou mais portadores e/ou excipientes fisiologicamente aceitáveis.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende um complexo de metal misturado, definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 suspenso ou dissolvido, em um meio líquido, e opcionalmente compreendendo um ou mais excipientes fisiologicamente aceitáveis.

10. Método de produção de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma cristalização de uma só etapa de uma solução de cálcio, manganês e de um composto de Fórmula I, ou um sal deste.

11. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das

reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar uma lesão por medicamento citotóxica ou citostática.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o medicamento citotóxico ou citostático é um medicamento de tratamento do câncer.

13. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o medicamento citotóxico ou citostático compreende pelo menos um de doxorubicina, epirrubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, 5-fluorouracila, docetaxel ou paclitaxel.

14. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar mielossupressão ou neurotoxicidade ou ambas.

15. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar uma lesão induzida por isquemia-reperfusão.

16. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar aterosclerose e/ou diabetes.

17. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratamento trombolítico, um desvio cardiopulmonar, angioplastia transluminal percutânea, cirurgia cardíaca ou de transplante de órgãos, ou acidente vascular cerebral.

18. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofeno.

19. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar sobrecarga de ferro ou sobrecarga de cobre.

20. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar talassemia, anemia falciforme, hemossiderose transfusional ou doença de Wilson.

21. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar cirrose do fígado induzida por hepatite, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), ou hepatite crônica induzida por vírus.

22. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar uma lesão induzida por radiação.

23. Uso de um complexo de metal misturado definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica definida na reivindicação 8 ou 9 para tratar câncer do pulmão de células não pequenas, câncer colorretal, câncer da próstata, câncer da mama, câncer do pâncreas ou melanoma maligno.

24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 23, caracterizado pelo fato de que compreende uma dosagem de cerca de 0,01 a 50 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal do complexo de metal misturado.

Fig. 1

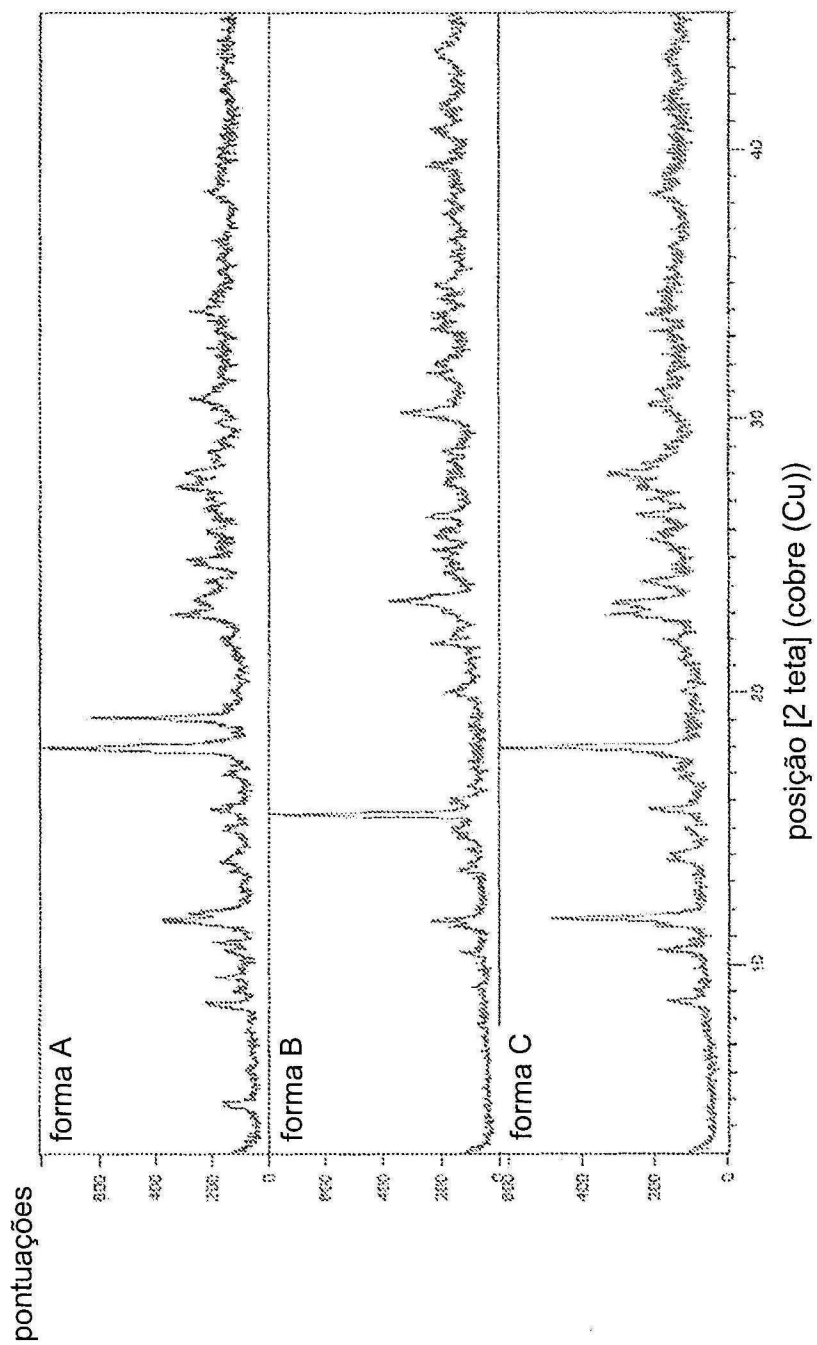


Fig. 2

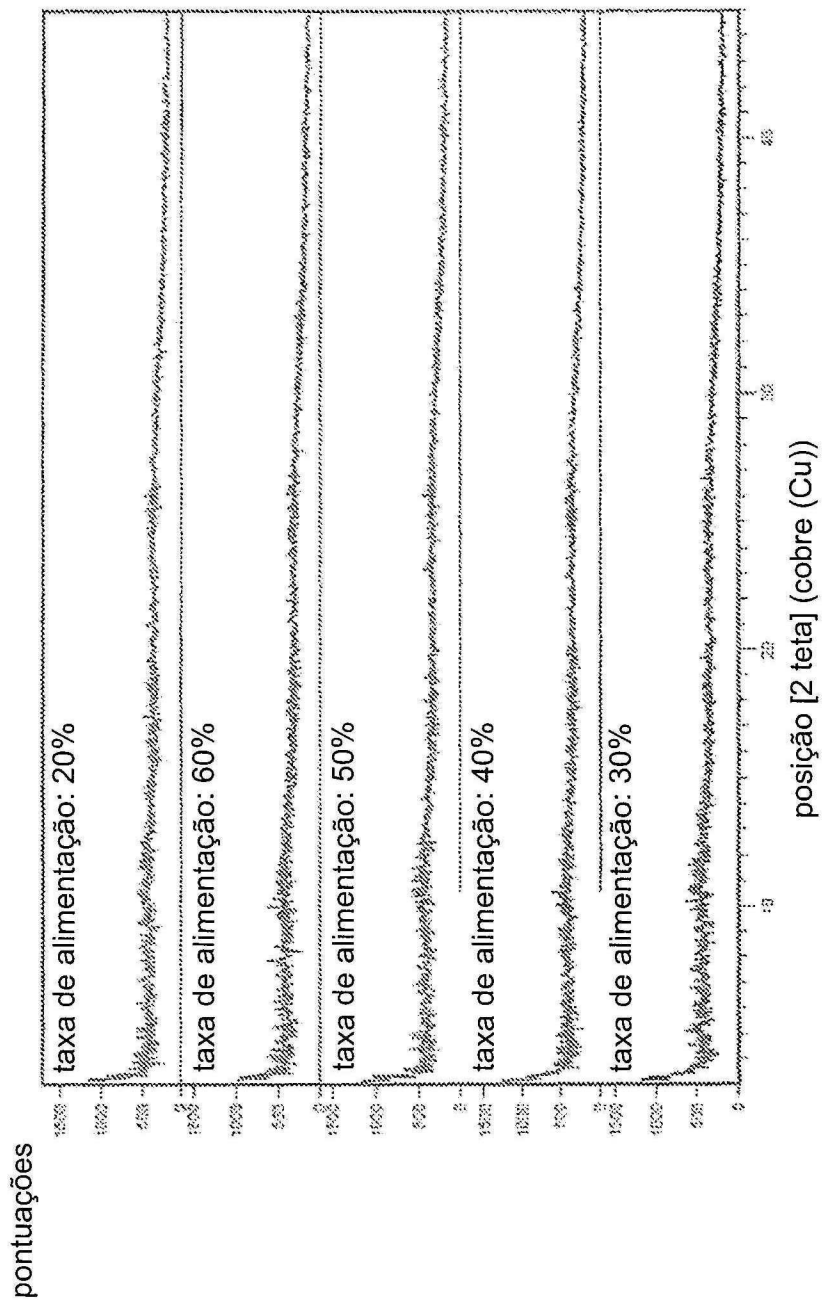


FIG. 3

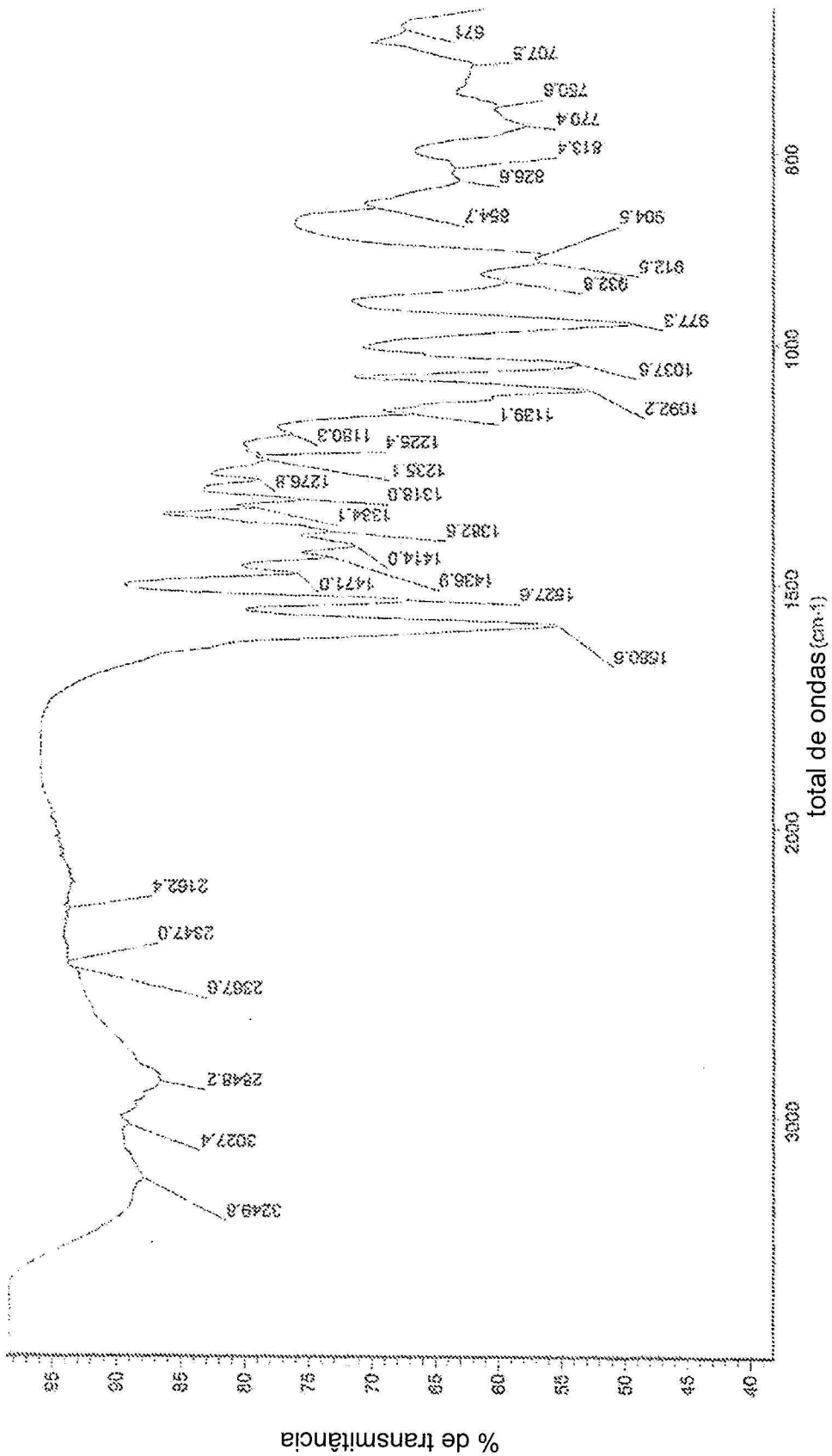


FIG. 4A



FIG. 4B

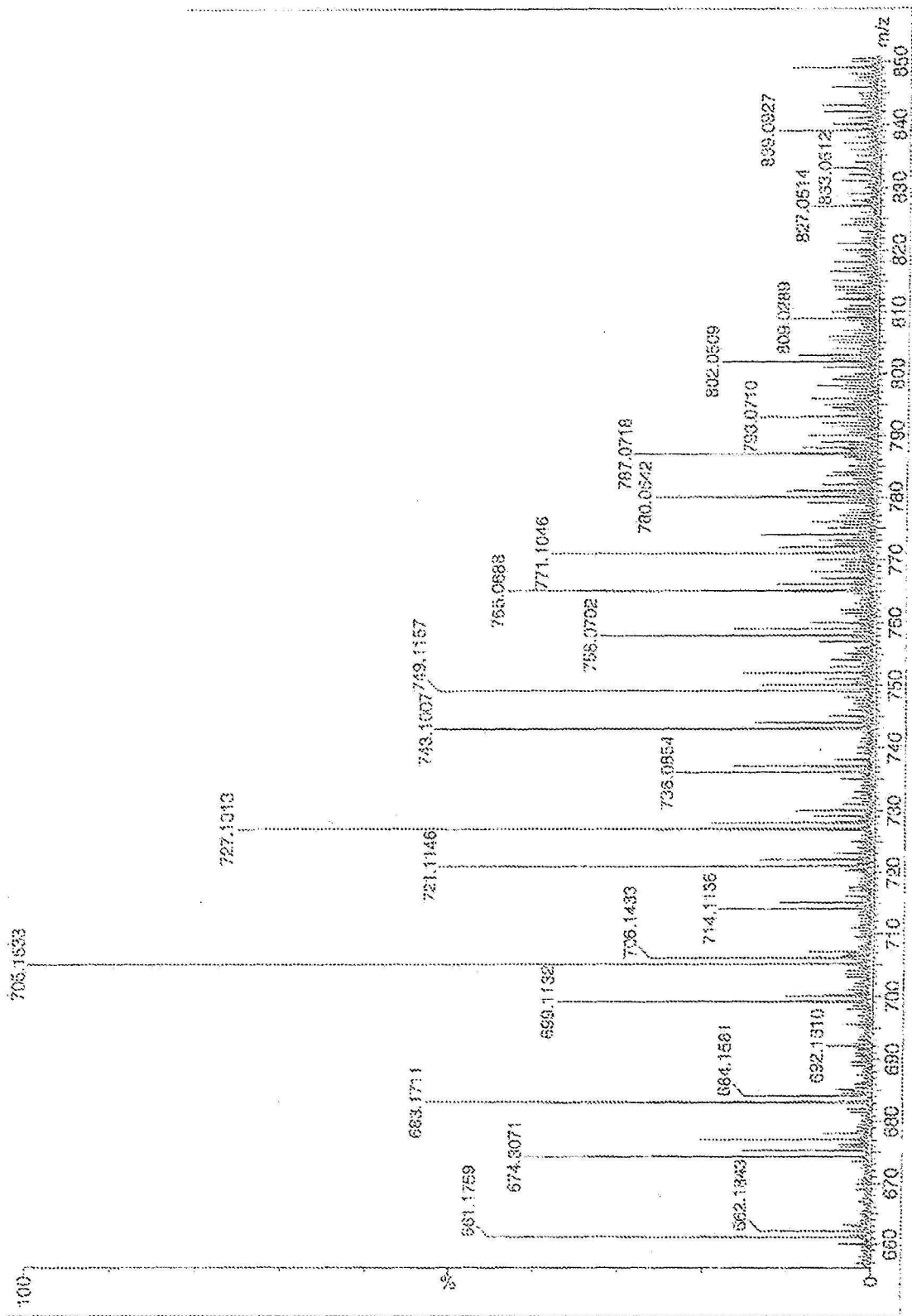
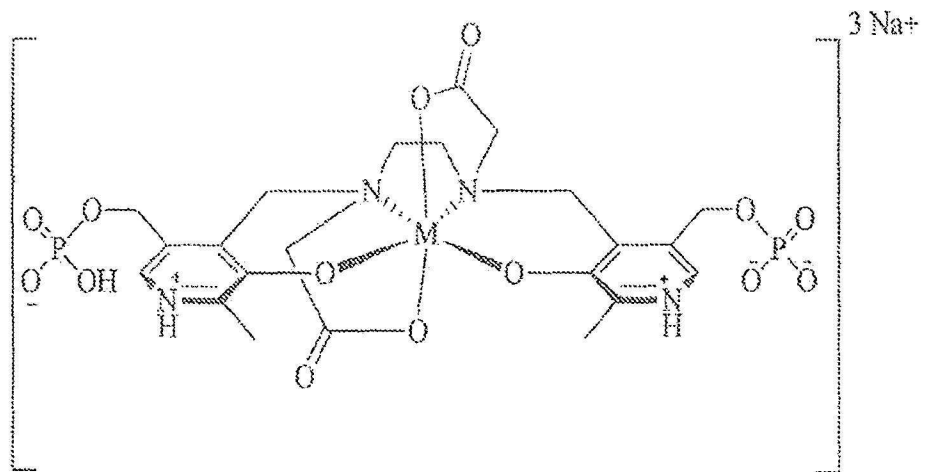


FIG. 5

 $M = 0.8 \text{ Ca} : 0.2 \text{ Mn}$ $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{MN}_4\text{Na}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

fw: 745.43

Fig. 6A excreção renal em 24 h

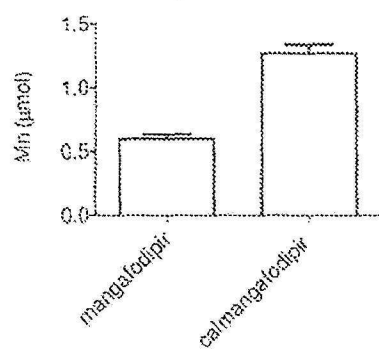


Fig. 6B excreção renal em 24 h

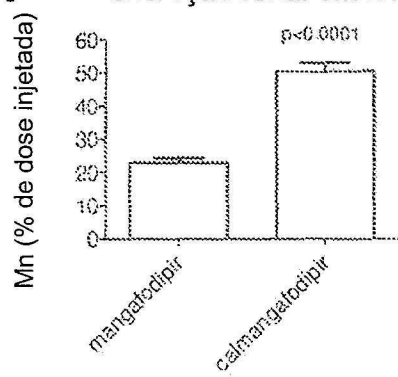


Fig. 6C excreção renal em 24 h

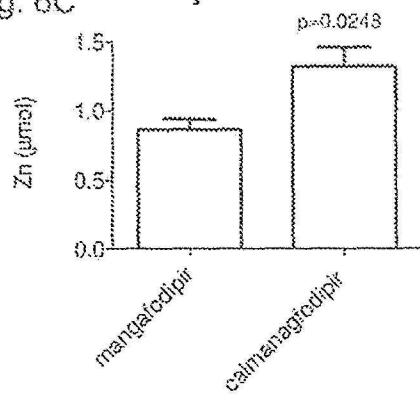


Fig. 7A

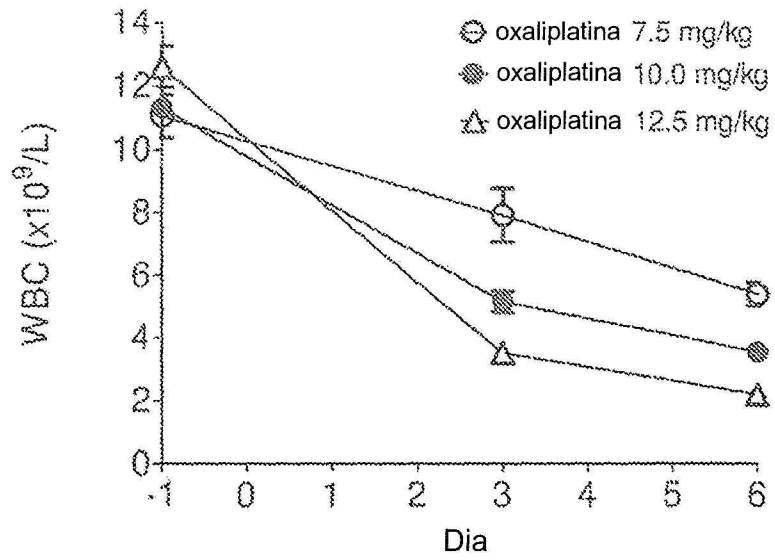


Fig. 7B

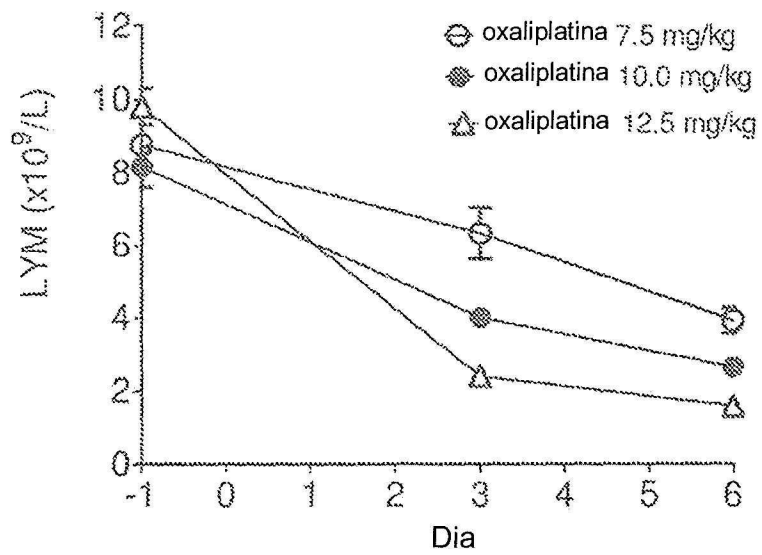


Fig. 7C

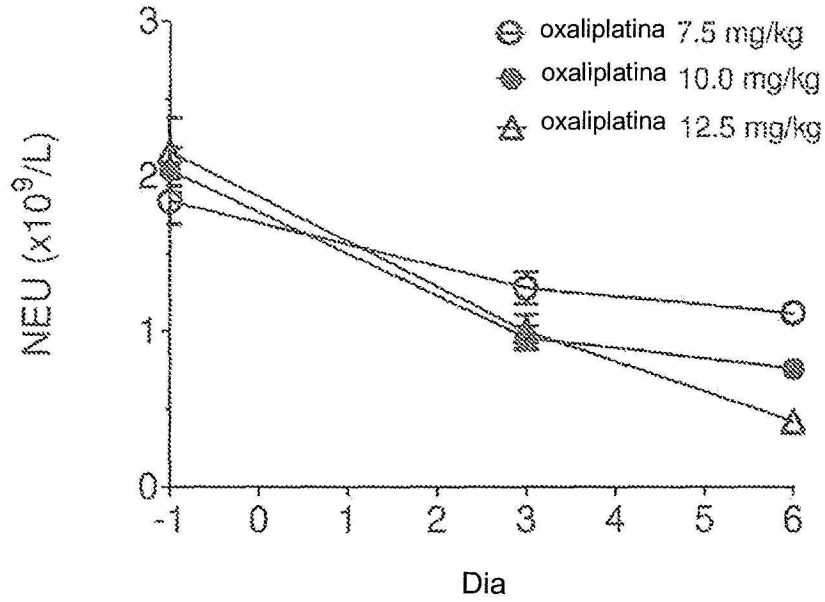


Fig. 7D

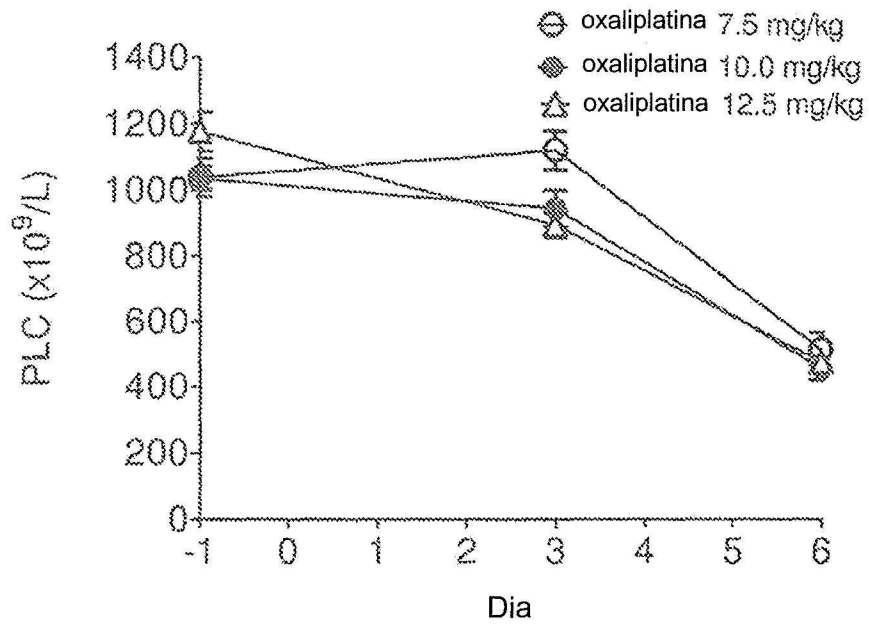


Fig. 8A

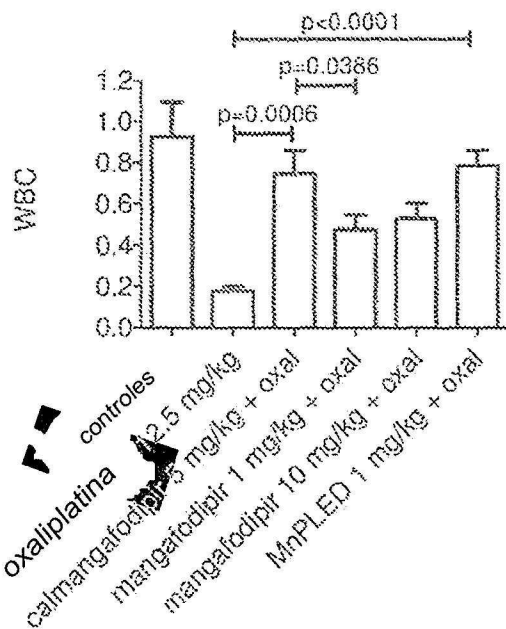


Fig. 8B

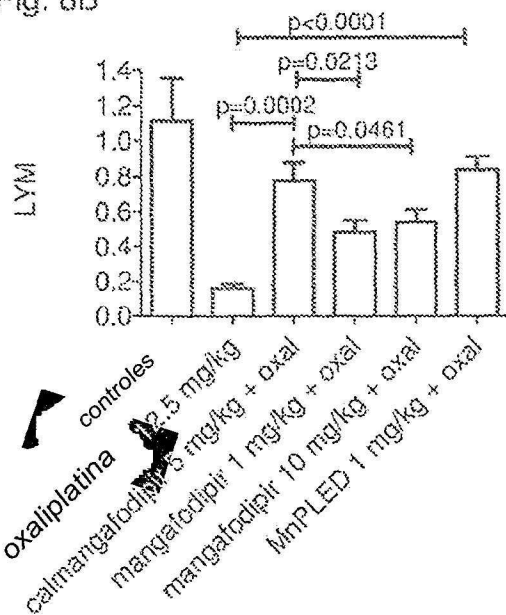


Fig. 8C

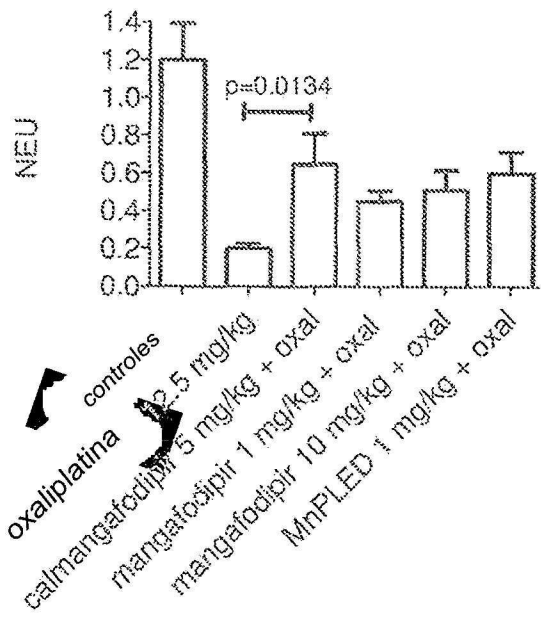


Fig. 8D

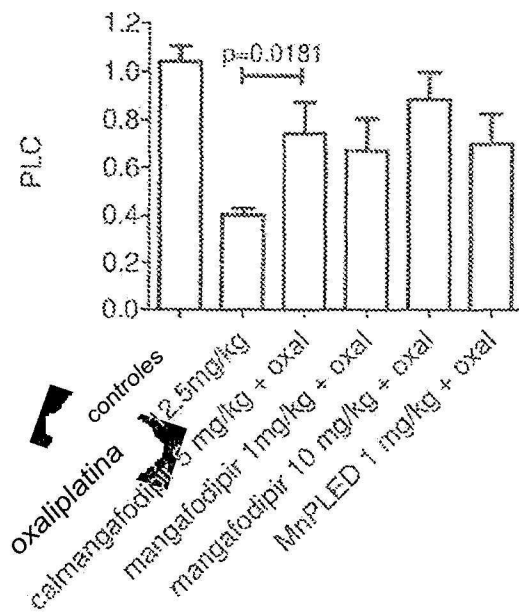


Fig. 9A

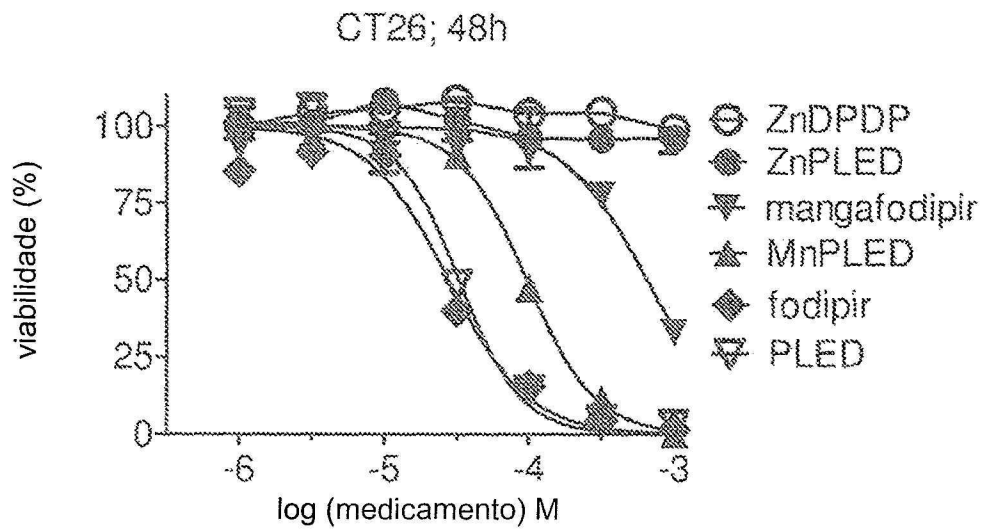


Fig. 9B

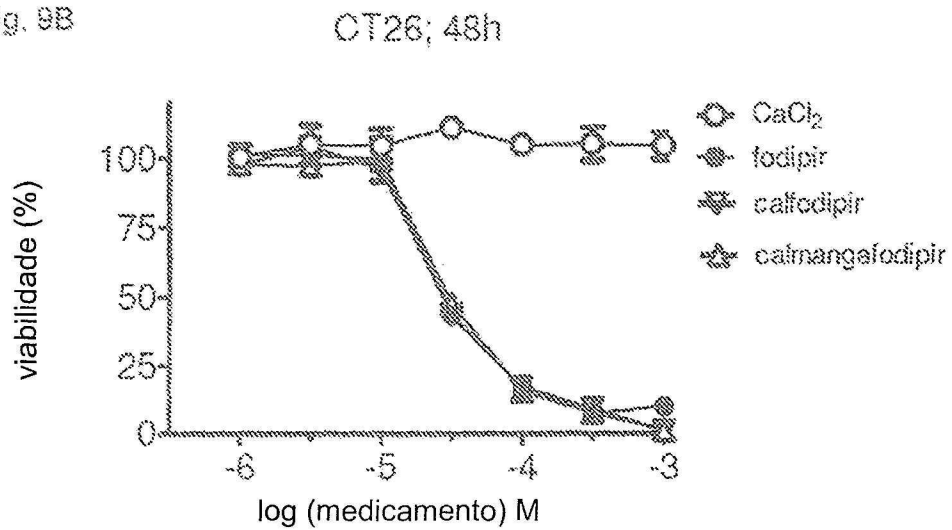


Fig. 10A

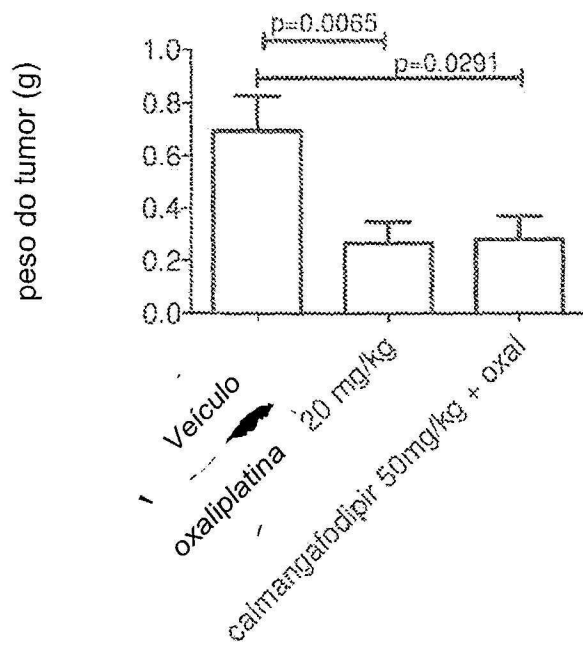


Fig. 10B

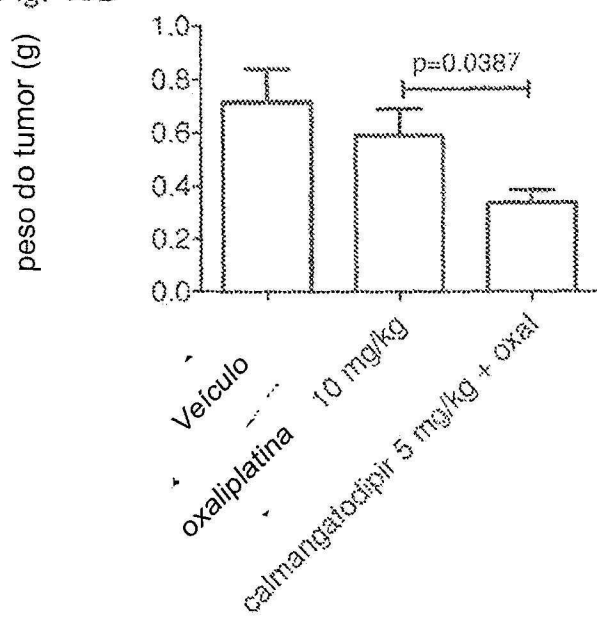


Fig. 11A

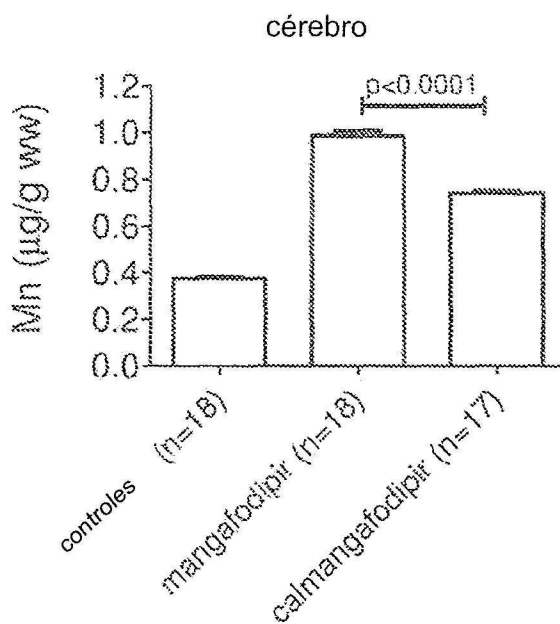


Fig. 11B

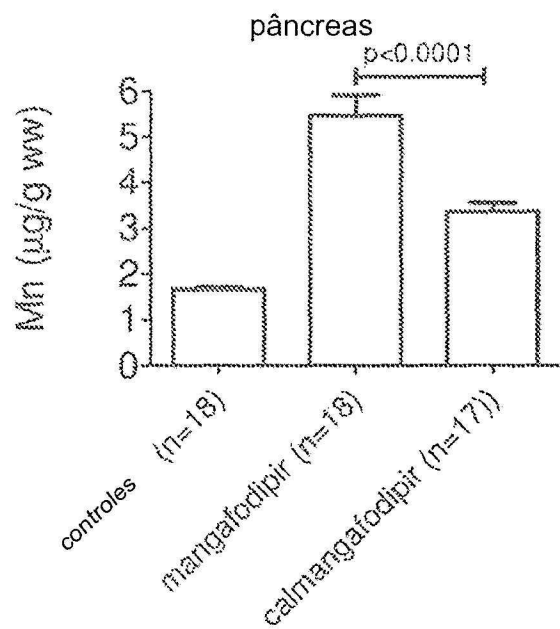


Fig. 11C

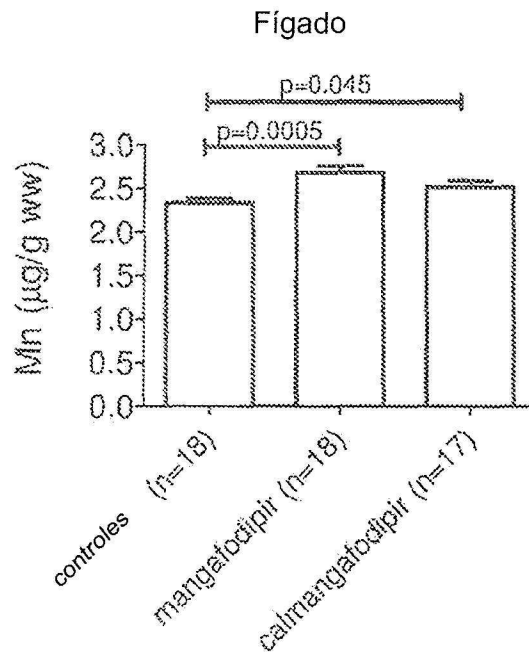


Fig. 12A

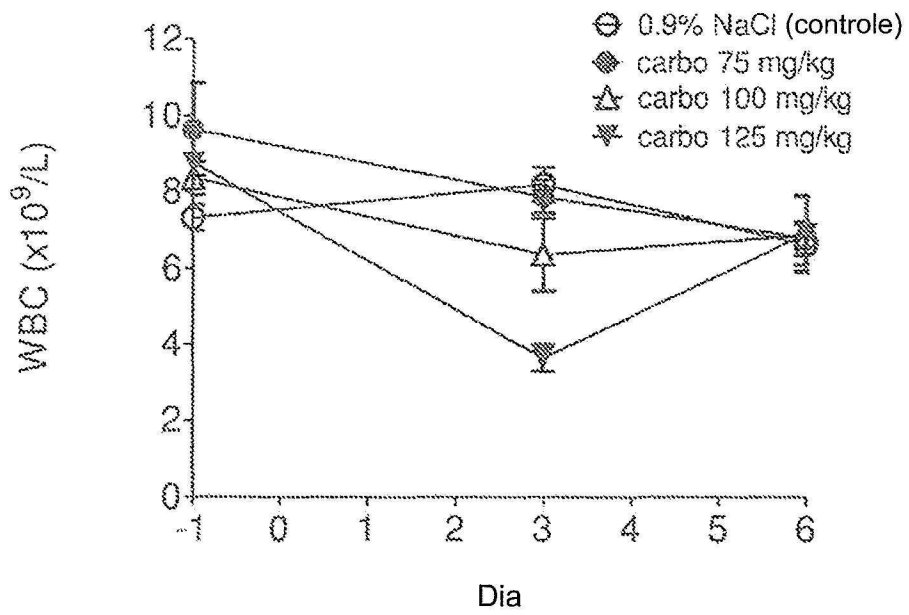


Fig. 12B

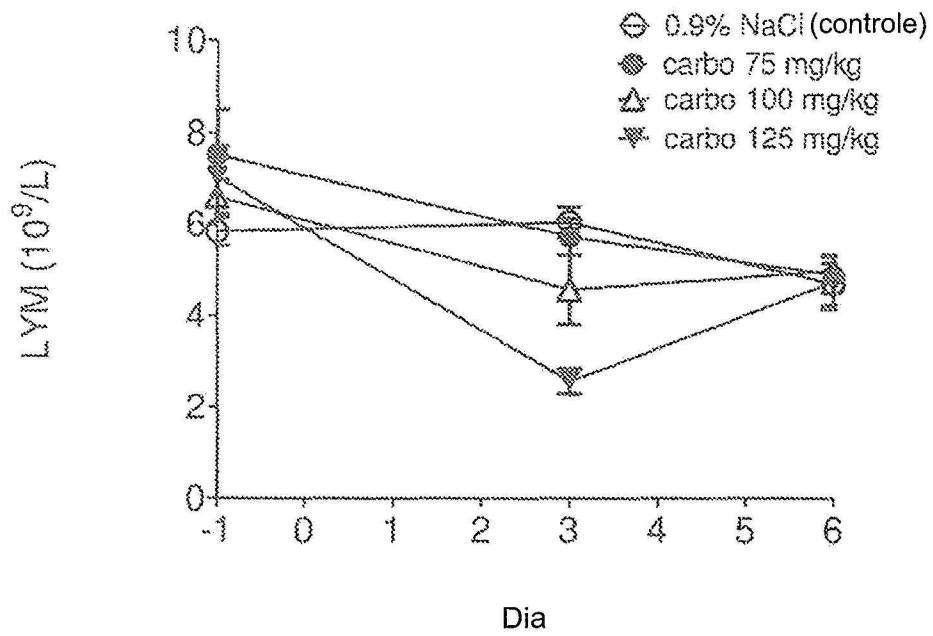


Fig. 12 C

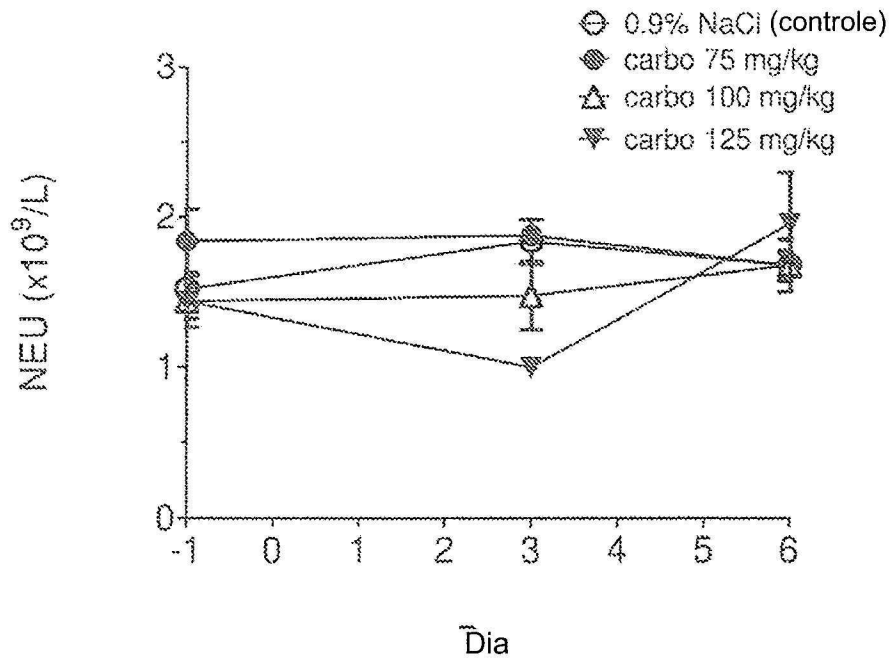


Fig. 12D

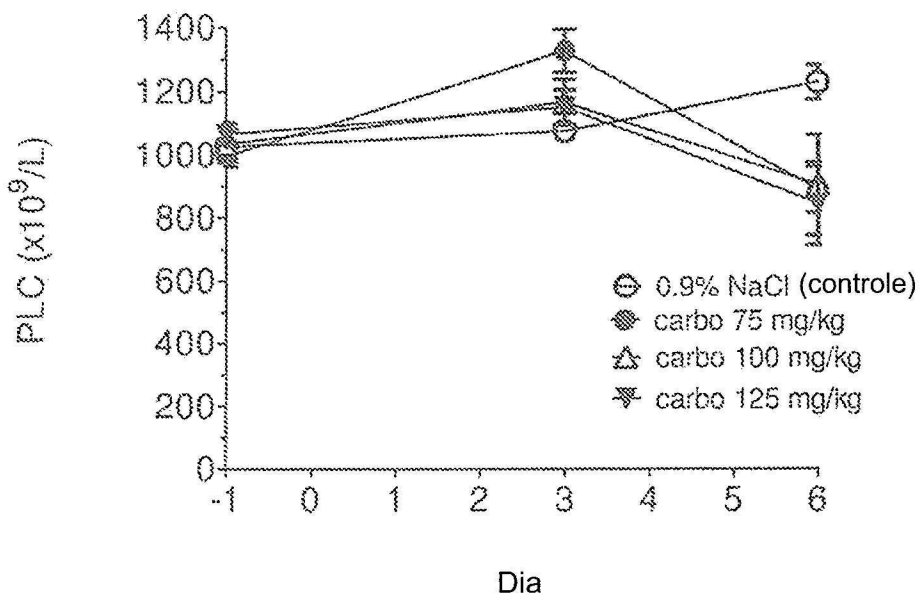


Fig. 13 A

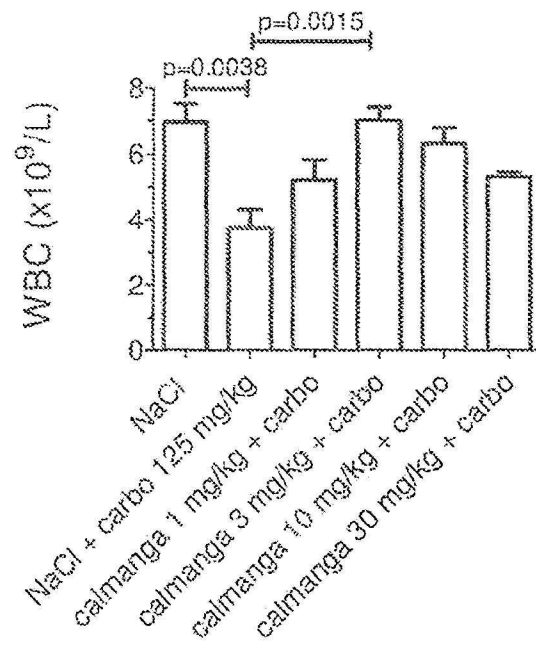


Fig. 13B

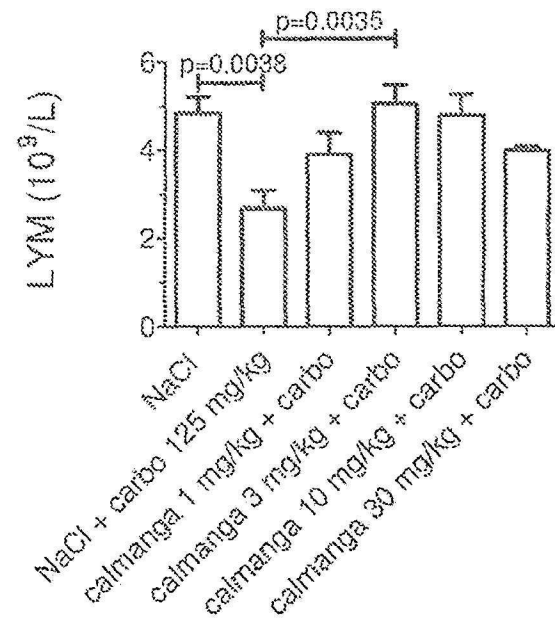


Fig. 13C

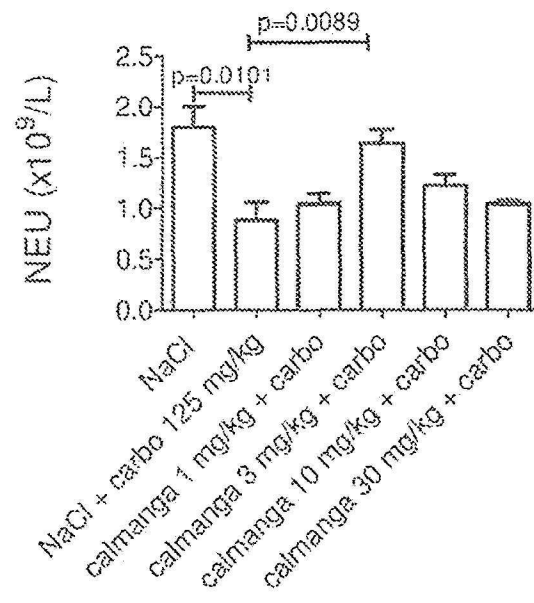


Fig. 13D

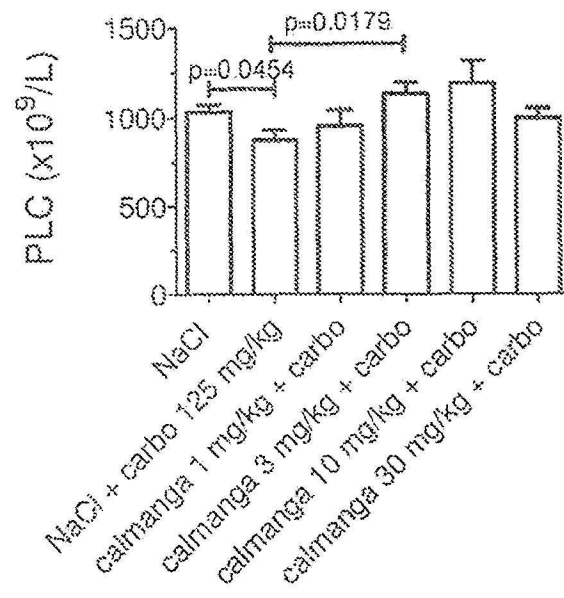


Fig. 14

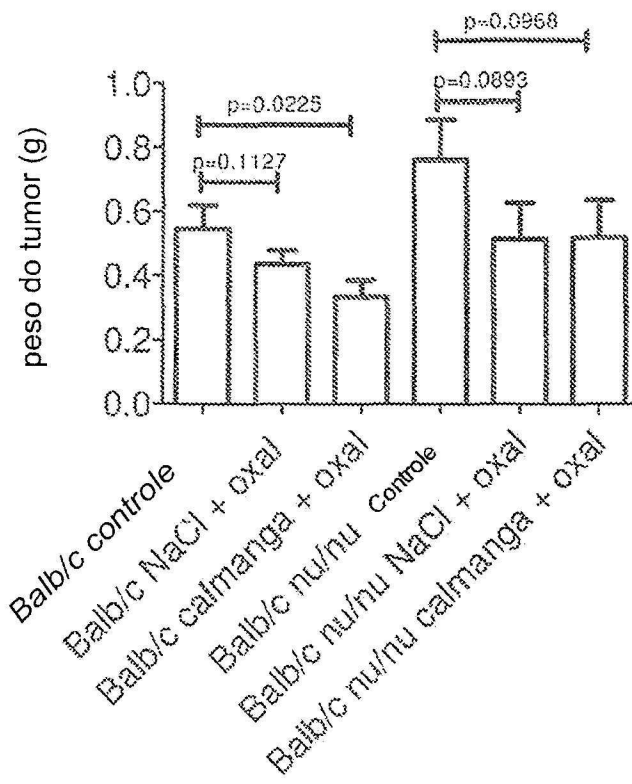


Fig. 15A

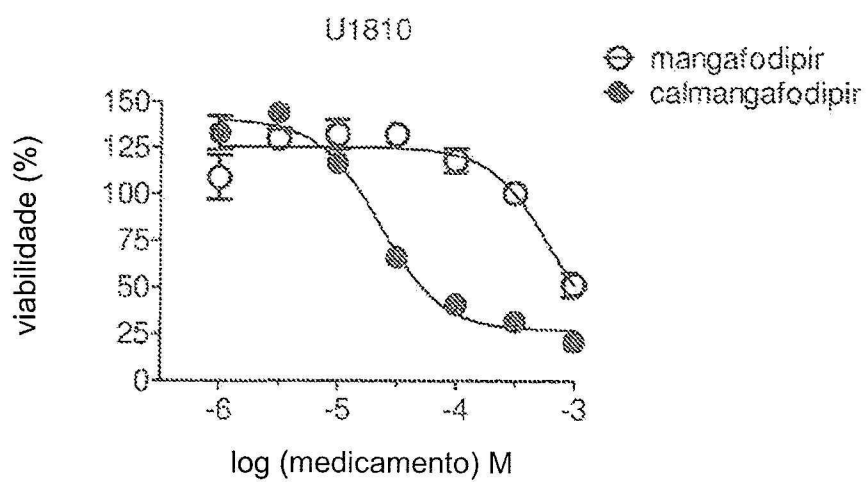


Fig. 15B

