

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2008.08.06</b>	(73) Titular(es): <b>OHIO UNIVERSITY TECHNOLOGY TRANSFER OFFICE UNIT 14 340 WEST STATE STREET ATHENS, OHIO 45701 US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2007.08.06 US 954126 P 2007.09.20 US 973926 P</b>	(72) Inventor(es): <b>RATHINDRA N. BOSE</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2010.04.14</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.07.30 168/2014</b>	

(54) Epígrafe: **FOSFOPLATINAS E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCROS RESISTENTES À CISPLANTINA E CARBOPLATINA**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA, FOSFOPLATINAS COMPLEXOS DE FOSFATO MONOMÉRICOS IOLADOS DE PLATINA (II) E (IV) ISOLADOS E OS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS PARA O TRATAMENTO DE CANCROS, INCLUINDO CISPLATINA - E CANCROS RESISTENTES À CARBOPLATINA. AO CONTRÁRIO DA CISPLATINA, ESTES COMPLEXOS NÃO SÃO FACILMENTE SUJEITOS A HIDRÓLISE E SÃO BASTANTE SOLÚVEIS E ESTÁVEIS EM SOLUÇÕES AQUOSAS. ALÉM DISSO, ESTES COMPLEXOS - AO CONTRÁRIO DA CISPLATINA, CARBOPLATINA, E AGENTES ANTI CANCRO À BASE DE PLATINA RELACIONADOS - NÃO SE LIGAM AO ADN. EM VEZ DISSO, OS DADOS SUGEREM QUE AS FOSFOPLATINAS DESENCADAM A SUPEREXPRESSION DE FAS E FAS RELACIONADAS COM FATORES DE TRANSCRIÇÃO E ALGUNS GENES PRÓAPOPTÓTICOS COMO BAK E BAX. NO ENTANTO, OS COMPLEXOS APRESENTAM UMA TREMENDA CITOTOXICIDADE PARA AS CÉLULAS CANCEROSAS. ASSIM, O PRESENTE INVENTO PROPORCIONA AGENTES ANTICANCERÍGENOS DE PLATINA NOVOS QUE POSSUEM UM ALVO MOLECULAR DIFERENTE DO QUE AQUELES NA TÉCNICA.

DESCRIÇÃO

**FOSFOPLATINAS E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCROS  
RESISTENTES À CISPLANTINA E CARBOPLATINA**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Complexos de platina diamina são bem conhecidos na técnica, devido ao grande sucesso de cis-diaminadicloroplatina (II) (cisplatina) para o tratamento do ovário, testicular, da cabeça e pescoço, e outras formas de cancro. Além disso, a cisplatina é usada em conjunto com outros regimes terapêuticos, incluindo radioterapia. Este quimioterapêutico de platina medeia a apoptose na fase G2 do ciclo celular predominantemente através da inibição da transcrição e por meio de processos de inibição de replicação, especialmente em doses elevadas. A ligação covalente de ADN através dos locais N7 das bases de guanina e adenina, tanto por meios de intra- e inter-cadeia, que geralmente se acredita ser o evento molecular chave na transdução de uma cascata de respostas celulares que levam à apoptose.

Embora a cisplatina seja altamente eficaz, exhibe neurotoxicidade renal e nefropatia. Além disso, muitos pacientes desenvolvem resistência ao tratamento com cisplatina, ao longo do tempo e, por conseguinte, não são curados pelo tratamento de cisplatina. Dois outros medicamentos aprovadas pela FDA platina, carboplatina (1,1-diamina-ciclobutano dicarboxilato-platina (II)) e oxaliplatina (diamina-oxalato-platina (II)), são também acreditados para funcionar de uma forma semelhante à de cisplatina. A carboplatina é especialmente eficaz contra células tumorais resistentes à cisplatina, mas as doses relativamente elevadas são necessárias para tratar

eficazmente os pacientes que são resistentes à cisplatina. Tais doses elevadas também têm associadas toxicidade.

Muitos dos novos complexos de amina de platina têm sido sintetizados e testados quanto à sua atividade anti cancro. No entanto, apenas alguns destes complexos (alguns dos quais estão listados na Figura 14) exibiram resultados promissores. Estes novos complexos contêm uma variedade de ligantes substituíveis de não amina, bem como ligantes de aminas não substituíveis que se crê serem importantes para a ligação de ADN e absorção celular. Geralmente, estes e outros complexos de platina amina relevantes conhecidos na técnica são sintetizados pelo processo utilizado para preparar a cisplatina, isto é, quando tetracloroplatinato ( $\text{PtCl}_4^{2-}$ ) recebe ligantes de amina para se tornar  $\text{PtCl}_2$  (amina/diamina). Começando com o complexo de tetracloro geralmente fornece outros produtos, e assim por  $\text{PtCl}_4^{2-}$  também pode ser utilizada para assegurar um rendimento elevado e pureza do isómero cis, seguindo-se a conversão de  $\text{PtCl}_4^{2-}$  a  $\text{PtCl}_2$  (amina/diamina) e, em seguida, em  $\text{PtCl}_2$  (amina/diamina). Na conversão  $\text{PtCl}_2$  (amina/diamina) de  $\text{PtCl}_4^{2-}$  (amina/diamina), o complexo de di-iodo é convertido no complexo diaqua mediante tratamento do primeiro com dois equivalentes de nitrato de prata ou de outros sais de prata solúveis a um pH baixo. O complexo diaqua resultante reage rapidamente com cloreto de potássio ou ácido clorídrico para se obter o complexo de dicloro de interesse. Em geral, os complexos de platina de interesse são sintetizados a partir do complexo de diaqua correspondente a um pH baixo para introduzir os ligandos substituíveis desde a dimerização ou a polimerização do complexo diaqua ocorre rapidamente a pH mais elevado, obtendo-se produtos indesejáveis.

Em vez de ligandos cloro substituíveis, os complexos de amina de platina na técnica também têm de azoto, enxofre, carboxilato, fosfonato e como ligandos substituíveis. No entanto, uma característica dos complexos que se mostra mais promissor para o tratamento do cancro é um ligante de base dura substituível coordenado com a platina (um ácido suave). Exemplos de tais combinações difíceis de suave que têm apresentado excelentes propriedades anticancerígenas são complexos carboxilatos, carbonato, platina fosfonato.

Apesar dos esforços tremendos para substituir cisplatina por quimioterápicos mais eficazes, os complexos e platina (II) e fosfatos de platina (IV) como ligantes substituíveis têm permanecido praticamente inexplorados. Isto deve-se principalmente ao fato de os primeiros trabalhos sobre os complexos de fosfato de platina (II), normalmente resultarem em complexos dinucleares em ponte de fosfato. Apesar dos relatos de excelentes propriedades anticancerígenas de alguns complexos de fosfoplatina dinuclear (II), uma maior exploração de suas aplicações foram limitadas devido à baixa solubilidade destes complexos em soluções aquosas. Embora certos complexos piro- monomérica e trifosfato são conhecidos na arte, tais complexos não são adequados para composições farmacêuticas, porque eles sofrem hidrólise em soluções de fosfato moderadamente ácidas, resultando em produtos dinucleares insolúveis (ver US 7342122 para Odani et al. Descrevendo um dímero do complexo monomérico am-2, que é aqui descrito e na Bose et al. Inorg. Chem. 1985, 24, 3989-3996; Ver também, WO 2005/000858 de Odani et al, que descreve monomérica am-2, tal como um potencial medicamento anti-cancro).

Por conseguinte, continua a haver uma necessidade na técnica para alternativas estáveis e eficazes para a cisplatina e carboplatina, para o tratamento de cancros.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona composições que compreendem fosfoplatinas, complexos estáveis fosfato monoméricos de platina (II) e (IV), para utilização num método de tratamento do cancro, como definido nas reivindicações.

Também são fornecidos métodos de preparação e isolamento de fosfoplatinas, tal como definido nas reivindicações.

São revelados métodos para o tratamento de cancros, incluindo cancros resistentes à cisplatina e/ou carboplatina, por administração de uma quantidade eficaz de fosfoplatinas, quer isoladamente ou em combinação, com um veículo farmacologicamente aceitável, a um sujeito em necessidade de tal tratamento.

#### DESCRIÇÃO BREVE NOS DESENHOS

A Figura 1 mostra as estruturas de alguns dos complexos de platina (II) e de platina (IV) do presente invento, em que R1, R2, R3 e S são tal como definido nas reivindicações. De acordo com as reivindicações 1 e 20, certos complexos que são excluídos destas estruturas também formam parte da invenção. Em certas formas de realização, R1 e R2 são selecionados a partir de amina, metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, ciclo-hexano amina, anilina, piridina, e piridina substituídos. Em certas formas de realização, R3 é selecionado a partir de etilenodiamina e hexanodiamina. Em certas formas de

realização, os sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos são reivindicados.

A FIGURA 2 mostra as estruturas de alguns complexos isolados da presente invenção, a saber: (A) diamina (pirofosfato dihidrogénio) platina (II), também conhecida como 2-am; (B) cis-diamina-trans-dihidroxi(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV), também conhecido como 4-am; (C) 1,2-etanodiamina (pirofosfato dihidrogénio) platina (II), também conhecida como en-2; (D) 1,2-etanodiamina-trans-dihidroxi (pirofosfato dihidrogénio) platina (IV), também conhecido como 4-en; (E) (trans-1, 2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II), também conhecida como dach-2; e (F) (trans-1,2-ciclo-hexanodiamina)-trans-dihidroxi-(hidrogeno pirofosfato) platina (IV), também conhecido como 4-dach.

A FIGURA 3 mostra a estrutura de cristal de raios-X de am-4 com ião de sódio.

A FIGURA 4 apresenta a estrutura de cristal de raios-X de en-4 nas suas conformações diferentes, visto do lado do pirofosfato.

A Figura 5 mostra a extensão da protonação dos complexos mostrados na Figura 2, tal como medido por  $^{31}\text{P}$  desvio químico como uma função do pH. Os constantes acidez estimadas são apresentadas na Tabela 1. Estes dados fornecem informações sobre as diferenças de solubilidade destes complexos entre solução ácida e uma solução neutra. Sob as condições descritas, a valores de pH inferiores a 2, estes complexos são completamente protonados e, portanto, espera-se que exibam solubilidade reduzida.

FIGURA 6 apresenta a estabilidade do diferencial dach-2 em (A) pH 4,2 e (B) pH 8. A um pH 8, nenhuma decomposição do dach-2 foi observada, como evidenciado pela retenção do ião pirofosfato coordenada à platina (II) até seis dias. Em contraste, a um pH de 4,2, a decomposição considerável é evidente, devido ao aparecimento do sinal de pirofosfato livres. Começando com o espectro inferior de cada painel, os espectros foram registados a intervalos de tempo de 24 horas.

A FIGURA 7 é um gráfico de comparação dos efeitos citotóxicos do dach-2, cisplatina, carboplatina e como uma função da concentração micromolar em linhas celulares ovarianas humanas resistentes cisplatina e carboplatina (A2780/C30). Esta linha de células é resistente a cisplatina micromolar 30 e carboplatina micromolar 100.

A FIGURA 8 é um gráfico que compara os efeitos citotóxicos do dach-2 com a FDA aprovou fármacos da cisplatina e carboplatina, anticancerígenos para a linha celular ovarina humana (A2780).

A FIGURA 9 representa a citotoxicidade de dach-2 no sentido da cisplatina sensível (A) e às linhas celulares de cancro de pescoço e cabeça resistente à ciplastina (B). Os valores de IC50 para dach-2 para células sensíveis a cisplatina é inferior a 1 micromolar, e para as células resistentes a cisplatina, é inferior a 5 micromolar.

A FIGURA 10 mostra que a uma dada concentração, dach-2 é tomado pelas células (tal como determinado por espectroscopia de absorção atómica) em quantidades reduzidas em comparação com a cisplatina. Por exemplo, a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , a acumulação de cisplatina em

células A2780 foi de 3,0 ng Pt/10<sup>6</sup> células enquanto dach-2 mostrou 1,0 ng Pt/10<sup>6</sup> células. Uma tendência semelhante para acumulações de platina vale para outras concentrações.

A FIGURA 11 mostra o ponto de ligação ao ADN por cisplatina, como uma função da concentração na linha celular ovariana humana (A2780), determinado por espectroscopia de absorção atômica, após incubação durante 2 horas a cisplatina. Sem a platina ligada ao ADN foi detetada por meio da mesma técnica quando as células A2780 foram tratadas com 2-dach- até à concentração micromolar de 50, mesmo quando as células foram tratadas durante 24 horas.

A FIGURA 12 é uma comparação de ligação de base guanina (o local de ligação de ADN predominante de cisplatina) entre a cisplatina (inferior), am-2 (meio), e dach-2 (topo), por espectroscopia de RMN de protão. O espectro de cima apresenta um sinal para a base livre de guanina em 8,05 ppm para o hidrogénio H8 do anel da purina, a parte inferior do espectro revela um sinal adicional a 8,43 ppm para o protão H8 devido a guanina ligação a cisplatina, o local N7 do anel purina, e o espectro do meio indica apenas o sinal desacoplado guanina H8 platina mas não de sinal ligado. O espectro de fundo foi registrada após 48 horas. Os espectros médio e superior foram registrados após 96 e 106 horas, respetivamente. Que os complexos da presente invenção não se ligam covalentemente bases de guanina (o local de ligação de ADN para a cisplatina, carboplatina, e oxaliplatina) sugere mecanismos apoptóticos que são diferentes dos propostos para a cisplatina.

A FIGURA 13 mostra uma de dados de espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H, confirmando a falta de ligação do ADN em células de

ovário humano por Dach- 2. No ensaio associado, foi permitido que dach-2 reagisse com o ADN de cadeia dupla de vitelo-timo, um oligonucleótido sintético (5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3'), um dinucleótido (dGpG), e monofosfatos de nucleótidos (5'-dGMP e 5'-dAMP) em concentrações tanto quanto 250 vezes maior do que os de doses celulares. A extensão da ligação do ADN foi monitorizada por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H. Em paralelo, as reacções foram semelhantes com cisplatina conduzidas sob condições idênticas. Os resultados de uma experiência típica de RMN utilizando um oligonucleótido 25-mer está apresentado na figura, o que mostra que dach-2 não apresenta qualquer ligação mensurável de ADN, enquanto a cisplatina prontamente formam adutos covalentes com o ADN, como evidenciado pela formação de novos sinais na região 8,4-8,95 ppm. No entanto, a cisplatina prontamente formados adutos com todos os nucleótidos acima mencionadas, enquanto não foram observados sinais de RMN detectáveis para ligação aos nucleótidos dach-2, mesmo após sete dias.

A FIGURA 14 mostra as estruturas de alguns dos complexos de platina activos conhecidos na arte que estão a ser utilizados como fármacos, estão a ser avaliados como potenciais medicamentos, ou que foram submetidos a ensaios clínicos.

A FIGURA 15 mostra as estruturas dos complexos usados para formar os complexos fosfoplatina da FIGURA 1; X é halogéneo, R1, R2 e R3 cada um, independentemente, é selecionado a partir de amins alifáticas ou aromáticas substituídas ou não substituídas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Aqui providenciados são os complexos de pirofosfato (IV) e platina monomérica (II) e (IV) estáveis (denominados fosfoplatinas) para o tratamento de cancro, incluindo o tratamento de cancros da cisplatina e/ou carboplatina-resistente. Em geral, as fosfoplatinas não estão sujeitas à hidrólise, são solúveis em solução aquosa a pH neutro e são estáveis em solução aquosa a pH neutro. Além disso, fosfoplatinas mostram citotoxicidade geral em linhas celulares de cancro, e são eficazes em linhas de células que são resistentes a um ou a ambos a cisplatina e carboplatina. Por conseguinte, os fosfoplatinas são eficazes, e em alguns casos mais eficaz, em induzir a morte de células de cancro, em comparação com medicamentos conhecidas cancerosas platina, e exibem uma estabilidade desejável e solubilidade em soluções que são adequadas para administração a pacientes. Tal como é aqui usada em referência às fosfoplatinas da invenção, estável refere-se à resistência dos complexos à hidrólise quando mantida em solução aquosa a um pH na gama de 6-8, durante um período de tempo que pode variar entre 2 e seis dias.

Acredita-se que fosfoplatinas, ao contrário da cisplatina, carboplatina, e agentes anti cancro à base de platina relacionados, não se ligam de forma covalente de ADN. Uma vez que a resistência a cisplatina é acreditado para originar a reparação eficaz de danos no ADN por uma variedade de enzimas, incluindo as enzimas de reparação de excisão nuclear, e uma vez que para fazer fosfoplatinas não covalente de ADN de ligação, resistência a fosfoplatinas devido ao mecanismo de reparação do ADN é improvável. Os dados sugerem que fosfoplatinas desencadear superexpressão de fas e fas relacionadas com fatores de transcrição e alguns genes pró-apoptóticos como Bak e Bax. Além disso, a ligação celular de fosfoplatinas é muito menos do que a

cisplatina, contudo os fosfoplatinas exibem citotoxicidade tremenda. Assim, o presente invento proporciona agentes anticancerígenos eficazes platina que têm um alvo molecular diferente do que aqueles na técnica.

Em algumas formas de realização, os complexos têm as fórmulas gerais apresentadas na Figura 1, em que R1, R2, R3 e S são tal como definido nas reivindicações. De acordo com as reivindicações 1 e 20, certos complexos que são excluídos destas estruturas também formam parte da invenção. Em certas formas de realização, R1 e R2 são selecionados a partir de amina, metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, ciclo-hexano amina, anilina, piridina, e piridina substituída. Em certas formas de realização, R3 é selecionado a partir de etilenodiamina e ciclohexanodiamina.

Em certas formas de realização, os sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos são reivindicados. Assim, os agentes anti cancro da presente invenção incluem, em certas formas de realização, os complexos na Figura 2.

Além disso proporcionam-se aqui métodos para sintetizar e isolar platina monomérica estável (II) e (IV), complexos de pirofosfato. Em um exemplo, o método inclui os complexos que formam com a fórmula da Figura 1 (I) e (III), por manutenção de uma mistura aquosa de reação que compreende o excesso de pirofosfato e um complexo de platina com a fórmula apresentada na Figura 15, em que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> e X são tal como definido nas reivindicações; a uma temperatura de cerca de 30 a cerca de 60 graus Celsius durante um período de cerca de 12 a cerca de 18 horas a um pH de cerca de 7 a cerca de 9.

Os complexos apresentados na Figura 15 pode ser feitos de qualquer maneira adequada. Em alguns exemplos, como geralmente descritos na técnica, complexos *cis*-(amina/diamina) dicloroplatina (II) podem ser preparados por conversão de  $K_2PtCl_4$  de  $K_2PtI_4$  pela adição de iodeto de potássio. Este é então feito reagir com os ligandos de amina desejados. Os resultantes *cis*-(amina/diamina) diiodoplatina (II) são, em seguida, transformados na correspondente *cis*-(amina/diamina) diaquaplatina (II) *in situ* através da adição de dois equivalentes de nitrato de prata. As espécies *cis*-diaqua  $[Pt(amina/diamina)_2(H_2O)_2]^{2+}$  são então convertidos nos complexos de *cis*-dicloro pela adição de cloreto de potássio.

Deve entender-se que podem ser utilizadas outras condições de reação apropriadas. Por exemplo, em algumas formas de realização, a temperatura pode ser de cerca de 35 a cerca de 45 graus C. Assim, a temperatura de reação pode ser desde cerca de 30-31, 31-32, 32-33, 33-34, 34-35, 35-36, 36-37, 37-38, 38-39, 39-40, 40-41, 41-42, 42-43, 43-44, 44-45, 45-46, 46-47, 47-48, 48-49, 49-50, 50-51, 51-52, 52-53, 53-54, 54-55, 55-56, 56-57, 57-58, 58-59, 59-60 graus C, e entre os mesmos incrementos. Bons resultados foram obtidos a 40 graus C. Em alguns exemplos, os reacionários deixados prosseguir a partir de cerca de 13 a cerca de 16 horas. Assim, o tempo de reação pode ser desde cerca de 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 16-17, e 17-18 horas e entre os mesmos incrementos. Bons resultados têm sido obtidos em tempos de reação de 15 horas. Em alguns exemplos, o pH pode ser de cerca de 6-7, 7-8, e 8-9 e incrementos entre as mesmas. Bons resultados têm sido obtidos com um pH de cerca de 8.

O método inclui ainda, posteriormente, concentrando-se a mistura aquosa de reação de tal forma que os precipitados

de pirofosfato não formam. Deve entender-se que a mistura de reação aquosa pode ser concentrada de qualquer forma adequada. Por exemplo, a mistura de reação aquosa pode ser concentrada por evaporação rotativa.

O método inclui ainda a descida rápida do pH da mistura de reação para um valor de pH inferior a 2 por adição de um ácido adequado. Em alguns exemplos, o ácido nítrico pode ser utilizado para baixar o pH. Em algumas formas de realização, o pH é de no variam entre cerca de 1 a menos de 2. Bons resultados foram obtidos a pH 1

Em alguns exemplos, o método também inclui a mistura de reação a uma temperatura de temperatura entre 5 graus Celsius e ambiente após concentração da mistura de reação. Em outros exemplos, o método também inclui o arrefecimento da mistura de reação a uma temperatura compreendida entre 5 graus Celsius da temperatura ambiente e depois baixando o pH da mistura de reação.

Em outras formas de realização, são fornecidos métodos de complexos de formação de acordo com a Figura 1 (II) e (IV). Os métodos são tal como descritos acima, mas ainda compreender a adição de peróxido de hidrogénio à mistura reacional, e, opcionalmente, um reagente selecionado de entre os sais de acetato, sais de grupo de butirato, e sais de  $\alpha$ -hidroxiácidos, depois de manter a mistura de reação a uma temperatura de cerca de 30 a cerca de 60 graus Celsius durante um período de cerca de 12 a cerca de 18 horas a um pH de cerca de 7 a cerca de 9.

Em alguns exemplos, o reagente opcional adicionado em conjunto com peróxido de hidrogénio antes da concentração da mistura de reação é selecionado a partir de acetato de

sódio, o butirato de sódio, e sais de sódio de  $\alpha$ -hidroxiácidos. Em outros exemplos, o reagente opcional adicionado em conjunto com peróxido de hidrogénio antes da concentração da mistura de reação é selecionado a partir de acetato de potássio, butirato de potássio, e sais de potássio de  $\alpha$ -hidroxiácidos.

O método de síntese e isolamento de complexos monoméricos aqui descritos pode ser distinguido através da técnica uma vez que o novo método não produz compostos de fosfato diméricos ou oligoméricos. Por exemplo, o método relatado por Bose et al. em *Inorg. Chem.* 1985, 24, 3989-3996 ("Bose 1,985"), que envolve o isolamento de  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)$  (am-2) a partir da mistura de reação através da absorção do complexo pirofosfato aniônica em um anião resina -Exchange a pH neutro e eluição com um eluente de pH baixo, não foi útil para a síntese e isolamento do am-4, en-2, en-4, 2-dach, e dach-4. Quando foi utilizado o método de Bose 1985, estes complexos decomposta nas camas de troca iônica quando a separação for tentada por eluição com um eletrólito de pH mais baixo. Inicialmente, os complexos virou preta acastanhada, seguido pela formação de um precipitado preto insolúvel dentro das resinas de permuta iônica. Separação de am-4, en-2, en-4, 2-dach, e dach-4 a partir das respectivas misturas de reação é possível apenas quando o método de Bose 1985 foi modificado como aqui descrito. Cada mistura de reação foi concentrada por evaporação a vácuo, na medida em que o ácido pirofosfórico não reagiu não se precipitar quando o pH foi reduzido num passo seguinte (a solubilidade do ligando de pirofosfato varia muito com o pH). Para iniciar a precipitação seletiva, as concentrações finais variaram entre 0,05 a 0,08 M, uma vez mais a redução do volume resultou em co-precipitação do pirofosfato que não reagiu, que deve estar presente em excesso durante a

reação. Depois de se concentrar, as misturas reacionais foram arrefecidas e o pH foi rapidamente reduzido para 1,0, a fim de induzir a precipitação, aproveitando as diferenças na solubilidade entre as formas protonadas e desprotonadas dos complexos.

Com um pH neutro, os complexos monoméricos isolados Pt(II) e Pt(IV) da presente invenção são estáveis. Tal como indicado por  $^{31}\text{P}$  RMN espectros, na gama de pH de 6-8 dos complexos não sofreu qualquer dissolução devido à perda de um ou de amina ou um ligando de pirofosfato no intervalo de tempo de seis dias a um pH neutro em solução aquosa. No entanto, no mesmo intervalo de tempo, a dissolução lenta devido à libertação do ligando pirofosfato era evidente a um pH de 4,2 com o aparecimento do sinal de pirofosfato livre a -10,3 ppm. Ao mesmo tempo, um produto insolúvel platina dinucleares em ponte pirofosfato (II) foi formado. Os dados também indicam que a decomposição do ácido depende em grande medida da acidez, quanto maior for a acidez, mais rápida é a decomposição (Ver Figura 5, a Tabela 1 e Tabela 2).

**Tabela 1. Os desvios químicos ( $\delta$ , ppm) para platina desprotonada (II) e complexos de pirofosfato (IV) de platina e as constantes de acoplamento de Pt-P**

Complexo	$\delta\text{-}^{31}\text{P}$ , ppm	$\delta\text{-}^{195}\text{Pt}$ , ppm	$J_{\text{P-Pt}}$ , Hz
am-2	2.12	-1503	23.44
dach-2	1.78	-1729	25.03
en-2	1.93	N/A	29.73
am-4	2.32	1733	15.38
dach-4	2.41	1613	25.91
en-4	2.35	1582	25.91

**Tabela 2. Cálculo dos (-registro das constantes de acidez) valores para complexos de pirofosfato Pt (II) - e Pt (IV), determinados por desvios químicos de fósforo-31**

Complexo	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
am-2	2,960±3 (3,8±0,1)	4,7±0,2
en-2	2,2±0,1	4,4±0,1
dach-2	2,6±0,2 (3,3±0,1)	4,4±0,2
am-4	2,0±0,1	4,7±0,1
en-4	<2	4,3±0,1

Os complexos da presente invenção são úteis para o tratamento de vários cancros. Ensaio citotóxicos em linhas celulares ovarianas humanas (A2780) e Células Ovarianas Chinesas (CHO) demonstram que estes complexos são eficazes como um primeiro ciclo de tratamento, e ensaios com ambas as células Ovarianas resistentes cisplatina e carboplatina (C30) (ver Tabela 3) mostram que estes complexos são um segundo ciclo de tratamento adequados para cancros resistentes. Os complexos da presente invenção são particularmente desejáveis porque elas podem ter uma toxicidade reduzida in vivo. Estes complexos são absorvidos pelas células, em quantidades reduzidas, quando comparada com a cisplatina, o que indica que a dose menor pode ser necessário, em comparação com doses de cisplatina e outros terapêuticos para o cancro da platina. Por exemplo, a concentração de 10 µM, a acumulação de cisplatina em células A2780 foi de 3,0 ng Pt/10<sup>5</sup> células enquanto dach-2 mostrou 1,0 ng/Pt 10<sup>6</sup> de células, e nas linhas de células resistentes, dach-2 mostrou 1,4 ng/Pt10<sup>6</sup> de células no seu valor de IC<sub>50</sub>, enquanto a cisplatina mostrou >5 ng Pt/10<sup>6</sup> células, no entanto, o valor de IC<sub>50</sub> para o primeiro complexo é menos do que metade do segundo complexo (ver Figura 10 e Tabela 4).

**Quadro 3. Valores de IC50 nas concentrações  $\mu\text{M}$  para Fosfoplatinias, cisplatina e carboplatina em A270 e A2780 C30/linhagens celulares CHO**

Complexo	A780	A2780/C30	CHO
Cisplatina	7,5 $\pm$ 1,5	110 $\pm$ 11,29	29 $\pm$ 3
Carboplatina	90 $\pm$ 13	>200	>200
dach-2	20 $\pm$ 4	48 $\pm$ 5	35 $\pm$ 5
dach-4	180 $\pm$ 15	155 $\pm$ 17	116 $\pm$ 17
am-2	100 $\pm$ 11	>200	120 $\pm$ 30
am-4	175 $\pm$ 22	>200	> 200
en-4	170 $\pm$ 33	>200	> 200

**Tabela 4. Acumulações Celulares Comparativas ( $\text{ng}/10^6$  células) de Platina para a cisplatina e pirodach-2 em linhas celulares A2780 e A2780/C30**

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	A2780		A2780/C30	
	Cisplatina	dach-2	Cisplatina	dach-2
10	3,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,20	1,00 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,08
20	5,00 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,30	2,00 $\pm$ 0,40	1,00 $\pm$ 0,02
30	6,00 $\pm$ 0,10	3,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 0,50	1,00 $\pm$ 0,02
50	20,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 0,30	5,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 0,10

Os dados sugerem que os complexos do presente invento pode induzir apoptose por diferentes mecanismos moleculares e celulares do que a cisplatina e outros fármacos de platina. Em primeiro lugar, a ausência de ligação covalente (Ver Figura 12 e Exemplo 13) indica que os complexos do invento não funcionam através da via de ligação ao ADN. Acredita-se

geralmente por aqueles peritos na arte que adquiriu resistência a cisplatina é devido a uma remoção eficiente de platina a partir de ADN pelo processo de reparação de excisão de nucleótidos. Por causa da aparente ausência de ligação a ADN, e, por conseguinte, a possibilidade de que os mecanismos de reparação de ADN não operam sobre os complexos da invenção, a resistência celular aos complexos pode ser eliminado. Esta conclusão encontra suporte a partir dos dados que mostram que a citotoxicidade dach-2 está presente em ambos a cisplatina e as linhas de células resistentes a carboplatina (Ver Tabela 3).

Em segundo lugar, as provas de que os complexos do presente invento induzem a apoptose por diferentes mecanismos moleculares e celulares do que a cisplatina e outros fármacos de platina vem de experiências em que foi permitida a dach-2 para reagir com cisteína e glutathione (dados não mostrados). O ligando de pirofosfato de dach-2 foi prontamente substituído com ligação concomitante através do tiol, indicando possível ancorar proteínas locais das proteínas da superfície celular através de resíduos de cisteína ou metionina.

Em terceiro lugar, as provas de que os complexos do presente invento induzem a apoptose por diferentes mecanismos moleculares e celulares do que a cisplatina e outros fármacos de platina também vem de experiências que envolvem a sobre-expressão de fas e seus membros associados (Ver Exemplo 11). Esta sobre-expressão em resposta aos complexos da invenção implica que outras vias que danificam o ADN vias de transdução de sinal são provavelmente envolvidos em expor as atividades citotóxicas dos complexos da invenção. Em média, fas foi sobre-expresso por um fator de seis horas, quando as células foram tratadas com os

complexos do presente invento, enquanto não significativa a sobre-expressão foi observada em células tratadas com cisplatina.

Como aqui descrito, os complexos da presente invenção são tão eficazes ou mais eficaz do que a utilizada cisplatina e carboplatina, proporcionando assim um método de tratamento de cancro em pacientes que previamente não tinham alternativas eficazes à cisplatina e carboplatina tratamento. No entanto, o paciente não necessita de ter sido previamente tratados com cisplatina ou a carboplatina, a fim de ser tratadas com os complexos aqui descritos. Administração do tratamento pode ser realizado em um hospital ou outras instalações médicas por pessoal médico.

Os complexos do presente invento são administradas e doseadas de acordo com a boa prática médica, tendo em conta a condição clínica do paciente individual, o local e método de administração, a programação da administração, a idade do paciente, sexo, peso corporal e outros fatores conhecidos dos praticantes de medicina. O farmacologicamente "Quantidade eficaz" para os fins aqui descritos são, assim, determinadas por estas considerações, como são conhecidos na arte. A quantidade deve ser eficaz para conseguir uma melhoria, incluindo, mas não limitado a, uma melhor taxa de sobrevivência ou recuperação mais rápida ou melhoria ou eliminação de sintomas, e outros indicadores como são selecionados como medidas apropriadas pelos especialistas na arte. Os complexos da presente invenção podem ser administrados a animais, incluindo mamíferos.

Os complexos da presente invenção podem ser administradas de várias maneiras. Deve notar-se que eles podem ser administrados como o complexo e pode ser administrado por

si só, em solução aquosa aproveitando a excelente solubilidade desses complexos, ou como um ingrediente ativo, em combinação com portadores farmacologicamente aceitáveis, diluentes, adjuvantes e veículos. Os complexos podem ser administrados oralmente, subcutaneamente ou parentericamente incluindo a administração intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, administração intratonsilar, e intranasal, assim como técnicas de infusão intratecal. Implantes dos complexos são também úteis. O paciente a ser tratado é um animal de sangue quente e, em particular, mamíferos, incluindo o homem. Os veículos, diluentes, adjuvantes e veículos farmacologicamente, bem como suportes de implantes geralmente referem-se a materiais de enchimento inertes, sólidos ou líquidos, não tóxicos, diluentes ou material de encapsulação não reage com os ingredientes activos da invenção.

As doses podem ser doses simples ou doses múltiplas durante um período de vários dias. O tratamento tem geralmente um comprimento proporcional à duração do processo da doença e da eficácia de medicamentos e da espécie do paciente a ser tratado.

Ao administrar os complexos do presente invento parentericamente, eles serão geralmente formulados numa forma injectável de dosagem unitária (solução, suspensão, emulsão). As formulações farmacêuticas adequadas para injeção incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para reconstituição em soluções injetáveis estéreis ou dispersões. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol,

polietileno glicol líquido, e semelhantes), suas misturas adequadas, e óleos vegetais.

A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. Veículos não aquosos de óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, ou o óleo de amendoim e ésteres, tais como miristato de isopropilo, podem também ser utilizados tais como sistemas de solventes para as composições. Além disso, vários aditivos que melhoram a estabilidade, esterilidade e isotonicidade das composições, incluindo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e tampões, pode ser adicionado. A prevenção da acção de microrganismos pode ser assegurada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, e semelhantes. Em muitos casos, será desejável incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio, e outros semelhantes. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela utilização de agentes que retardem a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina. De acordo com a presente invenção, contudo, qualquer veículo, diluente ou aditivo utilizado teria de ser compatível com os complexos.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando os complexos utilizados na prática do presente invento na quantidade necessária do solvente apropriado com vários dos outros ingredientes, como desejado.

Uma formulação farmacológica da presente invenção pode ser administrada ao paciente numa formulação injetável contendo qualquer veículo compatível, tal como vários veículos, adjuvantes, aditivos e diluentes; ou os complexos utilizados na presente invenção podem ser administrados por via parentérica a um paciente sob a forma de implantes subcutâneos de libertação lenta ou sistemas de distribuição direcionada, tais como anticorpos monoclonais, entrega em vetor, iontoforese, matrizes de polímero, lipossomas e microesferas. Muitos outros desses implantes, sistemas de libertação e módulos são bem conhecidos pelos peritos na técnica.

A invenção é descrita em detalhe por referência aos seguintes exemplos experimentais. Estes exemplos são proporcionados para fins de ilustração apenas, e não se destinam a ser limitantes.

A descrição anterior e os exemplos que se seguem demonstram a síntese de complexos de platina pirofosfato de um modo diferente dos métodos de síntese anteriormente descritas. Estes complexos têm sido mostrados para têm atividades anti cancro, inclusive em cancros cisplatina e carboplatina-resistente. Inesperadamente, as atividades anticancerígenas apresentados são comparáveis, para e ativo em doses relativamente mais baixos do que alguns complexos de platina administrados atualmente. Também inesperadamente, os dados sugerem que os complexos da presente invenção tem um mecanismo de ação diferente do que os complexos de platina de uso corrente, ou seja, que eles não se ligam ao ADN durante o tratamento. Assim, os complexos do presente invento representam uma nova classe de agentes terapêuticos de platina úteis para o tratamento de cancros, incluindo

cancros resistentes cisplatina e carboplatina em que o tratamento eficaz tem sido previamente difícil de obter.

EXEMPLO 1: Diamina (pirofosfato dihidrogénio) platina (II) (2-am)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de cisplatina foram dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubado a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, a solução foi concentrada até 5-10 mL por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1 N HNO<sub>3</sub> precipitou o produto sob a forma de um pó amarelo claro. Precipitação foi terminada por arrefecimento em gelo, e o produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água fria e acetona. Rendimento de Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 0,04 g (30%). O espectro de <sup>31</sup>P RMN mostra um único pico a 2,12 ppm, pH 7,99, com respeito ao ácido fosfórico a 85% como referência externa. <sup>195</sup>Pt RMN de ressonância é detectada a -1503 ppm.

EXEMPLO 2: Cis-diammina-dihidroxi-trans-(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV) (AM-4)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de cisplatina foram dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubou-se a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, 1 ml de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada à mistura de reação, e deixou-se reagir durante mais 3 horas. A solução foi, em seguida, concentrada para 5-10 ml por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1 N HNO<sub>3</sub> precipitou o produto sob a forma de um pó amarelo claro. Precipitação

foi completada por arrefecimento em gelo, e o produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água fria e acetona. Rendimento cis, trans Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 0,05 g (34%). O espectro de <sup>31</sup>P RMN mostra um único pico a 2,32 ppm, pH 8,11, com um <sup>195</sup>Pt-<sup>31</sup>P constantes de acoplamento de 15,4 Hz. O espectro <sup>195</sup>Pt RMN mostra um quinteto a 1733 ppm, com uma constante de acoplamento de <sup>195</sup>Pt-<sup>14</sup>N de 232 Hz.

EXEMPLO 3: 1,2-Etanodiamina(pirofosfato dihidrogénio) platina (II) (en-2)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de dicloro (etilenodiamina) platina (II) foram dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubou-se a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, a solução foi concentrada para 5-10 ml por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1 N HNO<sub>3</sub> não precipitou o produto. O produto foi caracterizado por situ por RMN <sup>31</sup>P. Um único pico é observada em 1,93 ppm no espectro de RMN <sup>31</sup>P com uma constante de 195 Pt- 31 P de 29,73 Hz.

EXEMPLO 4: 1,2-trans-dihydroxo Etanodiamina- (dihidrogénio pirofosfato) platina (IV) (4-br)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de dicloro (etilenodiamina) platina (II) foram dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubou-se a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, 1 ml de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada à mistura de reação, e deixou-se reagir durante mais 3 horas. A solução foi então concentrada para 5-10 ml por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não

reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1N HNO<sub>3</sub> precipitou o produto sob a forma de um pó amarelo claro. Precipitação foi terminada por arrefecimento em gelo, e o produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água fria e acetona. Rendimento trans-Pt (OH)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>)(H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 0,07 g (49%). O espectro de RMN <sup>31</sup>P mostra um único pico a 2,30 ppm, pH 8,13, com um <sup>195</sup>Pt-<sup>31</sup>P constantes de acoplamento de 25,9 Hz. O espectro de RMN <sup>195</sup>Pt mostrou um pico largo em 1582 ppm.

EXEMPLO 5: (Trans-1,2-ciclo-hexanodiamina)(pirofosfato dihidrogénio) platina (II) (dach-2)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de dicloro (trans-1,2-diaminaciclohexil)platina(II) foram dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubou-se a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, a solução foi concentrada para 5-10 ml por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1N HNO<sub>3</sub> precipitou o produto sob a forma de um pó amarelo claro. Precipitação foi terminada por arrefecimento em gelo, e o produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água fria água e acetona. Rendimento trans-Pt (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)(H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 0,05 g (38%). O espectro RMN <sup>31</sup>P exhibe um único pico em 1,78 ppm, pH 7,93 com um <sup>195</sup>Pt-<sup>31</sup>P constante de 25,03 Hz. Sinal RMN <sup>195</sup>Pt é gravado em -1,729 ppm.

EXEMPLO 6: (trans-1,2-ciclo-hexanodiamina)-dihidroxi-trans-(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV) (dach-4)

Deca-hidrato de pirofosfato de sódio (0,4 g) e 0,1 g de dicloro (trans-1,2-diaminacyclohexyl) platina (II) foram

dissolvidos em 250 ml de água destilada, pH 8, e incubou-se a 40 graus C durante 15 horas. Após o período de incubação, 1 ml de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada à mistura de reação, e deixou-se reagir durante mais 3 horas. A solução foi em seguida, concentrou-se a 5-10 ml por evaporação rotativa e filtrou-se para remover qualquer material de partida que não reagiu. A rápida redução do pH para aproximadamente 1,0 por adição de 1 N HNO<sub>3</sub> precipitou o produto sob a forma de um pó amarelo claro. Precipitação foi terminada por arrefecimento em gelo, e o produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água fria e acetona. Rendimento trans-Pt(OH)<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)(H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>): 0,07 g (52%). O espectro de <sup>31</sup>P RMN mostra um único pico a 2,41 ppm, pH 7,95, com um 195 Pt- <sup>31</sup>P constantes de acoplamento de 25,9 Hz. O espectro <sup>195</sup>Pt RMN revelou um pico largo a 1613 ppm.

#### EXEMPLO 7

Espectroscopia RMN <sup>31</sup>P pode ser utilizado para confirmar que a platina respectiva diamina (pirofosfato) (II) e diamina (dihidroxi) (pirofosfato) platina (IV) mostrado na Figura 2 e descritos nos Exemplos 1-6, foram sintetizados e isolados pelo novo método aqui descrito.

Cada um dos complexos de exibiu um único <sup>31</sup>P RMN de ressonância com os desvios químicos em ppm, o intervalo de 1,78-2,12. Estes desvios químicos são 9-11 ppm a jusante em comparação com o ligando de pirofosfato livres, de acordo com os desvios químicos observadas de coordenação para os quelatos de fosfato descritos na arte. Complexo pirofosfato monodentados foram não detectado nos produtos finais, como revelado pela ausência dos esperados dois conjuntos de dupletos. Os dados de RMN <sup>31</sup>P também mostrou que a oxidação de Pt (II) para os complexos de Pt (IV) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi

seletivo, como evidenciado pela formação de um único complexo de pirofosfato platina (IV), em cada caso.

#### EXEMPLO 8

As células de cancro ovarianas humanas, A2780, foram obtidos pelo Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Filadélfia, PA). As células foram cultivadas em monocamada utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 0,25 unidades/mL de insulina e penicilina/estreptomicina numa incubadora a 37 graus C continuamente gaseificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas com 0,0625% de tripsina em HBSS para manter as células em crescimento exponencial.

Os valores de IC50 foram determinados usando um ensaio clonogénico. Resumidamente, 500 células A2780 de uma suspensão de células individuais foram plaqueadas em placas de 60 milímetros de Petri de 24 horas antes do tratamento para permitir a ligação do medicamento de células. No dia do tratamento, o meio foi decantado e substituído com a medicamento e as células tratadas foram colocadas de volta na incubadora a 37 graus C durante 1 hora. Placas em triplicata foram criadas para cada concentração do medicamento. Após o tratamento com medicamentos 1 hora, o fármaco que contém o meio foi decantado e substituído por meio fresco. Estas placas foram devolvidas ao 37 graus C incubadora de uma semana para a formação de colónias. As colónias foram fixadas e coradas com violeta de cristal a 2% em absoluto metanol. As colónias contendo mais do que 50 células foram contadas. O número de colónias marcados das placas em triplicado foi em média, e este número foi dividido pelo número de células plaqueadas para obter um valor para a fração de células que formam colónias. Estes

valores para a fração de células que formam colónias foram então corrigida para a eficiência do plaqueamento, dividindo-o pelo número de células que formam colónias em placas que não foram tratados com medicamento.

A Tabela 3 mostra a atividade anti cancro dos complexos descritos aqui, expressos como valores de IC50, em comparação com a cisplatina e carboplatina. Como pode ser visto a partir dos dados, dach-2 exibe um melhor desempenho do que ambos a cisplatina e carboplatina em linhas de células resistentes. Além disso, dach-4 mostra tanto uma atividade superior à carboplatina. Os dados também mostram que Dach-4 é tão ou mais eficaz para as células cancerosas resistentes a cisplatina/carboplatina e células sensíveis à cisplatina, indicando ainda que fosfoplatininas pode não desenvolver resistência.

Ao contrário da cisplatina e carboplatina, os complexos de fosfato da presente invenção prevê-se que exibem menos toxicidade, devido à presença de ligandos de fosfato, que pode ajudar a transportar de forma eficiente destes complexos para a célula. Além disso, ao contrário da cisplatina, estes complexos de fosfato não exibiram qualquer ligação mensurável a ADN dentro de 72 horas, como mostrado na Figura 12. A cisplatina é acreditado para funcionar por meio de ligação do ADN genómico. Assim, os complexos de fosfato do presente invento têm diferentes alvos celulares.

#### EXEMPLO 9

Uma linha celular ovariana resistente a cisplatina (C30) (Hamaguchi, et al., 1993), obtidos do Dr. Thomas Hamilton (Fox Chase Cancer Center, Filadélfia, PA), foi tratada com

os complexos de platina da presente monoméricos invento (mostrado na Figura 2). Esta linha celular é também resistente transversal à carboplatina. As células foram cultivadas em monocamada utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 0,25 unidades/mL de insulina e penicilina/estreptomicina numa incubadora a 37 graus C continuamente gaseificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas com 0,025% de tripsina em HBSS para manter as células em crescimento exponencial.

Os valores de IC50 foram determinados usando um ensaio clonogénico. Resumidamente, 500 células de C30 a partir de uma suspensão de células individuais foram plaqueadas em placas de 60 milímetros de Petri de 24 horas antes do tratamento para permitir a ligação do medicamento de células. No dia do tratamento, o meio foi decantado e substituído com a medicamento e as células tratadas foram colocadas de volta na incubadora a 37 graus C durante 1 hora. Placas em triplicata foram criadas para cada concentração do medicamento. Após o fármaco uma hora tratamento, o medicamento contendo o meio foi decantado e substituído por meio fresco. Estas placas foram devolvidas a 37 graus C incubadora durante 1 semana para a formação de colónias. As colónias foram fixadas e coradas com violeta de cristal a 2% em metanol absoluto. As colónias contendo mais do que 50 células foram contadas. O número de colónias marcados das placas em triplicado foi em média, e este número foi dividido pelo número de células plaqueadas para obter um valor para a fração de células que formam colónias. Estes valores para a fração de células que formam colónias foram então corrigida para a eficiência do plaqueamento, dividindo-os pelo número de células que

formam colónias em placas que não foram tratados com medicamento.

#### EXEMPLO 10

As linhas celulares UMSCC10b (sensíveis à cisplatina) e UMSCC10b/15s (resistentes à cisplatina) derivados cancro de células escamosas da cabeça humana e do pescoço foram linhas obtidas pelo Dr. Stephen B. Howell, da Universidade da Califórnia, San Diego. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 100units/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram semeadas em placas de 24 cavidades com cerca de 20000 células/500 µl de meios em cada poço de placa. As células foram expostas a dach-2 com concentrações variáveis que variam de 1,12 µM a um máximo de 72 µM. As soluções de 2-dach complexo foram preparadas e aliquotas de estas soluções foram adicionados para tornar as concentrações eficazes. As células foram então deixadas a crescer durante 72 horas. Doze concentrações diferentes foram utilizados neste estudo. Cada concentração teve um controlo para um total de 12 controlos.

O CI50 para UMSCC10b (sensíveis à cisplatina) pode ser estimado como sendo inferior a 1,0 µM. Em comparação, o valor de IC50 para a cisplatina é de 17 µM, na mesma linha (Ver Zheng et al., *Clinical Cancer Research*, 1997, 3, 1157-1165). O IC50 para UMS. CC10b/15s (resistentes à cisplatina) foi determinada para ser de 5 µM. A Figura 9 mostra a curva de sobrevivência de células para as linhas de células sensíveis a cisplatina e resistentes à cisplatina.

#### EXEMPLO 11

Ensaio preliminares de expressão de genes que envolvem complexos da presente invenção em comparação com cisplatina (dados não mostrados) foram efectuadas com uma matriz de apoptose contendo 84 genes que inclui o superfamília BCL2, tanto pró-e anti-apoptótica, caspases, o BIR-família, fatores ativador do receptor TNF, p53, e seus congêneres, e fas associada membros por PCR em tempo real. Um olhar mais atento para os dois conjuntos de expressões de genes indica claramente uma série de diferenças nos padrões de expressão. Por exemplo, fas e membros das fas genes superfamília foram superexpressos em células tratadas com 2-dach, enquanto a cisplatina influencia mudanças marginais na expressão destes genes. Especificamente, fas foi sobre-expresso por seis vezes em comparação com o controle, e genes TNFRs como TNFRSF-10B foi superexpressos por 2-3 vezes sobre controlos. Esses fatores recetores últimos pertencem aos fas superfamília. É interessante notar que os membros BCL2 proapoptotico como bak1 e BAX foram superexpressos cerca de 2-3 dobras por Dach-2, enquanto a cisplatina não fez mudanças significativas em sua expressão.

EXEMPLO 12: Acumulação celular de platina e estimativa de platina ligado ao ADN

Conteúdo de platina foi quantitativamente estimada num Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (Perkin Elmer AA-600) a partir de curvas de calibração estabelecidas utilizando cisplatina ou pirodach-2 na água. As células ( $5 \times 10^6$ ) foram semeadas em frascos de T75cm<sup>2</sup>. Após 24h, as células foram então tratadas com diferentes concentrações (0, 10, 20, 30 e 50  $\mu$ M) de cisplatina e pirodach-2. Após 1 h de exposição, com os complexos de platina, o meio contendo o fármaco foi retirado e as

células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato gelada (PBS). As células foram então tratadas com tripsina e centrifugadas num sedimento. Os sedimentos celulares foram digeridos em HNO<sub>3</sub> concentrado e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antes da análise, de acordo com o método de McGahan. Os dados apresentados na Tabela 4 foram coletados de três ensaios independentes, cada um foi realizado em duplicata. Para a acumulação de cisplatina, os dados foram obtidos a partir de ensaios em triplicado a partir de uma única amostra a uma dada concentração.

Para medições de ADN-Pt,  $1,0 \times 10^7$  células foram semeadas em frascos de T75cm<sup>2</sup>. Após 24 horas, os complexos de platina foram adicionadas em diferentes concentrações de 0, 10, 20, 30 e 50 µM. As células foram tratadas com os complexos de platina durante 24 horas. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS gelado. As células foram tripsinizadas e centrifugada num sedimento. O ADN foi extraído usando um kit de purificação de ADN Wizard® SV (Promega). O ADN foi quantitativamente estimada a partir da absorção a 260 nm, utilizando um instrumento de UV-Vis NanoDrop.

#### EXEMPLO 13: Ligação de platina no ADN por RMN

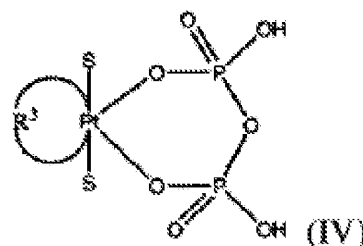
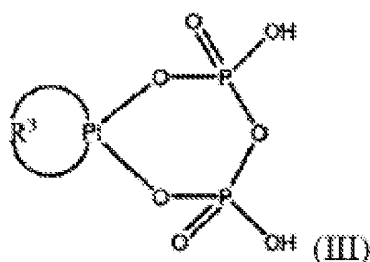
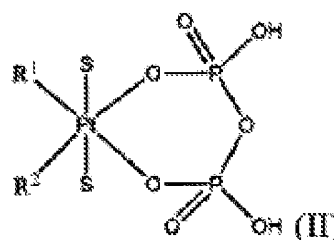
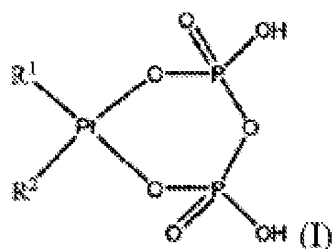
Ensaio de espectroscopia de RMN do protão foram realizados num instrumento Bruker 500 MHz RMN em 99% (átomo) D<sub>2</sub>O, com uma sequência de pulsos de supressão de água. As amostras continham cisplatina (2,0 mM) ou pirodach-2 (2,0 mM) e nucleotídeos (5'-dGMP, 5'-dAMP, dGpG (5,0 mM)), e dupla cadeia de ADN (timo de vitela, 5,0 mM) um pH 7,0 mantido por tampões de fosfato e de carbonato (10-20 mM). Reacções de cisplatina (0,25 mM) e pirodach-2 (0,25 mM) com um 25-mero sintético: 5'-ATGATTTAGGTGACACTATAGCAGT-3' (0,25 mM)

foram também realizadas sob condições idênticas. As reações foram efetuadas até 7 dias, e de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  Os espectros de RMN foram registados em intervalos de tempo regulares. Normalmente, uma largura de pulso de 5 s m com um atraso de repetição de 1,0 s foi utilizado para as medições. Tipicamente, uma amplitude de varrimento de 10,000 Hz e 32 K pontos de dados foram selecionados para recolher a indução deteriora gratuito. Um fator de ampliação da linha 1 Hz foi aplicado para a transformação de Fourier. Os deslocamentos químicos, com referência ao pico HOD, estão em 4,67 ppm.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição para utilização num método de tratamento do cancro, compreendendo:

um ou mais complexos de platina (II) ou (IV) monomérica isolados de acordo com as fórmulas I, II, III e IV:



em que cada  $R^1$  e  $R^2$ , independentemente, seleccionados a partir de  $NH_3$ , e substituídos ou não substituídos aminas alifáticas; em que cada  $R^3$  é seleccionado a partir de aminas alifáticas substituídos ou não substituídos;

em que, quando  $R^1$  e  $R^2$  representa  $NH_3$ , o outro  $R^1$  e  $R^2$  não é  $NH_3$ ; e

em que cada S é independentemente seleccionado a partir de hidróxido, ácido acético, ácido butírico, e  $\alpha$ -hidroxiácidos; ou

cis-diamina-trans-dihidroxi(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV) monoméricas isoladas, ou sais farmacologicamente aceitáveis destes.

2. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, em que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são cada um independentemente selecionados a partir de NH<sup>3</sup>, metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, e amina de ciclo-hexano.

3. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, em que R<sup>3</sup> é selecionado a partir de etilenodiamina e hexanodiamina.

4. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, em que o complexo de platina monomérica isolada é:

1,2-etanodiamina (dihidrogénio pirofosfato) platina (II), ou  
(trans-1,2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II), ou  
cis-diamina-trans-dihidroxi (dihidrogénio pirofosfato) platina (IV), ou  
1,2-etanodiamina-trans-(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV), ou  
(trans-1,2-ciclo-hexanodiamina)-trans-dihidroxi (dihidrogénio pirofosfato) platina (IV).

5. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, em que o complexo de platina monomérica isolado é (trans-1, 2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II).

6. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, em que o complexo de platina monomérica isolado é (trans-1,2-ciclo-hexanodiamina)-trans-dihidroxi-(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV).

7. Uma composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1, que compreende um ou mais complexos de platina monoméricas isolados selecionados a partir de

- (i) cis-diamina-trans-dihidroxi(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV);
- (ii) 1,2-etanodiamina (pirofosfato dihidrogénio) platina (II);
- (iii) 1,2-etanodiamina-trans-dihidroxi (pirofosfato dihidrogénio) platina (IV);
- (iv) (trans-1, 2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II);
- (v) trans-1,2-ciclo-hexanodiamina) - -dihydroxo trans (dihidrogénio pirofosfato) platina (IV); e
- (vi) os seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

8. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 7, em que o complexo de platina monomérica isolada é estável em solução aquosa a um pH entre cerca de 6 a cerca de 8.

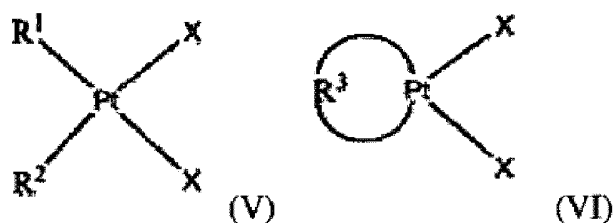
9. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 7, em que o complexo de platina monomérica isolada não se liga ao ADN.

10. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 7, em que o complexo de platina monomérica isolada desencadeia a sobre-expressão de fas e de fatores de transcrição relacionados com fas, ou de genes pró-apoptóticos.

11. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 10, em que os genes pró-apoptóticos são Bak e Bax.

12. Um método de preparação de um complexo de platina (II) monomérico isolado compreendendo:

(i) a manutenção de uma mistura aquosa de reação que compreende o excesso de pirofosfato e um complexo de platina de acordo com a fórmula V ou VI:



em que cada R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> é independentemente selecionado a partir de NH<sub>3</sub>, e aminas alifáticas substituídas ou não substituídas ou,

em que R<sup>3</sup> é selecionado a partir de aminas alifáticas substituídos ou não substituídos; e

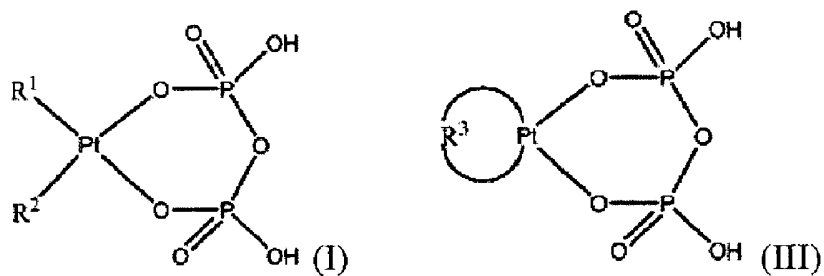
em que X é selecionado independentemente a partir de halogéneos;

a uma temperatura de cerca de 30 a cerca de 60 graus Celsius durante um período de cerca de 12 a cerca de 18 horas a um pH de cerca de 7 a cerca de 9;

(ii) subsequentemente, se concentrar a mistura de reação aquosa, tal que os precipitados de pirofosfatos não formam;

(iii) a rápida redução do pH da mistura de reação para um valor de pH inferior a 2 por adição de um ácido;

em que, a platina monomérica complexo (II) isolado tem uma fórmula I ou III:



em que cada  $R^1$  e  $R^2$  é independentemente selecionado a partir de  $NH_3$ , e alifático substituído ou não substituído aminas;

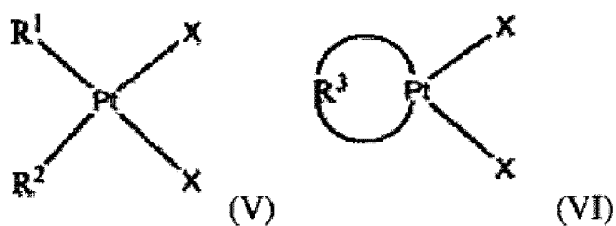
em que  $R^3$  é selecionado a partir de diaminas alifáticos substituídos ou não substituídos; e

em que o complexo de platina monomérica isolada é estável em solução aquosa a um pH entre cerca de 6 a cerca de 9.

13. O método da reivindicação 12, em que o complexo de platina monomérico isolado preparado é (trans-1,2-ciclohexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II).

14. Um método de preparação de um monomérico isolado platina (IV) complexo compreendendo:

(i) a manutenção de uma mistura aquosa de reação que compreende o excesso de pirofosfato e um complexo de platina de acordo com a fórmula V ou VI:



em que cada  $R^1$  e  $R^2$  é independentemente selecionado a partir de  $NH_3$ , e substituído ou aminas alifáticas não substituídos,

em que  $R_3$  é selecionado a partir de aminas alifáticos substituídos ou não substituídos, e

em que  $X$  é selecionado independentemente a partir de átomos de halogéneo;

a uma temperatura de cerca de 30 a cerca de 60 graus Celsius durante um período de cerca de 12 a cerca de 18 horas a um pH de cerca de 7 a cerca de 9;

- (ii) a adição à mistura de reação de peróxido de hidrogénio, e opcionalmente, um reagente selecionado a partir do grupo de sais de acetato, sais de butirato, e sais de  $\alpha$ -hidroxiácidos e as suas combinações;
- (iii) subseqüentemente, se concentrar a mistura de reação aquosa, tal que os precipitados de pirofosfato não formam;
- (iv) a rápida redução do pH da mistura de reação para um valor de pH inferior a 2 por adição de ácido nítrico;

em que a platina monomérica isolado (IV) tem uma fórmula de II ou IV:

em que cada  $R^1$  e  $R^2$  é independentemente selecionado a partir de  $NH_3$ , e alifático substituído ou não substituído aminas;

em que  $R_3$  é selecionado a partir de aminas alifáticos substituídos ou não substituídos;

em que cada  $s$  é independentemente selecionado a partir de hidróxido, ácido acético, ácido butírico, e alfa-hidroxiácidos; e

em que o complexo de platina monomérica isolada é estável em solução aquosa a um pH entre cerca de 6 a cerca de 9.

15. O método da reivindicação 12 ou reivindicação 14, em que a temperatura é de 40 graus Celsius e o tempo de reação é de 15 horas e o pH situa-se entre 7 e 8.

16. O método da reivindicação 12 ou reivindicação 14, que compreende ainda o arrefecimento da mistura de reação a uma temperatura de entre 5 graus Celsius da temperatura ambiente e depois de se concentrar a mistura de reação, ou depois de redução do pH da mistura de reação.

17. O método da reivindicação 14, em que o reagente opcional adicionado em conjunto com peróxido de hidrogénio antes da concentração da mistura de reação é selecionado a partir de acetato de sódio, o butirato de sódio, e sais de sódio de  $\alpha$ -hidroxiácidos, ou a partir de acetato de potássio, butirato de potássio, e de sais potássio de  $\alpha$ -hidroxiácidos.

18. O método da reivindicação 14, em que o peróxido de hidrogénio é a uma concentração inicial de 30% de volume/volume

19. O método da reivindicação 14, em que o complexo de platina monomérica isolado preparado é:

cis-diamina-trans-dihidroxi(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV), ou  
1,2-etanodiamina-trans-dihidroxi (pirofosfato dihidrogénio) platina (IV), ou (trans-1,2-ciclohexanodiamina)-trans-(dihidrogénio pirofosfato) platina (IV);

20. Uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um complexo de platina isolado monomérico selecionado de diamina (pirofosfato dihidrogénio) platina (II) e os complexos de acordo com a reivindicação 1 e pelo menos um transportador farmacologicamente aceitável, diluente, adjuvante, ou veículo, para utilização em um método de tratamento de cancro que é resistente a um ou mais agentes antineoplásicos selecionados de entre cisplatina, carboplatina, e oxaliplatina.

21. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 20, em que o cancro é selecionado a partir do testículo, pulmão de células pequenas, e cancros da cabeça e do pescoço.

22. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 20, em que o cancro é do ovário.

23. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de qualquer uma das reivindicações 20 a 22, em que o complexo de platina monomérica isolada é tal como definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 4.

24. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 23, em que o complexo de platina monomérica é isolado (trans-1, 2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (II).

25. A composição para utilização num método de tratamento do cancro de acordo com a reivindicação 23, em que o complexo de platina monomérica isolada é trans-1,2-ciclo-hexanodiamina) (dihidrogénio pirofosfato) platina (IV)

## RESUMO

### **FOSFOPLATINAS E A SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCROS RESISTENTES À CISPLANTINA E CARBOPLATINA**

A presente invenção proporciona, fosfoplatinas complexos de fosfato monoméricos isolados de platina (II) e (IV) isolados e os métodos de utilização dos mesmos para o tratamento de cancros, incluindo cisplatina - e cancros resistentes à carboplatina. Ao contrário da cisplatina, estes complexos não são facilmente sujeitos a hidrólise e são bastante solúveis e estáveis em soluções aquosas. Além disso, estes complexos - ao contrário da cisplatina, carboplatina, e agentes anti cancro à base de platina relacionados - não se ligam ao ADN. Em vez disso, os dados sugerem que as fosfoplatinas desencadeiam a superexpressão de fas e fas relacionadas com fatores de transcrição e alguns genes pró-apoptóticos como Bak e Bax. No entanto, os complexos apresentam uma tremenda citotoxicidade para as células cancerosas. Assim, o presente invento proporciona agentes anticancerígenos de platina novos que possuem um alvo molecular diferente do que aqueles na técnica.

Figura 1

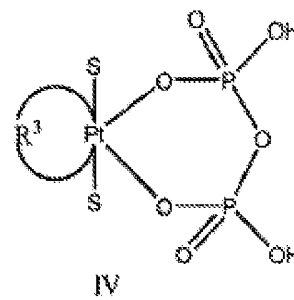
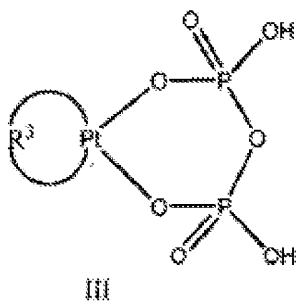
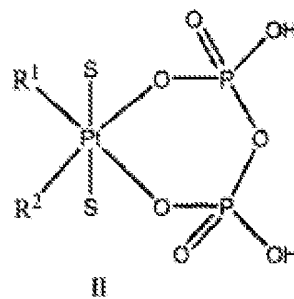
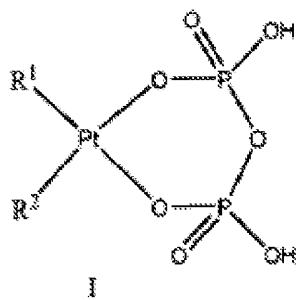


Figura 2

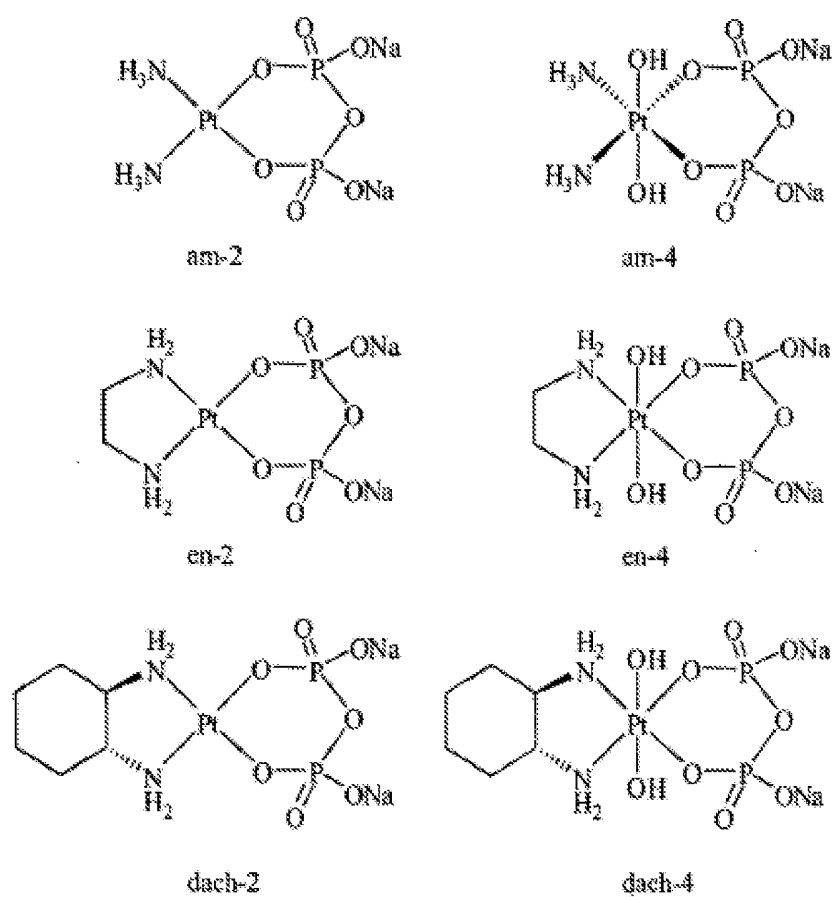


Figura 3

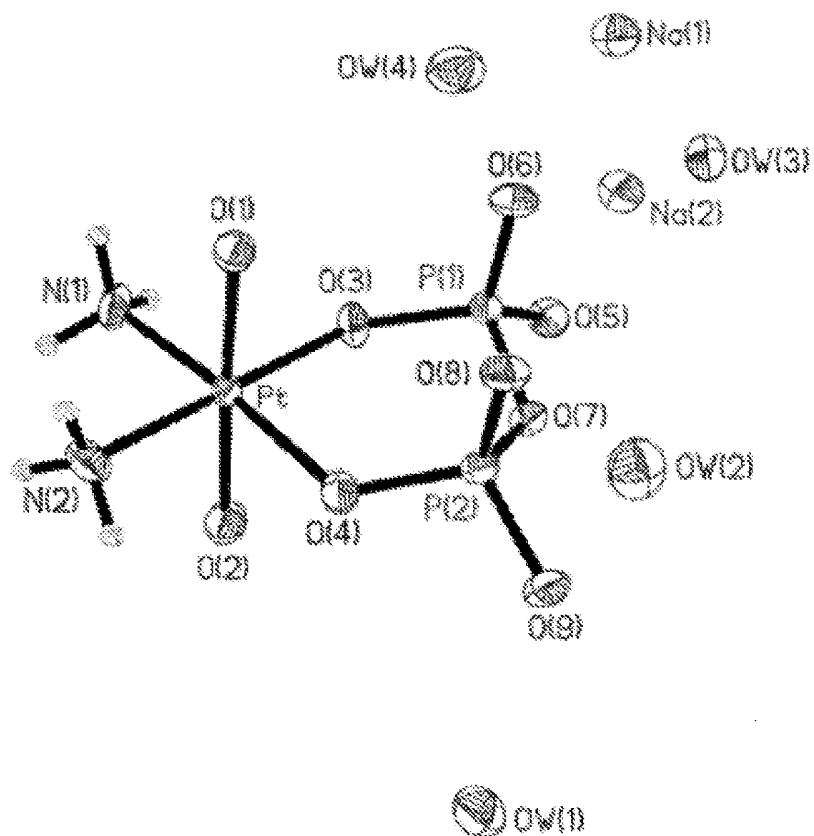


Figura 4

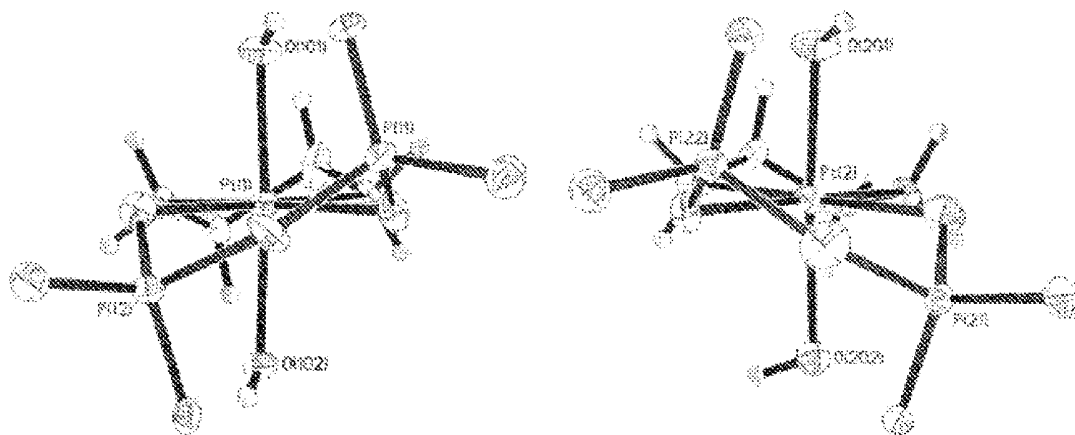


Figura 5

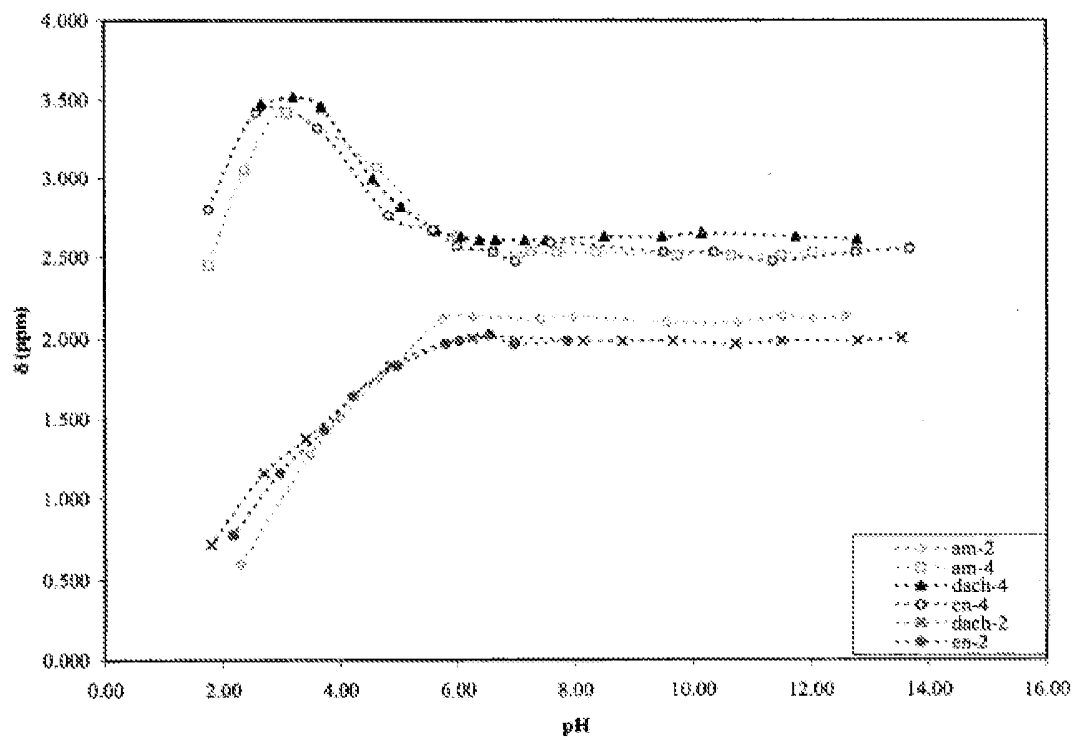
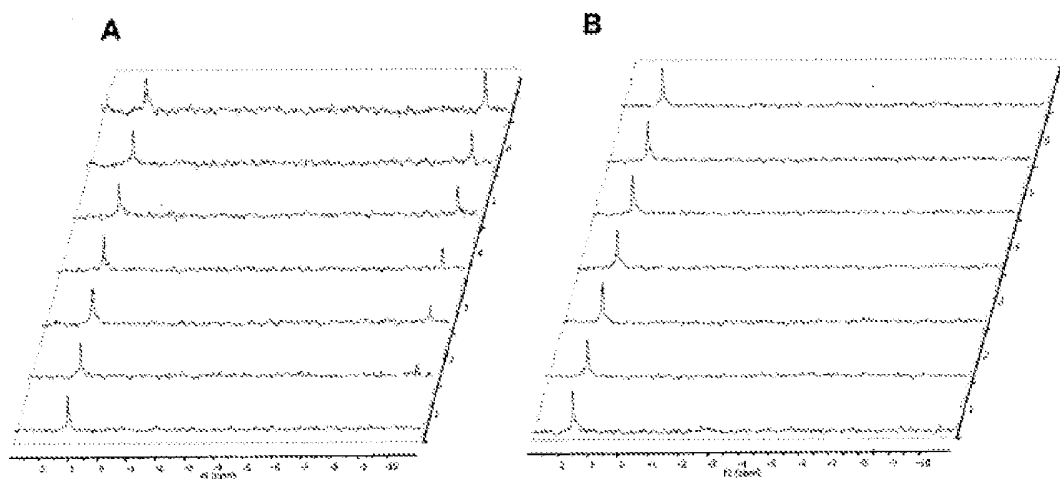


Figura 6



Concentração de fármaco  $\mu\text{M}$

Figura 7

Células A2780/C30

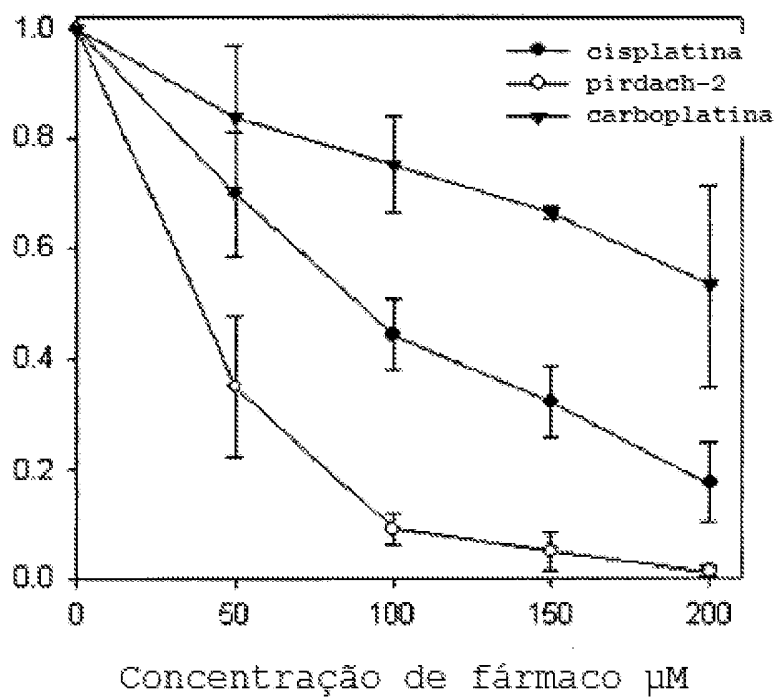


Figura 8

Células A2780.

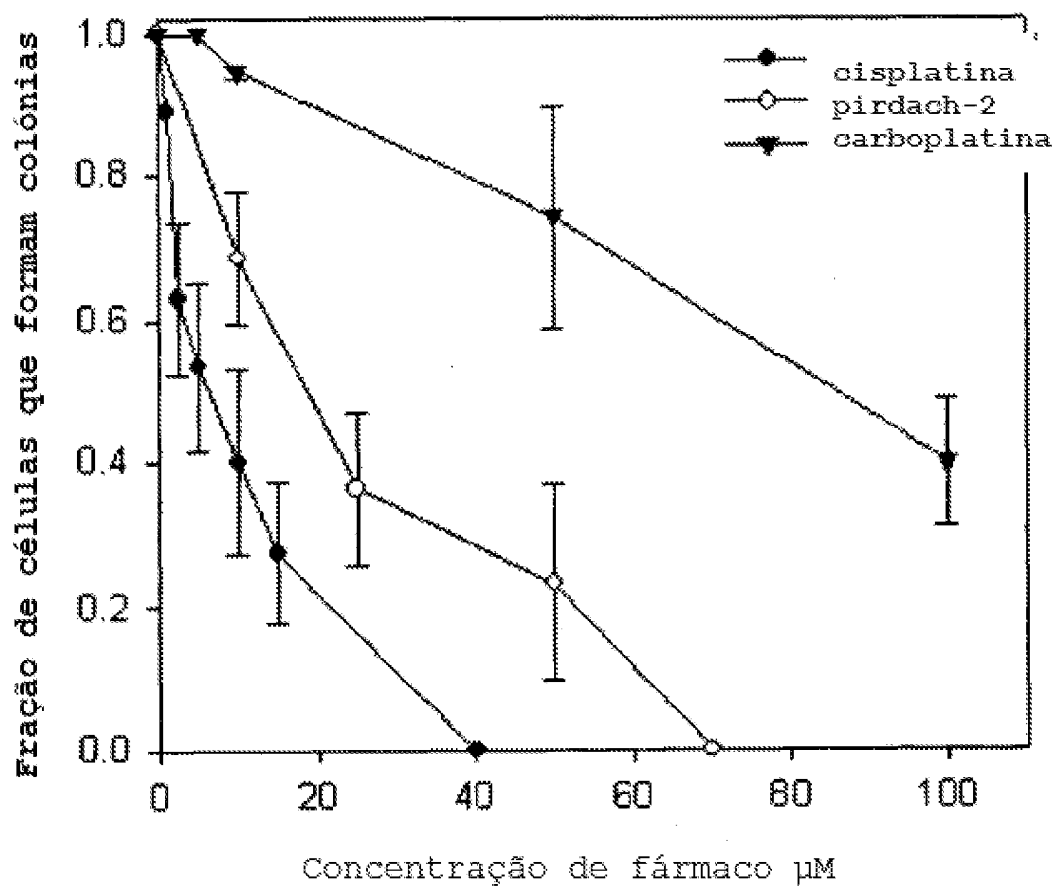


Figura 9

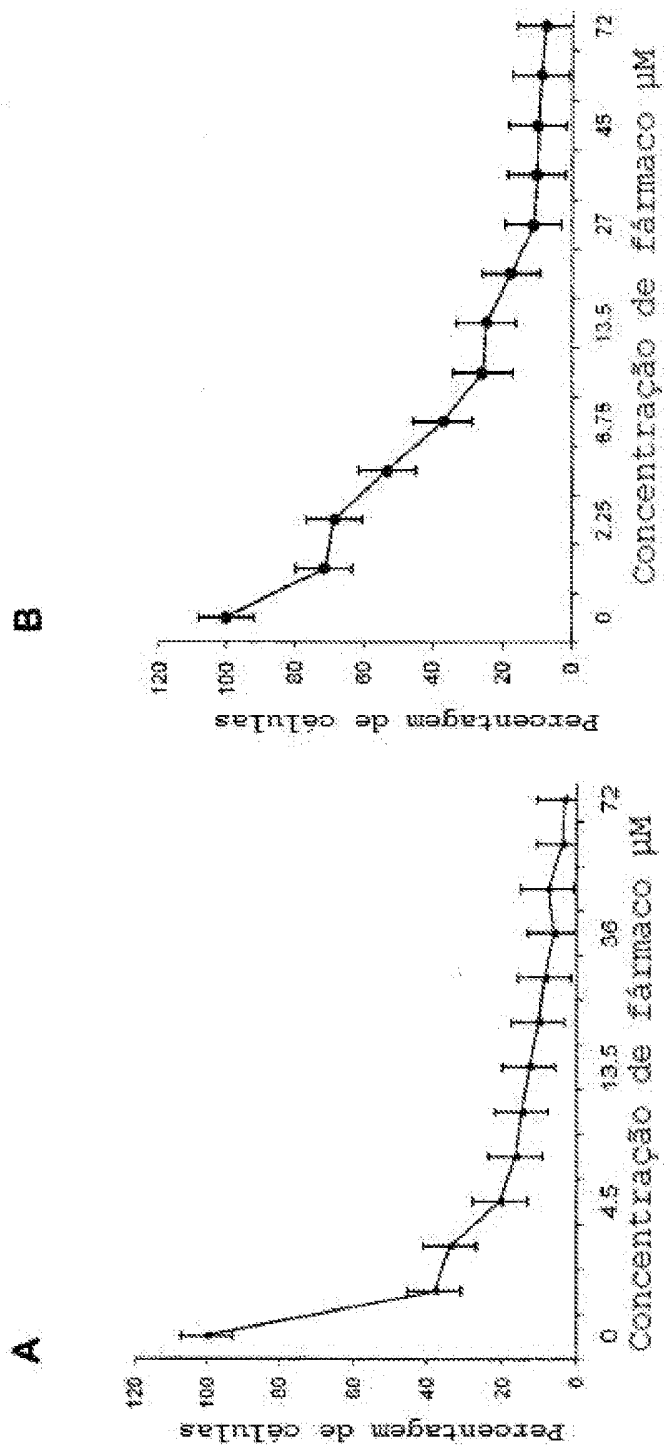


Figura 10

## Acumulação celular de platina

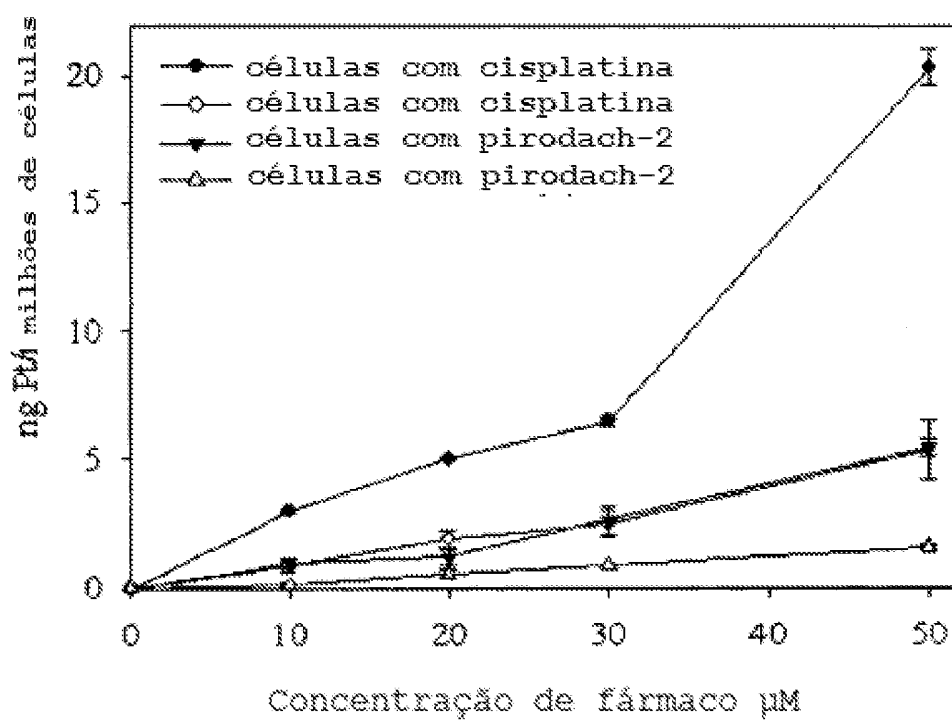


Figura 11

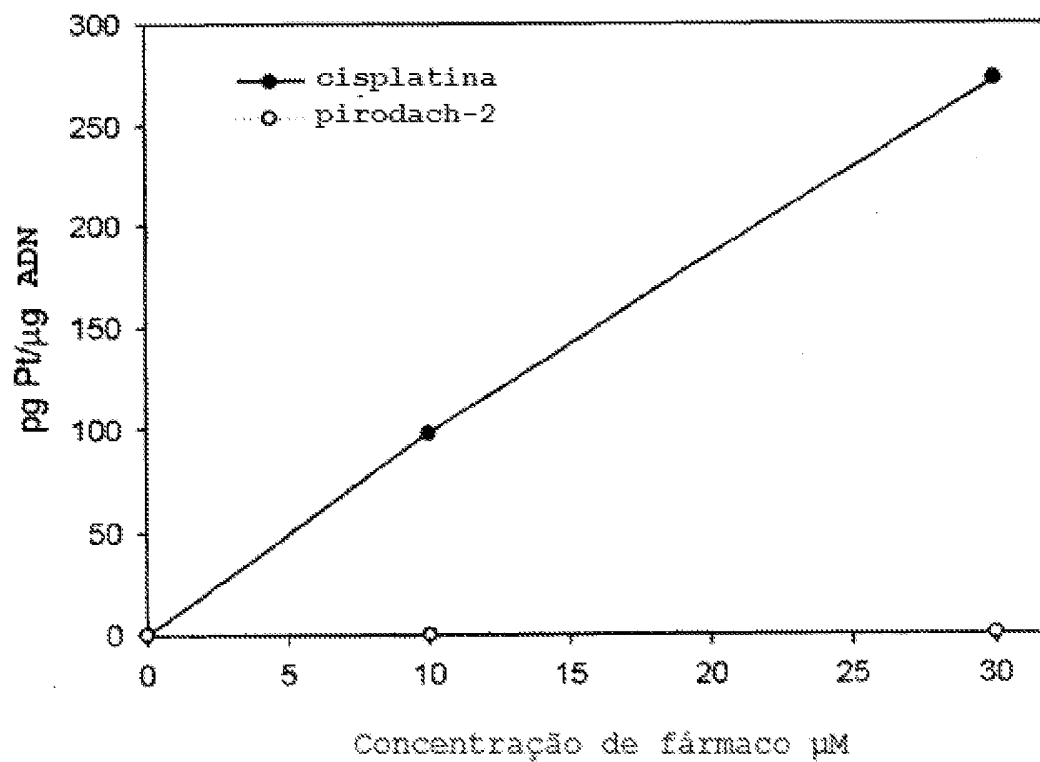


Figura 12

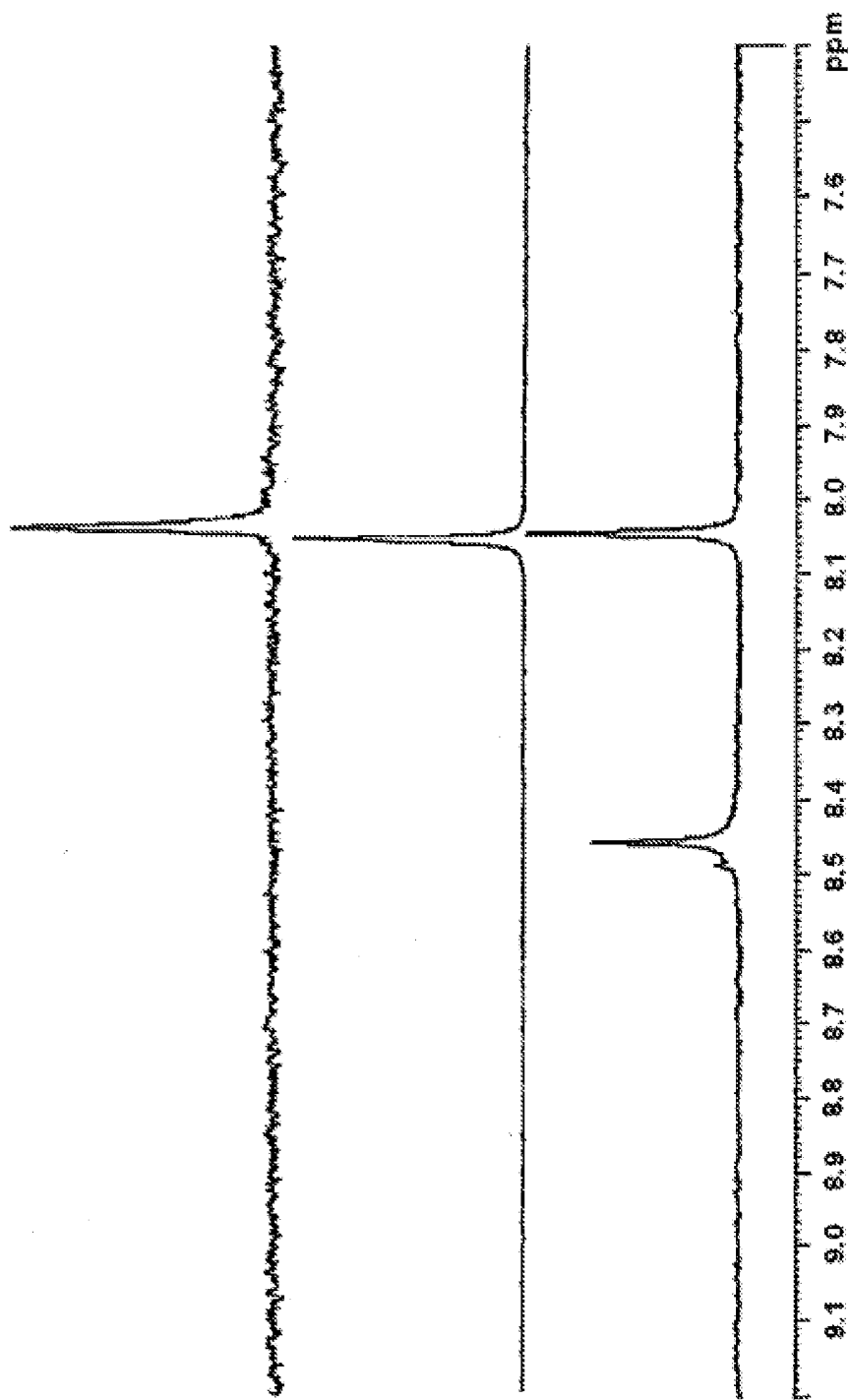


Figura 13

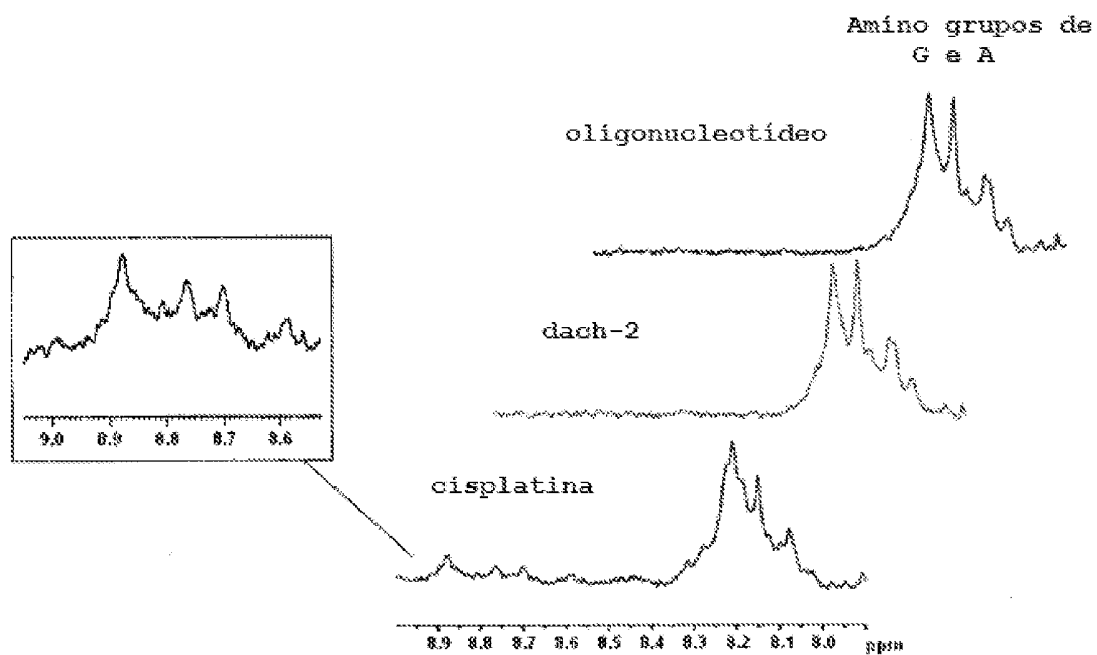
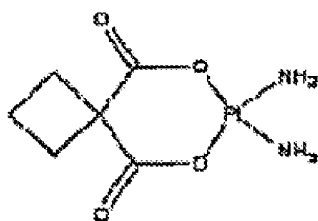
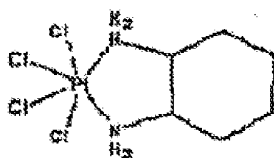


Figura 14



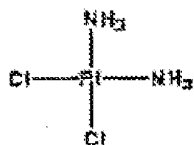
carboplatina



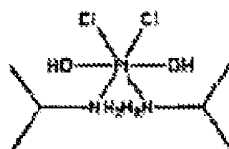
ormaplatina  
tetraplatina



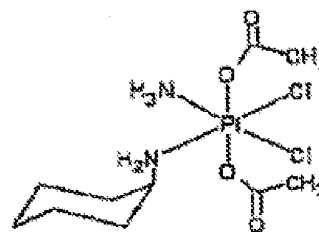
oxaliplatina



cisplatin  
cis-DDP

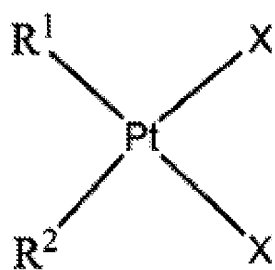


iproplatin  
CHIP

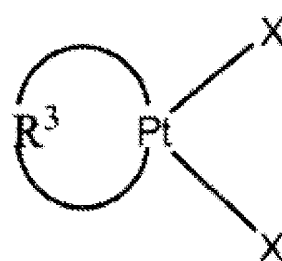


satraplatina  
JM216

Figura 15



V



VI