



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101999900796512
Data Deposito	28/10/1999
Data Pubblicazione	28/04/2001

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	F		

Titolo

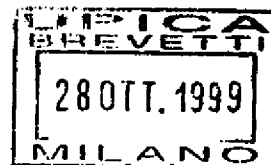
COMPLESSI DI RUTENIO CON ELEVATA ATTIVITA' ANTITUMORALE

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

TITOLO Complessi di Rutenio con elevata attivita' antitumorale.

a nome di: SIGEA s.r.l.

con sede in: Trieste



Inventori designati: Mestroni Giovanni, Alessio Enzo, Sava Gianni, Iengo

Elisabetta, Zorzet Sonia, Bergamo Alberta

depositata il

con n.

MI99 A 002256

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'uso in terapia di una classe di complessi del Rutenio (II), in particolare per il trattamento di tumori caratterizzati da una elevata capacità metastatizzante.

TECNICA ANTERIORE

La ricerca di nuovi composti antitumorali è in continuo sviluppo ed è soprattutto rivolta all'individuazione di nuovi composti con elevata selettività, elevata attività antimetastatica ed in grado di determinare ridotti effetti tossici nell'ospite.

Composti basati su metalli di transizione, quali ad esempio il cisplatino, sono ormai da molti anni in uso per la chemioterapia dei tumori: tali prodotti, sebbene farmacologicamente attivi, hanno ridotta attività antimetastatica e presentano inoltre pesanti effetti collaterali dovuti ad una elevata tossicità sistemica.

Recentemente sono state studiate le potenzialità applicative di alcuni complessi del Rutenio (II) con attività citotossica e quindi con potenziali

applicazioni nel campo della terapia di malattie neoplastiche. Purtroppo anche tali composti, pur mostrando un maggior tropismo per i tumori rispetto ai derivati del cisplatino (Sava et al, *Anticancer Res* 11, 1103, 1991), risultano tossici per l'organismo.

Al fine di migliorare i problemi relativi all'attività ed alla tossicità, sono stati proposti nuovi complessi di Rutenio (III) quali pro-farmaci più attivi e meno tossici (Sava et al, *Anticancer Res* 11, 1103, 1991, Sava et al. in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, 143, 1999) per i quali è stato ipotizzato un meccanismo di attivazione "in vivo" mediante riduzione dei complessi di Rutenio (III) alla corrispondente specie reattiva Rutenio (II). Tale meccanismo risulterebbe essere più efficiente nell'ambiente ipossico e riducente che si crea nel tessuto tumorale, il che permetterebbe di spiegare l'elevata selettività ed attività dei complessi di Rutenio (III) verso i tumori solidi (Sava et al, *Anticancer Res* 11, 1103, 1991, Sava et al. in *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, 143, 1999). Il processo di riduzione avverrebbe infatti in minor quantità nei tessuti sani normalmente vascolarizzati dove la pressione parziale di ossigeno è maggiore (40 mmHg) di quella del tessuto tumorale (5 mmHg). Nel tessuto tumorale si formerebbe quindi un quantitativo maggiore della specie più attiva e tossica di Rutenio (II) rispetto ai tessuti sani, con un accumulo risultante in una azione citotossica selettiva verso il tumore solido.

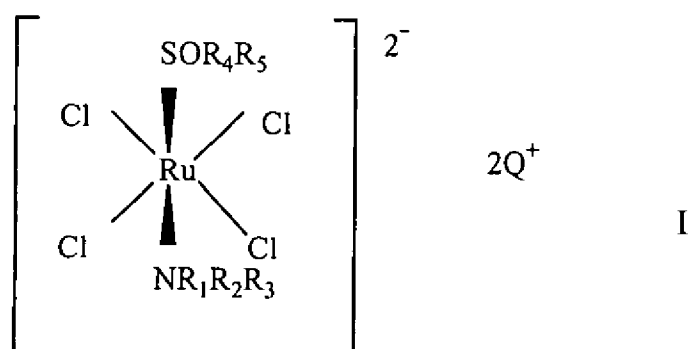
Tra i suddetti complessi del Rutenio (III) si ricordano l' $\text{ImH}[\text{trans-RuCl}_4\text{Im}_2]$, (B.K. Keppler et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111: 166-

168, 1986), i complessi del tipo $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})(\text{L})]$ (WO90/13553) che si sono dimostrati efficaci nel rallentare la crescita del tumore primario, ed i più recenti complessi del tipo $(\text{LH})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})(\text{L})]$ (WO98/00431) che risultano possedere una spiccata attività antimetastatica.

Tuttavia, nonostante i risultati ottenuti nelle applicazioni cliniche in chemioterapia, la ricerca è tuttora aperta anche nel campo dei derivati del rutenio, per individuare nuovi composti con caratteristiche ottimali di citotossicità e selettività nei confronti del tumore e dotati di ridotta tossicità sistemica, tali da rendere il loro impiego in terapia sempre più efficace e sicuro.

SOMMARIO

La presente invenzione riguarda l'uso in terapia di complessi anionici del Rutenio(II) con attività antitumorale e antimetastatica, aventi formula I:



dove

$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$, uguali o diversi tra loro, sono scelti nel gruppo costituito da H, alchile $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineare o ramificato, saturo o insaturo, cicloalchile $\text{C}_3\text{-C}_7$, arile;

oppure $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo azotato a 5-7 membri, saturo o insaturo, contenente eventualmente 1 o più atomi di O, S, N, o N sostituito con un residuo alchilico, arilico o benzilico; detto eterociclo azotato può essere eventualmente benzocondensato e/o sostituito con C_1 - C_4 alchile, C_1 - C_4 alcossile, C_1 - C_4 alchiltio, arile o benzile;

il controione Q^+ è rappresentato da $^+NHR_1R_2R_3$, dove R_1 , R_2 , R_3 mantengono le definizioni date in precedenza;

R_4 ed R_5 , uguali o diversi tra loro, sono scelti nel gruppo costituito da H, alchile C_1 - C_6 , cicloalchile C_3 - C_7 , arile; oppure R_4 ed R_5 formano, insieme all'atomo di S a cui sono legati, un eterociclo a 4-7 membri.

La Richiedente ha sorprendentemente osservato che i complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione, mostrano attività antitumorali inaspettate in termini di attività e di indice terapeutico.

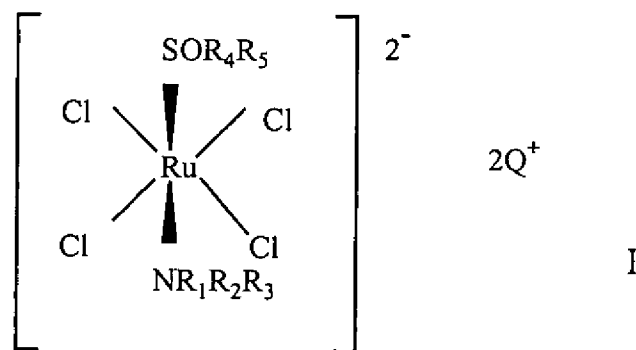
Un ulteriore aspetto della presente invenzione è rappresentato quindi da composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo il complesso di Rutenio (II) di formula I, in associazione con opportuni eccipienti e/o diluenti e/o stabilizzanti.

In una sua ulteriore applicazione, l'invenzione comprende un kit per la preparazione estemporanea del complesso di Rutenio (II) di formula I.

In particolare l'uso del composto secondo l'invenzione, è risultato particolarmente vantaggioso nei confronti di tumori solidi caratterizzati da un elevato potere metastatizzante.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Un primo oggetto della presente invenzione è l'uso a scopo terapeutico di complessi di Rutenio (II) di formula I:



dove il significato dei gruppi R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 e Q^+ è di seguito indicato.

I gruppi R_1 , R_2 , R_3 , uguali o diversi tra loro, sono scelti nel gruppo costituito da H, alchile $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineare o ramificato, saturo o insaturo, cicloalchile $\text{C}_3\text{-C}_7$, arile;

oppure $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ è un eterociclo azotato a 5-7 membri, saturo o insaturo, contenente eventualmente 1 o più atomi di O, S, N, o N sostituito con un residuo alchilico, arilico o benzilico; detto eterociclo azotato può essere eventualmente benzocondensato e/o sostituito con $\text{C}_1\text{-C}_4$ alchile, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcossile, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alchiltio, arile o benzile.

Quando $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ è un eterociclo azotato a 5 membri esso è scelto preferibilmente nel gruppo costituito da imidazolo, N-metil imidazolo, pirazolo ed ossalazolo; ancora più preferibilmente detto eterociclo azotato è imidazolo.

Quando $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ è un eterociclo a 6 membri, esso è scelto preferibilmente nel gruppo costituito da piridina, 3,5-lutidina e 4-metil-piridina.

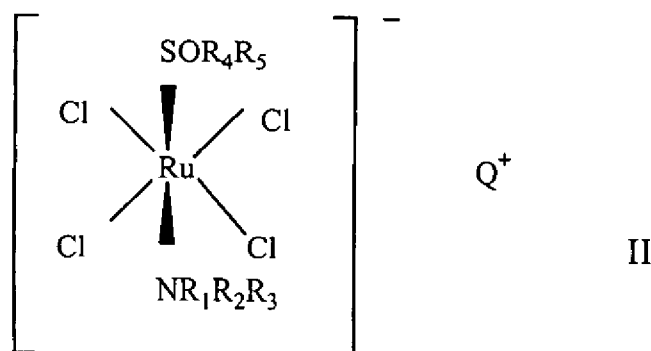
Quando $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo a 7 membri, esso è scelto preferibilmente nel gruppo costituito da azepina, diazepina ed ossazepina.

Infine quando detto eterociclo è benzocondensato, esso è scelto preferibilmente nel gruppo costituito da indazolo, isochinolina, benzimidazolo e 1,5,6-trimetil-benzimidazolo.

Nei complessi dell'invenzione, Q^+ rappresenta un gruppo azotato $NH^+R_1R_2R_3$, dove R_1 , R_2 ed R_3 mantengono il significato sopra assegnato.

Nel complesso secondo l'invenzione, il legante solfossidico R_4-SO-R_5 ha R_4 ed R_5 , uguali o diversi tra loro, scelti nel gruppo costituito da H, alchile C_1-C_6 , cicloalchile C_3-C_7 , arile; oppure R_4 ed R_5 formano, insieme all'atomo di S a cui sono legati, un eterociclo a 4-7 membri. Nei complessi secondo l'invenzione il legante solfossidico R_4-SO-R_5 è preferibilmente dimetilsolfossido ($R_4=R_5=metile$) o dietilsolfossido ($R_4=R_5=etile$).

Tali prodotti sono ottenibili per riduzione dei corrispondenti complessi di Rutenio (III), dove con corrispondente complesso di Rutenio (III) e' inteso un composto di formula II così definita:



dove i gruppi R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 e Q^* mantengono la definizione data in precedenza. I composti di formula II sono ottenibili come descritto nella domanda WO 98/00431, qui incorporata per riferimento.

I complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione risultano sorprendentemente più attivi dei complessi di Rutenio (II) noti e dei corrispondenti composti di Rutenio (III) di formula II, nonché inaspettatamente meno tossici sia degli uni che degli altri.

Ulteriore aspetto della presente invenzione è rappresentato quindi da composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo il complesso di Rutenio (II) di formula I, in associazione con opportuni eccipienti, diluenti o stabilizzanti farmacologicamente accettabili.

Le composizioni farmaceutiche possono essere in forma di soluzione o sospensione, oppure in forma di gel crema, polvere granulare, compressa, confetto capsula o inserto.

Le composizioni farmaceutiche secondo l'invenzione possono contenere oltre al composto di formula I anche uno o più farmaci antitumorali, quali ad esempio il cisplatino, la vincristina, la vinblastina, il 5-fluorouracile, la ciclofosfamide, la bleomicina, le antracicline, il taxolo o altri complessi di Rutenio. Preferibilmente, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono preparate al momento dell'uso per riduzione dei corrispondenti complessi di Rutenio (III) di formula II con agenti riducenti, preferibilmente scelti nel gruppo di riducenti fisiologicamente compatibili. Al fine di assicurare una effettiva riduzione, tali riducenti vengono selezionati tra quelli aventi un potenziale redox tale che la somma dei

due semipotenziati (potenziale di riduzione del complesso più potenziale del riducente cambiato di segno) sia positiva. Per le misure di potenziale si fa riferimento alla pubblicazione di Alessio et al. *Inorganica Chimica Acta*, 1993, 203:205-217. Preferibilmente gli agenti riducenti fisiologicamente compatibili sono scelti tra acido ascorbico, cisteina e glutathione.

La riduzione avviene utilizzando un rapporto di equivalenti tra il complesso di Rutenio (III) e l'agente riducente, compreso tra 5:1 e 1:2. (Il numero di equivalenti di una sostanza partecipante ad una reazione di ossido-riduzione, si ottiene dividendo i grammi di detta sostanza per il suo peso-equivalente. A sua volta il peso-equivalente si ottiene dividendo il peso molecolare della sostanza per la variazione del numero di ossidazione).

Preferibilmente il rapporto di equivalenti del complesso di Rutenio III e l'agente riducente è pari a 1. In tali condizioni la riduzione di Rutenio (III) a Rutenio (II) è completa ed immediata.

In alternativa la riduzione del complesso di Rutenio (III) di formula II può avvenire in presenza di riducenti inorganici come ad esempio Sn^{2+} oppure Ce^{3+} , oppure per via elettrochimica, oppure ancora in presenza di H_2 .

In una sua ulteriore applicazione, l'invenzione comprende un kit per la preparazione del complesso di Rutenio (II) di formula I, a due componenti, dove il primo componente è il corrispondente complesso di Rutenio (III) di formula II ed il secondo componente è un agente

riducente come sopra definito. I due componenti del kit sono sotto forma di soluzioni presenti in contenitori separati da miscelarsi al momento dell'uso, oppure sono in forma solida come composti singoli da solubilizzare con opportuno solvente al momento dell'uso; oppure il kit e' costituito da due contenitori da miscelare al momento dell'uso, ove il primo contiene il composto di formula II premiscelato a secco con il riducente, ed il secondo contiene il solvente. I solventi utilizzati per la preparazione della soluzione del complesso di Rutenio (III) e di quella dell'agente riducente, sono solventi acquosi, quali soluzione isotoniche di NaCl 0.9%, oppure soluzioni tamponate quali tampone fosfato, tampone citrato ecc. e sono preferibilmente uguali tra loro. Preferibilmente, il complesso di Rutenio (III) di formula II è disciolto in soluzione acquosa ad una concentrazione compresa tra 0.1 e 20 g/l e ad un pH compreso tra 3-8.

In un suo ulteriore ed ultimo aspetto l'invenzione si riferisce all'uso di un complesso di Rutenio (II) di formula I per la preparazione di farmaci di utilizzo nella prevenzione e nella cura dei tumori e delle metastasi. L'uso dei composti secondo l'invenzione, è risultato particolarmente vantaggioso nei confronti di tumori solidi, in particolare di quelli caratterizzati da elevata capacita' metastatizzante, appartenenti al gruppo di carcinomi del colon o del tubo digerente, o da carcinomi mammari, da tumori polmonari oppure da metastasi polmonari di tumori altamente invasivi.



La somministrazione avviene preferibilmente per via parenterale, orale topica o transdermica. Preferibilmente il complesso di Rutenio (II) viene preparato al momento dell'uso o poco prima della somministrazione mediante miscelazione del corrispondente complesso di Rutenio (III) con un agente riducente, come descritto in precedenza.

Preferibilmente l'agente riducente è scelto tra: acido ascorbico, cisteina, glutathione. La miscelazione può essere effettuata mediante blanda agitazione meccanica, oppure mediante altro mezzo noto al tecnico del ramo.

A scopo illustrativo, ma non limitante della presente invenzione, vengono riportati i seguenti esempi.

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione di complessi di Rutenio (II) di formula I

ESEMPIO 1. Preparazione del complesso di Rutenio (II) mediante riduzione del {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Im)}ImH (Im=imidazolo) con acido ascorbico.

Ad una soluzione in NaCl 0.15 M tamponata a pH=7.2, del complesso {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Im)}(ImH) (10g/L) si aggiunge una quantità equivalente di acido ascorbico. Immediatamente dopo il mescolamento, la soluzione ottenuta viene analizzata mediante ¹H-NMR. Lo spettro registrato evidenzia la totale riduzione del nucleo di Rutenio (III) a Rutenio (II), con una cinetica di reazione estremamente veloce.

Il fatto che il segnale del Me₂SO coordinato con il rutenio si legge a 3.60 ppm, (mentre il segnale del Me₂SO coordinato con il complesso di

Rutenio (III) deve essere a -15ppm) e la sua larghezza spettrale è pari a 3Hz (mentre il corrispondente valore nello spettro del complesso di Rutenio (III) deve essere 370Hz) dimostrano la conversione del nucleo di Rutenio da paramagnetico a diamagnetico.

Nello spettro si osservano inoltre i segnali dell'imidazolo coordinato (8.53 ppm, H2; 7.83 e 7.54 ppm H4,H5) e quelli dell'imidazolio libero (8.46 ppm (H2) e 7.39 (H4,H5). I segnali a 4.83, 4.67, 4.35 ppm corrispondono ai segnali dell'acido ascorbico ossidato.

Sulla base di queste informazioni risulta che la riduzione del complesso di Rutenio (III) ha prodotto la specie dianionica: {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Im)}²⁻, corrispondente a Rutenio (II).

ESEMPIO 2. Preparazione del complesso di Rutenio (II) mediante riduzione del {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Pyz)}PyzH (Pyz=pirazina) con acido ascorbico.

Ad una soluzione acquosa del complesso di Rutenio (III) {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Pyz)}PyzH in tampone fosfato 0.1 M, pH=7.4 si aggiunge una quantità equivalente (1:1) di acido ascorbico. Immediatamente dopo il mescolamento, la soluzione ottenuta viene analizzata mediante 1H-NMR. Lo spettro registrato evidenzia la totale riduzione del nucleo di Ru(III) a Ru(II) secondo quanto visto nell'esempio precedente. La coppia di multipletti a 9.66 e 8.70 ppm dello spettro evidenziano la presenza della pirazina coordinata al rutenio della specie dianionica {trans-RuCl₄(Me₂SO)(pyz)}²⁻. I segnali del PyzH⁺ libero vengono letti a 8.69 ppm. I protoni del Me₂SO coordinato al Rutenio (II) risuonano nell'intorno

di 3.65 ppm.

ESEMPIO 3. Preparazione del complesso di Rutenio (II) mediante riduzione del {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Im)}ImH con acido ascorbico (rapporto di equivalenti = 2.5:1).

Si prepara una soluzione in acqua del complesso di Rutenio {trans-RuCl₄(Me₂SO)(Im)}ImH (1,832 g/L) contenente acido ascorbico (1.41 10⁻² g/L). Immediatamente dopo il mescolamento, la soluzione viene trasferita in una cella di quarzo (cammino ottico: 1cm) e si registrano gli spettri UV/VIS a intervalli di tempo definiti. La diminuzione di assorbanza (Abs) a 390 nm, banda principale di assorbimento del complesso di Rutenio (III) spiega l'avvenuta riduzione del Rutenio (III) a Rutenio (II).

Test di attività biologica

ESEMPIO 4. Test *in vivo* di attività delle composizioni di complessi di Rutenio (II) secondo la presente invenzione su topi affetti da carcinoma mammario MCa: attività di prevenzione della formazione di metastasi polmonari.

Sei gruppi, costituiti ciascuno da 6 topi femmine consanguinee del ceppo CBA/Lac, del peso di 23±3 g, sono stati inoculati il giorno 0 mediante iniezione intramuscolare con una siringa sterile da insulina, con 10⁶ cellule vitali (mediante test di esclusione del Trypan Blue) del carcinoma mammario Mca, in un volume di 0.05 ml di soluzione fisiologica salina di Dulbecco, priva di calcio e magnesio, tamponata a pH 7.4, (D-PBS). Le cellule tumorali provenivano da donatori dello stesso ceppo, ai quali era stato trapiantato lo stesso tumore, con le

medesime procedure, 2 settimane prima. La sospensione di cellule tumorali veniva preparata mediante disaggregazione meccanica in PBS della massa del tumore ottenuta dai topi donatori, e successiva rimozione dei detriti di tessuto e di cellule rispettivamente mediante filtrazione attraverso un doppio strato di garza sterile e successiva centrifugazione a 250xg per 10 min. Gli animali consanguinei provengono da una colonia, ottenuta dal Chester Beatty di Londra (UK) ed allevata nello stabulario dell'Università di Trieste con le procedure per l'allevamento di animali consanguinei. La linea tumorale del carcinoma mammario MCa proviene da una riserva, mantenuta in azoto liquido, di cellule tumorali ottenute originariamente dal Rudjer Boskovic Institute di Zagabria (HR).

Dal giorno 12 al giorno 17, successivi all'impianto del tumore, i sei gruppi di topi sono stati trattati, mediante somministrazione intraperitoneale effettuata con una siringa da insulina sterile, rispettivamente con:

Gruppo 1. Controllo: 10 ml/kg di peso corporeo/die di soluzione fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 2. ASC: 6.69 mg/kg di peso corporeo/die di acido ascorbico in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 3. CIST: 12 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 4. RUT : 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 5. RUT-ASC : 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), $(\text{ImH})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})(\text{Im})]$ e 6.69 mg/kg di peso corporeo/die di acido ascorbico in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 6. RUT-CIST : 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), $(\text{ImH})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})(\text{Im})]$ e 12 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

L'agente riducente (Acido Ascorbico e Cisteina) è stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III). La reazione di riduzione è immediata. La somministrazione avviene dopo controllo analitico della completa riduzione del complesso di Rutenio (III) a Rutenio (II).

Al giorno 17 dall'impianto del tumore, è stata valutata la crescita del tumore primario, asportato chirurgicamente dopo anestesia generale degli animali con Ketamina. La misurazione è stata effettuata mediante misurazione con calibro dei due assi ortogonali del tumore; è stato calcolato il peso in grammi dell'elissoide di rotazione avente tali assi, considerando la densità del tumore pari a 1 e basandosi sulla formula: $(\pi/6) \cdot a^2 \cdot b$, dove a è l'asse minore e b l'asse maggiore.

Al giorno 21 dall'impianto del tumore, i topi sono sacrificati mediante dislocazione cervicale per l'analisi delle metastasi polmonari. I polmoni, rimossi dall'animale immediatamente dopo la sua uccisione, vengono suddivisi nei singoli lobi, i quali vengono esaminati immediatamente

mediante impiego di un microscopio a basso ingrandimento, munito di oculare con griglia graduata, per il rilevamento delle dimensioni delle metastasi delle quali vengono rilevati i due assi ortogonali a e b (con a minore o uguale a b). Le metastasi vengono quindi raggruppate per classe in base alla dimensioni ed il peso del tumore metastatico per animale viene calcolato come la somma del peso delle singole metastasi, ciascuna considerata come un solido di rotazione sviluppato attorno agli assi sopra menzionati, mediante la formula usata per il tumore primario. I dati sperimentali ottenuti vengono quindi elaborati mediante appropriati test statistici.

I risultati sono riportati in Tabella 1, nella quale viene illustrato il numero ed il peso delle metastasi polmonari ottenuti nei gruppi di animali trattati con le composizioni della presente invenzione rispetto al gruppo dei controlli.

Tabella 1

Trattamento	Metastasi			
	numero	peso (mg)	%T/C	a.p./a.t
1 Controlli	24.2± 7.4	92.0±17.	100	0/6
2 ASC	18.3±8.6	81.5±14.	86	0/6
3 CIST	35.0±13.5	94.6±26.	103	0/6
4 RUT	7.0±1.9	15.2±2.3	16	0/6
5 RUT+ASC	4.0	15.2	16	5/6
6 RUT+CIST	3.5±1.0	9.2±2.0	10	2/6

%T/C = percentuale del peso delle metastasi degli animali trattati/peso di quelle dei controlli; a.p./a.t.: animali privi di metastasi/ animali totali

Dai dati riportati in tabella 1 si osserva che la cisteina (gruppo 3) e l'acido ascorbico (gruppo 2) da soli non producono alcun effetto rilevante sulle metastasi polmonari, mentre il complesso di Rutenio (III) (gruppo 4) e le composizioni dei complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione (gruppi 5 e 6) causano una marcata riduzione del numero ed una ancora più pronunciata riduzione del peso delle metastasi polmonari, rispetto ai controlli. Risulta inoltre evidente che le composizioni di Rutenio (II) secondo l'invenzione (gruppi 5 e 6), hanno un effetto più spiccato del corrispondente complesso di Rutenio (III) (gruppo 4) sul numero delle metastasi. Per quanto riguarda il peso delle metastasi l'effetto è più pronunciato per la composizione contenente cisteina (gruppo 6). E' inoltre rilevante il fatto che, rispetto al trattamento con il complesso di Rutenio (III) (gruppo 4), l'uso dei complessi di Rutenio (II) permette di prevenire la formazione di metastasi come evidenziato dal rapporto tra numero di animali privi di metastasi e numero di animali totali (ap/at) in rapporto ai trattamenti di controllo e come confermato dal test di Fisher.

ESEMPIO 5. Test *in vivo* di attività delle composizioni secondo la presente invenzione su topi affetti da carcinoma mammario MCa: attività di prevenzione della formazione di metastasi polmonari.

In un ulteriore esperimento, analogo al precedente, sei gruppi di animali, costituiti ciascuno da 7 topi femmine consanguinee del ceppo CBA/Lac, del peso di 23 ± 3 g, sono stati inoculati il giorno 0 con le cellule di carcinoma mammario MCa, secondo il protocollo descritto nell'esempio precedente. Dal giorno 10 al giorno 15, successivi all'impianto del

tumore, i 6 gruppi di topi sono stati trattati, mediante somministrazione intraperitoneale effettuata con una siringa da insulina sterile, rispettivamente con:

Gruppo 1. Controllo: 10 ml/kg di peso corporeo/die di soluzione fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 2. GLU: 23.5 mg/kg di peso corporeo/die di glutatione in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 3. CIST: 12 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 4. RUT : 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 5. RUT-GLU: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] e 23.5 mg/kg di peso corporeo/die di glutatione in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 6. RUT-CIST: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] e 12 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

L'agente riducente (Glutatione e Cisteina) e' stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III).

L'agente riducente (Acido Ascorbico e Cisteina) è stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III). La reazione di

riduzione e' immediata. La somministrazione avviene dopo controllo analitico della completa riduzione del complesso di Rutenio (III) a Rutenio (II).

Al giorno 16 dall'impianto del tumore, e' stata valutata la crescita del tumore primario, come descritto nell'esempio precedente.

Al giorno 23 dall'impianto del tumore, i topi sono sacrificati e le metastasi vengono valutate come nell'esempio precedente.

I dati sperimentali ottenuti, elaborati mediante appropriati test statistici, sono riportati in Tabella 2, nella quale sono riportati il numero ed il peso delle metastasi polmonari ottenuti nei gruppi di animali trattati come descritto.

Tabella 2

Trattamento	Metastasi		
	numero	peso (mg)	%T/C
1 Controlli	44.2±6.6	184.5±26.9	100
2 GLU	47.0±3.9	138.8±20.5	75
3 CIST	30.5±7.2	141.2±15.1	76
4 RUT	27.5±3.0	83.6±4.5	45
5 RUT+GLU	23.1±1.8	47.1±4.6	26
6 RUT+CIST	19.2±3.4	44.2±7.5	24

%T/C = percentuale del peso delle metastasi degli

trattati/peso di quelle dei controlli.

Dai dati presentati in tabella risulta evidente l'effetto antimetastatico dei complessi di Rutenio (II) dell'invenzione (gruppi 5 e 6), rispetto al corrispondente composto di Rutenio (III) (gruppo 4); tale effetto riguarda

sia la riduzione del numero di metastasi che, ancor più significativamente, il peso delle stesse.

ESEMPIO 6. Test in vivo di attività di complessi di Rutenio (III) e Rutenio (II) di tecnica nota su topi BD2F1 affetti da carcinoma polmonare di Lewis (LLC).

Gruppi di 7 topi femmina BD2F1 sono stati inoculati mediante iniezione intramuscolare il giorno 0 con cellule di carcinoma polmonare di Lewis (LLC) e dal giorno 8 al giorno 13 gli animali sono stati trattati con il complesso di Rutenio (III): $[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})](\text{ImH})$ (di formula II) e con il complesso di Rutenio (II): $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ di tecnica nota. Al giorno 20 dall'impianto del tumore i topi sono stati sacrificati e le metastasi sono state valutate.

Tutte le procedure dell'esperimento sono state condotte come riportato negli esempi precedenti.

I dati sperimentali ottenuti ed elaborati mediante appropriati test statistici sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3

Composto (mg/kg/die)	Metastasi polmonari			
	numero	T/C%	peso	T/C%
Controlli	24.4±4.6	-	191.3±35.7	-
[trans-RuCl ₄ (DMSO)(Im)](ImH) (35 mg/kg)	9.4±1.5	38	47.6±11.9	25
trans-RuCl ₂ (DMSO) ₄ (70 mg/kg)	19.6±1.9	82	85.5±19.3	45

Dai dati presentati in tabella si osserva chiaramente che il complesso di Rutenio (III) di formula II è significativamente più efficace del complesso di Rutenio (II) di tecnica nota nel ridurre le metastasi polmonari.

Test di tossicità

ESEMPIO 7. Effetti del trattamento *in vivo* delle composizioni secondo la presente invenzione su topi affetti da carcinoma mammario MCa.

Quattro gruppi, costituiti ciascuno da 7 topi femmine consanguinee del ceppo CBA/Lac, del peso di 23±3 g, il giorno 0, sono stati inoculati con cellule di carcinoma mammario MCa secondo il protocollo descritto negli esempi precedenti. Dal giorno 11 al giorno 16 successivi al trapianto del tumore, i 4 gruppi di topi sono stati trattati, mediante somministrazione intraperitoneale effettuata con una siringa da insulina sterile, rispettivamente con:

Gruppo 1. Controllo: 10 ml/kg di peso corporeo/die di soluzione fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 2. CIST: 2 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 3. RUT: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 4. RUT-CIST: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] e 12 mg/kg di peso corporeo/die di cisteina in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

L'agente riducente (Cisteina) e' stato usato in rapporto di equivalenti pari ad 1 con il complesso di Rutenio (III).

L'agente riducente (Acido Ascorbico e Cisteina) è stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III). La reazione di riduzione e' immediata. La somministrazione avviene dopo controllo analitico della completa riduzione del complesso di Rutenio (III) a Rutenio (II).

Al giorno 17 dall'impianto del tumore, i topi vengono sacrificati, il tumore primario e la milza vengono asportati ed analizzati, come descritto negli esempi precedenti.

I risultati sono riportati in Tabella 4, nella quale viene illustrato la variazione in peso del tumore primario (variazione in % rispetto ai controlli) tra il giorno 11 e 17, il peso dell'animale al giorno 11 e 17, la variazione del peso corporeo (espressa in percentuale rispetto ai

controlli) il peso della milza al giorno 17 nel gruppo di animali trattati con una composizione dell'invenzione rispetto al gruppo dei controlli.

Tabella 4

Trattamento	Variazione (%) tumore primario	Peso corporeo (giorno)	Peso corporeo (giorno 17)	Variazion e (%)	Peso milza (giorno 17)
1 Controlli	-	31.4±0.5	31.0±0.7	-	273±13.3
2 CIST	-6.4	30.5±0.6	28.8±0.6	-2.5	297±3.3
3 RUT	-30.3	30.0±1.0	26.5±0.8	-8.8	197±8.8
4 RUT+CIST	-13.6	30.8±0.6	29.0±0.4	-2.3	282±20.3

I dati presentati in tabella indicano come il peso corporeo dell'animale e della milza, indicatori di tossicità sistemica del trattamento, risultino più simili al controllo (gruppo 1) nel caso di trattamento con i complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione (gruppo 4) che non nel caso di trattamento con solo Rutenio (III) (gruppo 3). Tali dati sono in accordo con una minore tossicità sistemica dei complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione, rispetto ai complessi di Rutenio (III) di corrispondente formula.

ESEMPIO 8. Effetti del trattamento *in vivo* delle composizioni secondo la presente invenzione su topi affetti da carcinoma mammario MCa.

Quattro gruppi, costituiti ciascuno da 6 topi femmine consanguinee del ceppo CBA/Lac, del peso di 23±3 g sono stati inoculati il giorno 0 con cellule tumorali secondo il protocollo descritto negli esempi precedenti. Dal giorno 12 al giorno 17, successivi all'impianto del tumore, i quattro gruppi di topi sono stati trattati, mediante somministrazione

intraperitoneale effettuata con una siringa da insulina sterile, rispettivamente con:

Gruppo 1. Controllo: 10 ml/kg di peso corporeo/die di soluzione fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 2. ASC : 6.69 mg/kg di peso corporeo/die di acido ascorbico in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 3. RUT: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

Gruppo 4: RUT+ASC: 35 mg/kg di peso corporeo/die di complesso di Rutenio (III), (ImH)[*trans*-RuCl₄(Me₂SO)(Im)] e 6.69 mg/kg di peso corporeo/die di acido ascorbico in soluzione salina fisiologica sterile ed apirogena.

L'agente riducente (Acido Ascorbico) e' stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III).

L'agente riducente (Acido Ascorbico e Cisteina) è stato usato in rapporto di equivalenti pari a 1 con il complesso di Rutenio (III). La reazione di riduzione e' immediata. La somministrazione avviene dopo controllo analitico della completa riduzione del complesso di Rutenio (III) a Rutenio (II).

Il giorno 18 dall'impianto del tumore, il tumore primario e la milza vengono asportati e pesati, come descritto precedentemente.

I risultati sono riportati in Tabella 5, nella quale vengono illustrate la variazione del peso del tumore primario (variazione in % rispetto ai

controlli) tra il giorno 12 e 18, il peso dell'animale al giorno 12 e 18, la variazione del peso corporeo (variazione in % rispetto ai controlli) nel gruppo di animali trattati con una composizione dell'invenzione rispetto al gruppo dei controlli.

Tabella 5

Trattamento	Variazione (%) tumore primario	Peso corporeo (giorno 12)	Peso corporeo (giorno 18)	Variazione (%)
1 Controlli	-	28.9±0.5	28.0±0.5	-
2 ASC	-11	27.6±0.7	26.7±1.2	-0.1
3 RUT	-33	27.0±0.9	23.3±0.8	-10.8
4 RUT+ASC	-28	25.4±1.0	25.1±0.9	+2.1

L'esperimento conferma la minore tossicità dei complessi di Rutenio (II) secondo l'invenzione (gruppo 4) rispetto ai complessi di Rutenio (III) (gruppo 3).

Risulta evidente dai dati presentati in tabella 4 e 5 che le composizioni secondo l'invenzione risultano meno tossiche dei corrispondenti complessi di Rutenio(III) di formula II. Infatti non solo è minore il calo in peso corporeo dell'animale trattato, ma anche il peso della milza risulta sostanzialmente inalterato, al contrario di quanto avviene invece con il composto Rutenio(III) del gruppo 3.

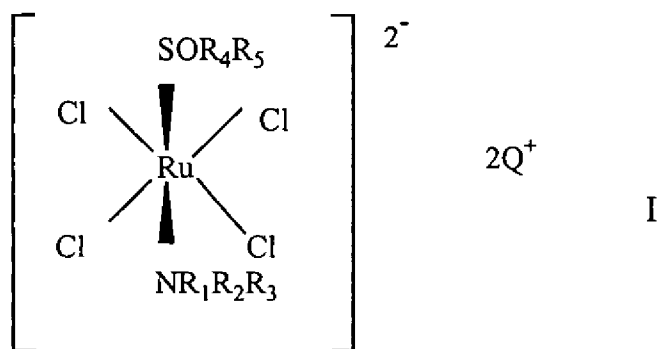
Dall'insieme dei test di attività e tossicità è quindi possibile concludere che i composti di Rutenio (II) secondo l'invenzione, sono nettamente più attivi dei corrispondenti complessi di Rutenio (III) nonché di quelli di Rutenio (II) di arte nota. Inoltre, inaspettatamente, i complessi secondo

l'invenzione, sono dotati di minore tossicità sistemica in opposizione a quanto atteso dall'arte nota.

Si evidenzia così una nuova alternativa terapeutica per il trattamento dei tumori superiore per attività e selettività a tutti i trattamenti noti a base di complessi del Rutenio.

RIVENDICAZIONI

1. Complesso di Rutenio (II) di formula I:



dove

R_1 , R_2 , R_3 , uguali o diversi tra loro, sono scelti nel gruppo costituito da H, alchile $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineare o ramificato, saturo o insaturo, cicloalchile $\text{C}_3\text{-C}_7$, arile; oppure $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ è un eterociclo azotato a 5-7 membri, saturo o insaturo, inoltre contenente eventualmente 1 o più' atomi scelti tra O, S e N, o N sostituito con un residuo $\text{C}_1\text{-C}_4$ alchiltio, arile o benzile; detto eterociclo azotato essendo eventualmente benzocondensato e/o sostituito con $\text{C}_1\text{-C}_4$ alchile, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcossile, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alchiltio, arile o benzile; inoltre dove:

$\text{Q}^* = \text{NH}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3$, dove R_1 , R_2 , R_3 mantengono i significati suddetti;

e dove

R_4 ed R_5 , uguali o diversi tra loro, sono scelti nel gruppo costituito da H, alchile $\text{C}_1\text{-C}_6$, cicloalchile $\text{C}_3\text{-C}_7$, arile; oppure R_4

ed R_5 formano, insieme all'atomo di S a cui sono legati, un eterociclo a 4-7 membri,

per uso terapeutico

2. Complesso secondo la rivendicazione 1, dove R_1 , R_2 ed R_3 sono scelti tra H ed etile.
3. Complesso secondo la rivendicazione 1 dove $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo azotato a 5 membri, scelto nel gruppo costituito da imidazolo, N-metilimidazolo, pirazolo ed ossazolo.
4. Complesso secondo la rivendicazione 1 dove $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo a 6 membri, scelto nel gruppo costituito da piridina, 3,5-lutidina e 4-metilpiridina.
5. Complesso secondo la rivendicazione 1 dove $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo a 7 membri, scelto nel gruppo costituito da azepina, diazepina ed ossazepina.
6. Complesso secondo la rivendicazione 1 dove $NR_1R_2R_3$ è un eterociclo azotato benzocondensato, scelto nel gruppo costituito da indazolo, isochinolina, benzimidazolo e 1,5,6-trimetil-benzimidazolo.
7. Complesso secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6, dove R_4-SO-R_5 è scelto tra dimetilsolfossido e dietilsolfossido.
8. Complesso secondo le rivendicazioni 1,3 e 7 dove $NR_1R_2R_3$ è imidazolo, Q^* e' imidazolio e R_4-SO-R_5 è dimetilsolfossido.
9. Complesso secondo le rivendicazioni 1, 2 e 7, dove $NR_1R_2R_3$ è NH_3 , Q^* e' ammonio e R_4-SO-R_5 è dimetilsolfossido.

10. Composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo il complesso di Rutenio (II), come definito nelle rivendicazioni da 1 a 9, in associazione con opportuni eccipienti e/o diluenti e/o stabilizzanti farmacologicamente accettabili.

11. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 10 caratterizzata dal fatto di essere in forma di soluzione o sospensione.

12. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 10 caratterizzata dal fatto di essere in forma di gel crema, polvere granulare, compressa, confetto capsula o inserto.

13. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 10 dove detti complessi di Rutenio (II) sono in combinazione con uno o più' farmaci antitumorali.

14. Composizione farmaceutica in accordo con le rivendicazioni da 10 a 13 preparabile al momento dell'uso per miscelazione del corrispondente complesso di Rutenio (III) con un agente riducente fisiologicamente compatibile.

15. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 14, dove l'agente riducente è scelto nel gruppo costituito da: acido ascorbico, cisteina, e glutatione.

16. Composizione secondo le rivendicazioni 14 e 15 dove il complesso di Rutenio (III) e' utilizzato in un rapporto di equivalenti con l'agente riducente compreso tra 5:1 e 1:2

17. Composizione secondo la rivendicazione 16 dove il rapporto di equivalenti tra il complesso di Rutenio (III) e l'agente riducente e' uguale a 1.
18. Kit per la preparazione del complesso di Rutenio (II) come definito nelle rivendicazioni da 1-9, dove un primo componente è il corrispondente complesso di Rutenio (III) ed un secondo componente è un agente riducente.
19. Kit secondo la rivendicazione 18, dove i due componenti sono presenti in forma solida in contenitori separati da miscelare e solubilizzare al momento dell'uso con un opportuno solvente.
20. Kit secondo la rivendicazione 18 dove i due componenti sono presenti in forma di soluzioni da miscelare al momento dell'uso.
21. Kit secondo la rivendicazione 18 dove l'agente riducente è scelto tra: acido ascorbico, glutatione e cisteina
22. Kit secondo le rivendicazioni da 18 a 21 dove i due componenti sono presenti in un rapporto di equivalenti del complesso di Rutenio (III) con l'agente riducente compreso tra 5:1 e 1:2
23. Kit secondo la rivendicazione 22 dove il rapporto di equivalenti e' uguale a 1.
24. Uso di un complesso di Rutenio (II) come definito nelle rivendicazioni da 1 a 9, per la preparazione di medicinali per la prevenzione e la cura di tumori e metastasi.
25. Uso secondo la rivendicazione 24 dove tali tumori sono solidi e caratterizzati da un elevato potere metastatizzante.

26. Uso secondo la rivendicazione 25 dove tali tumori appartengono al seguente gruppo: carcinomi del colon, carcinomi mammari, tumori polmonari e metastasi polmonari di tumori metastatici.

27. Uso secondo le rivendicazioni da 24 a 26 dove la somministrazione avviene per via parenterale, orale topica o transdermica.

28. Uso secondo le rivendicazioni da 24 a 27 dove il complesso di Rutenio (II) è preparato al momento dell'utilizzo, mediante miscelazione del corrispondente complesso di Rutenio (III) con un agente riducente.

29. Uso secondo la rivendicazione 28 dove l'agente riducente è scelto tra: acido ascorbico, cisteina, glutatione.

Milano, li 28 Ottobre 1999

p. SIGEA s.r.l.

il Mandatario


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

