



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

(21) PI 0720734-4 A2



(22) Data de Depósito: 28/12/2007
(43) Data da Publicação: 07/01/2014
(RPI 2244)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/07
A61K 38/00

(54) Título: PREPARAÇÃO DA ROMIDEPSINA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2006 US 60/882,712

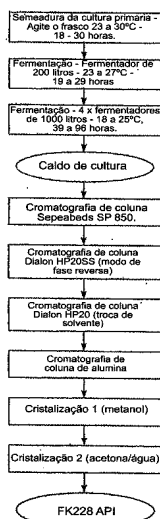
(73) Titular(es): Gloucester Pharmaceuticals, Inc.

(72) Inventor(es): Gregory L. Verdine, Nicholas H. Vrolijk

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007089070 de 28/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/083290 de 10/07/2008



Pedidos de Patente Relacionados

Antecedentes da Invenção

The chemical structure shows a cyclic peptide with a disulfide bridge. The backbone consists of a 12-membered ring with four amide bonds. The side chains include a methyl group, a vinyl group, and an isopropyl group. The disulfide bridge connects two cysteine residues, forming a cyclic structure.

A Romidepsina tem mostrado ter atividades antimicrobianas, imunossupressoras e anti tumor. A romidepsina está correntemente sendo testada, por exemplo, para ser usada no tratamento de pacientes com ma-

lignidades hematológicas (por exemplo, linfoma de célula T cutânea (CTCL), linfoma de célula T periférica (PTCL), mieloma múltiplo, etc.) e em tumores sólidos (por exemplo, câncer da próstata, câncer pancreático, etc.). Ela é imaginada como atuando através da inibição seletiva das desacetilases (por exemplo, desacetilase histona, desacetilase tubulina), prometendo novos alvos para relação ao desenvolvimento de uma nova classe de terapias anti-câncer. Nakajima *et al.*, *Experimental Cell Res.* 241: 126 a 133, 1998. Um modo de ação envolve a inibição de uma ou mais classes de desacetilases de histonas (HDAC).

10 A desacetilase de histona é uma enzima de metalodesacetilação que tem zinco em seu sítio ativo. Finnin *et al.*, *Nature*, 401: 188 a 193, 1999. Esta enzima é imaginada como regulando a expressão de determinados genes através da modulação da afinidade das histonas acetiladas com relação ao DNA. A acetilação de histonas é controlada através do equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação. A acetilação das histonas ocorre em um resí-
15 duo de lisina da proteína histona. A acetilação do resíduo de lisina faz com que a proteína perca um pouco de sua carga positiva, diminuindo, por meio disso, a interação da mesma com o DNA. A romidepsina foi descoberta como ocasionando a acetilação crescente das histonas e outras proteínas reguladoras em células tratadas. Isso afeta o controle de transcrição dos
20 diversos genes envolvidos no controle, diferenciação e apoptose no ciclo da célula. Mais recentemente, os inibidores de HDCA tem sido implicados no controle da autofagia.

 Além da romidepsina, vários derivados têm sido preparados e
25 estudados. A patente e os pedidos de patente que se seguem descrevem vários derivados da romidepsina: Patente U.S. 6.548.479; WO 05/0209134; WO 05/058298; e WO 06/129105; cada um dos quais é incorporado aqui, por referência.

 Dado ao interesse na romidepsina como um agente farmacêuti-
30 co, continua a existir uma necessidade com relação à preparação de grandes quantidades de material altamente purificado em uma maneira de custo eficiente. Diversos relatórios com relação à purificação da romidepsina a par-

tir de uma calda de fermentação tem sido relatados. A Patente U. S. 4.977.138; Pedido de Patente Internacional PCT WO 02/20817; cada um dos quais é incorporado aqui, por referência. Por exemplo, a WO 02/20817 descreve o aumento da produção da romidepsina a partir de um processo de fermentação através da adição de amino-ácidos específicos tais como a L-cisteína ao meio de cultura. Embora essas descobertas tenham proporcionado produções aumentadas da romidepsina através da fermentação, continua existindo uma necessidade com relação a melhores maneiras para a preparação de grandes quantidades de romidepsina pura para uso em pesquisa e em medicina.

Resumo da Invenção

A presente invenção é baseada no reconhecimento de que os procedimentos publicados para o isolamento da romidepsina não produzem de modo reproduzível a romidepsina pura, especificamente, a romidepsina isenta de contaminantes tais como a romidepsina dimerizada, oligomerizada ou polimerizada. Com base nesse reconhecimento, a presente invenção proporciona um sistema para preparar de forma reproduzível a romidepsina sob condições que reduzem os níveis desses produtos secundários contaminantes. Produzindo, purificando, e/ou armazenando a romidepsina em um pH aparente de menos do que aproximadamente 6,5, mais preferivelmente menos do que aproximadamente 6,0 foi descoberto como impedindo a formação de romidepsina dimerizada, oligomerizada ou polimerizada. Esse melhoramento no processo de purificação da romidepsina permite rendimentos mais elevados de romidepsina e/ou romidepsina de pureza mais alta do que aquela provida através de processos conhecidos. Esse melhoramento é especificamente útil para a preparação de romidepsina de qualidade farmacêutica para ser usada em seres humanos.

A romidepsina é tipicamente produzida através da purificação da mesma a partir de uma cultura de um micro-organismo (por exemplo, *Chromobacterium violaceum*) que produz o produto natural. A presente invenção demonstra que é necessário manter um pH baixo durante pelo menos algumas das etapas de purificação com a finalidade de eliminar ou reduzir a for-

mação da romidepsina reduzida que pode em seguida se dimerizar, oligomerizar, ou polimerizar para a formação de contaminantes indesejáveis.

Uma ou mais das etapas de purificação são executadas em um pH aparente de menos do que 6,5 ou mesmo em um pH aparente de menos do que 6,0. Em determinadas modalidades, uma ou mais das etapas de purificação são executadas em um pH aparente variando a partir de 4,0 até 6,0. Em determinadas modalidades, todas as etapas de purificação são executadas em um pH aparente de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0. Com a finalidade de evitar a formação de contaminantes indesejáveis, o pH aparente de uma solução que contém a romidepsina não é deixado chegar a um pH aparente acima de aproximadamente 7,0, ou mais preferencialmente acima de aproximadamente 6,0. O pH aparente de todos os processos da purificação é monitorado de preferência e em seguida ajustado, se necessário, para ser um pH aparente abaixo de aproximadamente 6,0. Em determinadas modalidades, ele é mantido dentro de uma faixa de pH aparente de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0. O controle do pH aparente nas etapas de purificação com relação ao final do processo ou etapas que usam soluções aquosas tem sido considerado como sendo especificamente útil na diminuição ou na eliminação da formação de contaminantes indesejáveis. Qualquer ácido ou tampão pode ser usado para o controle do pH. Em determinadas modalidades, um ácido orgânico como o ácido acético ou o ácido fórmico é usado para o controle do pH em uma ou mais das etapas de purificação. Em determinadas modalidades, um ácido inorgânico tal como o ácido fosfórico ou o ácido clorídrico é usado.

Qualquer procedimento para a purificação da romidepsina, seja a partir de fermentação, semissíntese ou síntese total, pode ser modificado com base na presente invenção para impedir a formação de produtos colaterais indesejados através da monitoração do pH aparente e da redução do pH aparente se necessária.

Em um aspecto, a invenção proporciona um processo para a preparação da romidepsina a partir de uma cultura de *Chromobacterium violaceum*. A calda de fermentação é acidificada com a finalidade de inativar ou

matar os micro-organismos na cultura. A calda de fermentação acidificada é preliminarmente purificada através de cromatografia em batelada ou de coluna. Em seguida, podem ser usadas múltiplas etapas de cromatografia de coluna para alcançar o nível de pureza desejado. Em determinadas modalidades, a primeira cromatografia usa Sepabeads SP850, uma resina de adsorção não-iônica. A romidepsina pode ser ainda purificada através de etapas de cromatografia de coluna adicionais. Em determinadas modalidades, a romidepsina é em seguida purificada através de cromatografia de coluna com a utilização da resina Diaion HP20SS, seguida por cromatografia de coluna com a utilização da resina Diaion HP20, e finalmente através de cromatografia de coluna sobre alumina. Em determinadas modalidades, a cromatografia de coluna é realizada em um pH aparente que varia a partir de aproximadamente 4 até aproximadamente 6. Em determinadas modalidades específicas, a segunda etapa de cromatografia de coluna é realizada em um pH aparente reduzido (por exemplo, um pH aparente de aproximadamente 4 a 6). A romidepsina é opcionalmente ainda mais purificada através de cristalização. Uma ou mais etapas de cristalização podem ser realizadas. Em determinadas modalidades, a romidepsina é primeiro cristalizada com a utilização de metanol e em seguida cristalizada com a utilização de acetona aquosa a 85%. A romidepsina resultante é em seguida opcionalmente filtrada, lavada, e seca. Em determinadas modalidades, as etapas de cristalização ou quaisquer etapas subsequentes são realizadas em um pH aparente reduzido que varia a partir de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0. É de importância específica que as etapas finais sejam realizadas em um pH aparente reduzido uma vez que nenhuma etapa de purificação está disponível para a remoção dos contaminantes não desejados. Qualquer equipamento (por exemplo, tubulação, bombas, filtros, secadores, etc.), usado nos processos de fermentação e/ou purificação é lavado com água ou uma solução ácida (por exemplo, ácido acético) para a remoção ou a neutralização de qualquer resíduo alcalino no equipamento.

Além do mais, a preparação de formas de dosagem farmacêuticas da romidepsina, incluindo a composição com excipientes, solventes,

cossolventes e/ou outros agentes usados para aumentar a atividade farmacológica da romidepsina, pode ser executada em um pH aparente reduzido (por exemplo, um pH aparente de menos do que aproximadamente 4,0) com a finalidade de minimizar a formação da romidepsina dimerizada, oligomerizada ou polimerizada.

Em outro aspecto, a invenção proporciona uma composição de romidepsina substancialmente isenta de romidepsina dimerizada, oligomerizada ou polimerizada. A romidepsina proporcionada pela presente invenção é mais do que 98% monomérica, mais do que 99% monomérica, ainda maior do que 99,95% monomérica, ou mais do que 99,9% monomérica. Em algumas modalidades, a romidepsina é de preferência mais do que 98% pura, mais do que 99% pura, mais do que 99,95% pura ou mais do que 99,9% pura com relação a todos os contaminantes. Em determinadas modalidades, a romidepsina inclui menos do que 1.0%, menos do que 0,5%, menos do que 0,2% ou menos do que 0,1% do total de outros desconhecidos. A composição da romidepsina inclui de preferência nenhum material detectável dimerizado, oligomerizado ou polimerizado. A pureza da romidepsina é tipicamente determinada através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), espectroscopia infravermelha, análise de difração de raios X sobre pó (XRPD), cromatografia gasosa (GC), rotação específica, ou espectroscopia RMN. Em determinadas modalidades, a pureza é determinada através da medição da rotação específica de uma solução de romidepsina em clorofórmio. A invenção também proporciona preparações tamponadas de romidepsina que mantêm o pH aparente da preparação abaixo de aproximadamente 6,0, de preferência entre aproximadamente 4,0 e aproximadamente 6,0. Essas preparações têm tipicamente um tempo de prateleira prolongado.

Definições

As definições de grupos funcionais específicos e termos químicos estão descritos em mais detalhes abaixo. Para as finalidades da invenção, os elementos químicos são identificados de acordo com a Tabela Periódica de elementos, versão CAS, *Handbook of Chemistry and Physics*, 75^a Ed. capa interna, e grupos funcionais específicos são em geral definidos

como descritos no mesmo. Além disso, os princípios gerais de química orgânica, bem como as porções funcionais específicas e a reatividade, estão descritos em *Organic Chemistry*, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999, o conteúdo total do qual são incorporado aqui, por referência.

Determinados compostos da presente invenção podem existir em formas específicas geométricas ou estereoisoméricas. A presente invenção contempla todos esses compostos, incluindo os isômeros *cis* e *trans*, isômeros E- e Z-, enantiômeros R- e S-, diastereômeros, isômeros (D), isômeros(L), isômeros (-) e (+), misturas racêmicas dos mesmos e outras misturas dos mesmos, como estando dentro do âmbito da invenção. Os átomos de carbono assimétricos adicionais podem estar presentes em um substituinte como um grupo alifático (por exemplo, alquila) ou heteroalifático. Todos esses isômeros, bem como as misturas dos mesmos, são considerados com estando dentro desta invenção.

As misturas isoméricas que contenham qualquer uma de uma variedade de proporções de isômeros podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção. Por exemplo, quando somente dois isômeros estão combinados, as misturas que contenham 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, ou 100:0 proporções de isômeros são todas contempladas pela presente invenção. Aquelas pessoas versados na técnica irão observar com facilidade que as proporções análogas são contempladas com relação às misturas de isômeros mais complexas.

Será observado que os compostos, como descritos aqui, , podem ser substituídos com qualquer número de substituintes ou porções funcionais. Em geral, o termo "substituído", seja precedido pelo termo "opcionalmente" ou não, e os substituintes contidos nas fórmulas desta invenção, se referem à substituição de radicais hidrogênio em uma determinada estrutura, como radical de um substituinte específico. Em determinadas modalidades, somente o radical hidrogênio em uma determinada estrutura é substituído com o radical de um substituinte específico. Em outras modalidades, um, dois, ou três radicais de hidrogênio em uma determinada estrutura são

substituídos com o mesmo radical ou com um radical diferente de um substituinte específico. Quando mais do que uma posição em qualquer estrutura dada pode ser substituída com um ou mais do que um substituinte selecionado a partir de um grupo especificado, o substituinte pode ser tanto o mesmo como diferente em todas as posições. Na forma usada aqui, o termo "substituído" é contemplado como incluindo todos os substituintes permissíveis de compostos orgânicos. Em um aspecto amplo, os substituintes permissíveis incluem substituintes de compostos orgânicos acíclicos e cíclicos, ramificados ou não-ramificados, carbocíclicos ou heterocíclicos, aromáticos e não aromáticos. Para as finalidades desta invenção, os heteroátomos tais como o nitrogênio, podem ter substituintes de hidrogênio e/ou quaisquer substituintes permissíveis de compostos orgânicos descritos aqui, que satisfaçam as valências dos heteroátomos. Além do mais, esta invenção não está destinada a ser limitada de qualquer maneira pelos substituintes permissíveis dos compostos orgânicos. As combinações de substituintes e variáveis imaginadas por esta invenção são de preferência aquelas que resultem na formação de compostos estáveis úteis para o tratamento de, por exemplo, doenças proliferativas, tais como o câncer. O termo "estável", na forma usada aqui, se refere a compostos que possuam estabilidade suficiente para permitir a fabricação e que mantenham a integridade do composto durante um período de tempo suficiente para ser detectado e de preferência durante um período de tempo suficiente para ser utilizável para as finalidades detalhadas aqui,.

O termo "alifático, na forma usada aqui, inclui ambos os hidrocarbonetos alifáticos, saturados ou não-saturados, de cadeia linear (por exemplo; não-ramificada), ramificada, acíclica, cíclica ou policíclica, que são opcionalmente substituídos com um ou mais grupos funcionais. Como será observado por uma pessoa versada na técnica, "alifático" está destinado aqui, a incluir, porém não está limitado a porções de alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, cicloalquenila e cicloalquinila.

Desse modo, na forma usada aqui, o termo "alquila" inclui grupos de alquila lineares, ramificados e cíclicos. Uma convenção análoga se

aplica a outros termos genéricos tais como "alquenila", "alquinila" e similares. Além disso, na forma usada aqui, os termos "alquila", "alquenila", "alquinila" e similares englobam ambos os grupos substituídos e não-substituídos. Em determinadas modalidades, na forma usada aqui, "alquila inferior" é usado para indicar aqueles grupos de alquila (cíclicos, acíclicos, substituídos, não-substituídos, ramificados ou não-ramificados) que tenham de 1 a 6 átomos de carbono.

Em determinadas modalidades, os grupos alquila, alquenila e alquinila empregados na invenção contêm de 1 a 20 átomos de carbono alifáticos. Em determinadas outras modalidades, os grupos alquila, alquenila e alquinila empregados na invenção contêm de 1 a 10 átomos de carbono alifáticos. Em ainda outras modalidades, os grupos alquila, alquenila e alquinila empregados na invenção contêm de 1 a 8 átomos de carbono alifáticos. Em ainda outras modalidades, os grupos alquila, alquenila e alquinila empregados na invenção contêm de 1 a 6 átomos de carbono alifáticos. Em outras modalidades adicionais, os grupos alquila, alquenila e alquinila empregados na invenção contêm de 1 a 4 átomos de carbono. Desse modo, os grupos alifáticos ilustrativos incluem, porém não estão limitados a, por exemplo, a porções de metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, -CH₂-ciclopropila, vinila, alila, n-butila, sec-butila, isobutila, terc-butila, ciclobutila, -CH₂-ciclobutila, n-pentila, sec-pentila, isopentila, terc-pentila, ciclopentila, -CH₂-ciclopentila, n-hexila, sec-hexila, ciclo-hexila, -CH₂-ciclo-hexila e similares, que de novo podem conter um ou mais substituintes. Os grupos alquenila incluem, porém não estão limitados a, por exemplo, etenila, propenila, butenila, 1-metila-2-buten-1-ila, e similares. Os representativos dos grupos alquinila incluem porém não estão limitados a, etinila, 2-propinila (propargila), 1-propinila, e similares.

Alguns exemplos de substituintes das porções alifáticas (e outras) acima descritas dos compostos da invenção incluem, porém não estão limitados a alifáticos; heteroalifáticos; arila; heteroarila; arilalquila; heteroarilalquila; alcóxi; arilóxi; heteroalcóxi; heteroarilóxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -

CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x

em que cada ocorrência de R_x inclui, independentemente, porém não estão limitados a, alifáticos, heteroalifáticos, arila, heteroarila, arilalquila, ou heteroarilalquila, em que cada um dos substituintes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquila, ou heteroarilalquila descrito acima e aqui pode ser substituído ou não-substituído, ramificado ou não-ramificado, cíclico ou acíclico, e em que qualquer um dos substituintes de arila ou heteroarila descrito acima e aqui pode ser substituído ou não-substituídos. Os exemplos adicionais de substituintes aplicáveis em geral estão ilustrados através das modalidades específicas mostradas nos exemplos e que estão descritas aqui.

Em geral, os termos "arila" e "heteroarila", na forma usada aqui, neste pedido de patente, se referem a porções mono- ou poli- cíclicas, heterocíclicas, policíclicas e poli-heterocíclicas não-saturadas que tenham de preferência de 3 a 14 átomos de carbono, cada uma das quais pode ser substituída ou não-substituída. Os substituintes incluem, porém não estão limitados a qualquer um dos substituintes previamente mencionados, isto é, os substituintes relacionados para as porções alifáticas, ou com relação a outras porções como as descritas aqui, neste pedido de patente, e que resultam na formação de um composto estável. Em determinadas modalidades da presente invenção, "arila" se refere a um sistema de anel carboxílico mono- ou bi-cíclico, que tenha um ou dois anéis aromáticos, incluindo porém não limitados a, fenila, naftila, tetra-hidronaftila, indenila, indenila, e similares. Em determinadas modalidades da presente invenção, o termo "heteroarila", na forma usada aqui, se refere a um radical aromático cíclico que tem a partir de cinco até dez átomos no anel, dos quais um dos átomos do anel é selecionado a partir de S, O e N; zero, um ou dois átomos do anel são heteroátomos adicionais selecionados independentemente a partir de S, O e N, e os restante átomos do anel é carbono, o radical estando junto ao restante da molécula através de qualquer dos átomos do anel, tais como, por exemplo, piridila, pirazinila, pirimidila, pirrolila, pirazolila, imidazolila, tiazolila, oxazolila, isoxazolila, tiodiazolila, oxadiazolila, tiofenila, furanila, quinolinila, isoquinoli-

nila, e similares.

Será observado que os grupos arila e heteroarila podem ser não-substituídos ou substituídos, em que a substituição inclui a substituição de um, dois, três ou mais dos átomos de hidrogênio no mesmo de forma independente com qualquer uma ou mais porções que se seguem, incluindo, porém não limitadas a, alifáticos; heteroalifáticos; arila; heteroarila; arilalquila; heteroarilalquila; alcóxi; arilóxi; heteroalcóxi; heteroarilóxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x, em que cada ocorrência de R_x inclui, independentemente, porém não está limitada a alifáticos, heteroalifáticos, arila, heteroarila, arilalquila, ou heteroarilalquila, em que cada um dos substituintes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquila, ou heteroarilalquila descrito acima e aqui, pode ser substituído ou não-substituídos, ramificado ou não-ramificado, cíclicos ou acíclicos, e em que qualquer um dos substituintes de arila ou heteroarila descrito acima e aqui, pode ser substituído ou não-substituído. Os exemplos adicionais de substituintes aplicáveis em geral estão ilustrados através das modalidades específicas mostradas nos exemplos e que estão descritas aqui,.

O termo "heteroalifático", na forma usada aqui, se refere às porções alifáticas que contem um ou mais átomos de oxigênio, enxofre, nitrogênio, fósforo ou sílica, por exemplo, no lugar de átomos de carbono. As porções heteroalifáticas podem ser ramificadas, não-ramificadas, cíclicas ou acíclicas e incluem heteróciclos saturados ou não-saturados tais como morfolino, pirrolidinila, etc. Em determinadas modalidades, as porções heteroalifáticas são substituídas por substituintes independentes de um ou mais dos átomos de hidrogênio nos mesmos com uma ou mais porções incluindo, porém não limitadas a, alifáticos; hetero alifáticos; arila; heteroarila; arilalquila; heteroarilalquila; alcóxi; arilóxi; heteroalcóxi; heteroarilóxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(O)R_x; -CO₂(R_x); -CON(R_x)₂; -OC(O)R_x; -OCO₂R_x; -OCON(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x,

em que cada ocorrência de R_x inclui, independentemente, porém não está limitada a alifático, heteroalifático, arila, heteroarila, arilalquila, ou heteroarilalquila, em que cada um dos substituintes alifático, heteroalifático, arilalquila, ou heteroarilalquila descrito acima e aqui, podem ser substituído ou não-substituído, ramificado ou não-ramificado, cíclico ou acíclico, e em que, qualquer um dos substituintes de arila ou heteroarila descrito acima e aqui, podem ser substituído ou não-substituído. Os exemplos adicionais de substituintes aplicáveis em geral estão ilustrados através das modalidades específicas mostradas nos exemplos e que estão descritas aqui,.

Os termos "halo" ou "halogênio" na forma usada aqui, se referem a um átomo selecionado a partir de flúor, cloro, bromo ou iodo.

"Selecionados independentemente": o termo "selecionados independentemente" na forma usada aqui, indicam que os grupos R podem ser idênticos ou diferentes.

As definições de outros termos usados através de todo o relatório descritivo incluem:

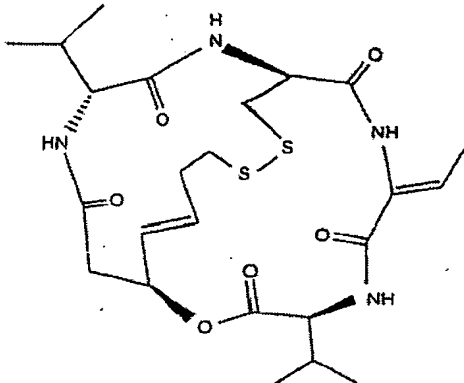
"Ácido": O termo "ácido" na forma usada aqui, se refere a ácidos inorgânicos e orgânicos. Os exemplos de ácidos inorgânicos incluem, porém não são limitados a, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido (hidroiódico), ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico. Os exemplos de ácidos orgânicos incluem porém não estão limitados ao ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metano sulfônico, ácido benzenossulfônico e ácido p-toluenossulfônico. Qualquer ácido pode ser usado para o ajuste do pH dos tampões ou soluções de romidepsina ou aqueles usados na purificação da romidepsina. Em determinadas modalidades é usado o ácido acético. Em determinadas modalidades é usado o ácido clorídrico, Em determinadas modalidades é usado o ácido cítrico. Em determinadas modalidades, é usado o ácido sulfúrico.

"Depsipeptídio": o termo "depsipeptídio", na forma usada aqui, se refere aos polipeptídios que contêm ambas as ligações de éster e de amida. Os depsipeptídios de ocorrência natural são usualmente cíclicos. Alguns dos

depsipeptídios tem mostrado ter uma atividade antibiótica potente. Os exemplos de desipeptídios incluem a actinomicina, eniatinas, valinomicina e romidepsina.

- "Peptídio" ou "proteína": de acordo com a presente invenção, um
- 5 "peptídio" ou "proteína" compreende uma fita de pelo menos três amino-ácidos ligados em conjunto através de ligações de peptídio. Os termos "peptídio" e "proteína" podem ser usados de forma intercambiável. Os peptídios contem de preferência somente amino-ácidos naturais, embora amino-ácidos não-naturais (isto é, compostos que não ocorrem na natureza, porém
- 10 que podem ser incorporados dentro de uma cadeia de polipeptídio) e/ou análogos de amino-ácidos, como são conhecidos na técnica, possam ser alternativamente empregados. Também, um ou mais dos amino-ácidos em um peptídio pode ser modificado, por exemplo, através da adição de uma
- 15 entidade química tal como um grupo de carboidrato, um grupo de fosfato, um grupo de farnesila, um grupo de isofarnesila, um grupo de ácido graxo, um ligante para conjugação, funcionalização, ou outra modificação, etc. Em determinadas modalidades, as modificações do peptídio levam a um peptídio mais estável (por exemplo, uma maior meia-vida in vivo). Essas modificações podem incluir a ciclização do peptídio, a incorporação de amino-ácidos
- 20 D, etc. Nenhuma das modificações devem substancialmente interferir com a atividade biológica desejada do peptídio. Em determinadas modalidades, o peptídio se refere ao depsipeptídio.

"Romidepsina": o termo "romidepsina" se refere a um produto natural da estrutura química:



A romidepsina é um inibidor potente HDAC e também é conhecida na técnica pelos nomes de FK228, FR901228, NSC630176, ou depsipeptídeo. A preparação e a identificação da romidepsina estão descritas na Patente U.S. 4.977.138, que fica incorporada aqui, por referência. A fórmula molecular é $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$; e o peso molecular é 540,71. A Romidepsina tem o nome químico, (1S,4S,10S,16E,21R)-7-[(2Z)-etilideno]-4,21-diisopropila-2-oxa-12,13-ditia-5,8,20,23-tetra-azabicyclo[8.7.6]tricos-16-eno-3,6,9,19,22-pentanona. A romidepsina teve atribuído o número CAS 128517-07-7. Na forma cristalina, a romidepsina é tipicamente um cristal ou um pó cristalino de cor branca a amarela-clara. O termo "romidepsina" engloba este composto e quaisquer formas de sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo. Em determinadas modalidades, o termo "romidepsina" também pode incluir pró-fármacos, ésteres, formas protegidas e derivados da mesma.

Breve Descrição Resumida dos Desenhos

A figura 1 mostra um fluxograma para a purificação da romidepsina a partir de uma cultura de *Chromobacterium violaceum*.

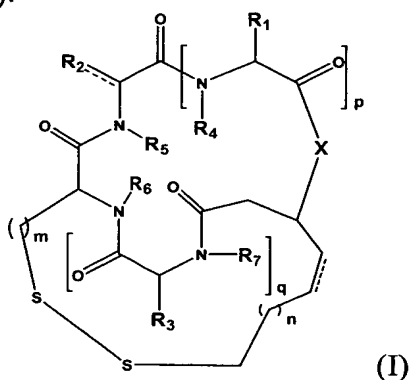
Descrição Detalhada de Determinadas Modalidades da Invenção

A presente invenção proporciona um sistema aperfeiçoado para a preparação da romidepsina, um inibidor conhecido da histona desacetilase (HDAC) útil para o tratamento de câncer. Infelizmente, os métodos publicados para a preparação da romidepsina não produzem de modo reproduzível a romidepsina monomérica pura. Surpreendentemente, o controle do pH durante o processo de purificação foi descoberto como provendo a romidepsina monomérica pura de forma reproduzível. Especificamente, executando pelo menos determinadas porções do processo de purificação em um pH aparente reduzido (por exemplo, um pH aparente variando a partir de 4 até 6), resulta na produção mais elevada de romidepsina monomérica purificada sem os produtos colaterais contaminantes dimerizados, oligomerizados ou polimerizados.

A romidepsina é um depsipeptídeo cíclico que tem uma ligação de dissulfeto. A presente invenção é baseada na descoberta de que a exposição da romidepsina a condições básicas (por exemplo, maiores do que um

pH aparente de ~ 7) facilita a redução dessa ligação de dissulfeto. A romidepsina reduzida com os seus tióis livres foi descoberta como sendo suscetível à dimerização, oligomerização ou polimerização. Esses adutos são tipicamente insolúveis e difíceis de serem removidos a partir da romidepsina purificada. Em determinadas modalidades, esses adutos contaminantes impedem uma preparação da romidepsina de satisfazer as especificações desejadas (por exemplo, solubilidade, grau de pureza, rotação ótica, etc.). Nas composições farmacêuticas, esses adutos diminuem a pureza do agente ativo, a romidepsina. Uma vez que a romidepsina está sendo usada como um agente farmacêutico em seres humanos, é importante que a romidepsina monomérica pura, estável seja obtida de forma reproduzível a partir de uma fermentação de *Chromobacterium violaceum*. A presente invenção aparece a partir do reconhecimento de que condições alcalinas ocasionem a formação de tais adutos indesejáveis da romidepsina e proporciona uma nova solução para esse problema.

O sistema da invenção também é útil para a preparação de derivados da romidepsina, especificamente de derivados que contenham uma ligação de dissulfeto. Em determinadas modalidades, o derivado da romidepsina tem a fórmula (I):



na qual

m é 1, 2, 3 ou 4;

n é 0, 1, 2 ou 3;

p e q são independentemente 1 ou 2;

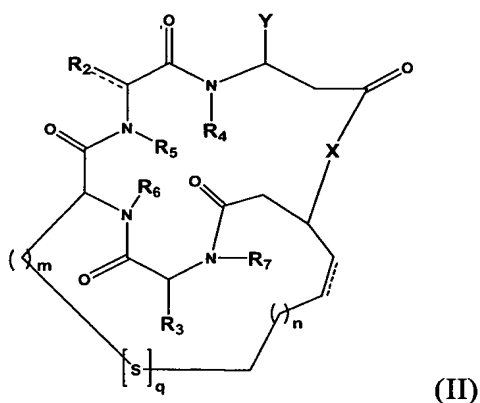
X é O, NH, ou NR₈;

R₁, R₂, e R₃ são independentemente hidrogênio; alifáticos não-

substituídos ou substituídos, ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; heteroalifáticos não-substituídos ou substituídos, ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; arila não-substituída ou substituída; ou heteroarila não-substituída ou substituída;

- 5 R_4, R_5, R_6, R_7 e R_8 são independentemente hidrogênio; ou alifáticos substituídos ou não-substituídos, ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; e os sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Em determinadas modalidades, m é 1. Em determinadas modalidades, n é 1. Em determinadas modalidades, p é 1. Em determinadas modalidades, q é 1.
- 10 determinadas modalidades, X é O. Em determinadas modalidades, R_1, R_2 , e R_3 são alifáticos acíclicos não-substituídos, ou substituídos, ramificados ou não-ramificados. Em determinadas modalidades, R_4, R_5, R_6 , e R_7 são todos hidrogênio.

- Em determinadas modalidades, o derivado da romidepsina é da
- 15 fórmula (II):



em que

m é 1, 2, 3 ou 4;

n é 0, 1, 2 ou 3;]

q é 2 ou 3;

20 X é O, NH, ou NR_8 ;

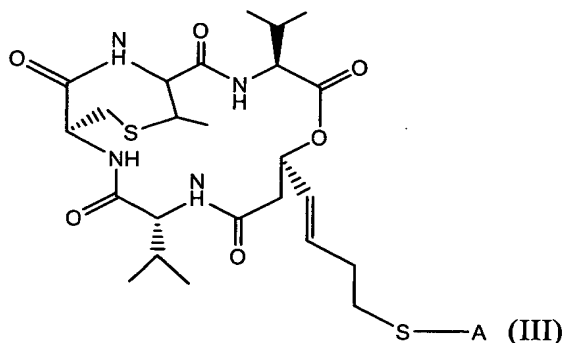
Y é OR_8 , ou SR_8 ;

R_2 e R_3 são independentemente hidrogênio; alifáticos não-substituídos ou substituídos, ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; heteroalifáticos não-substituídos ou substituídos, ramificados ou não-

ramificados, cíclicos ou acíclicos; arila não-substituída ou substituída; ou heteroarila não-substituída ou substituída;

R_4 , R_5 , R_6 , R_7 and R_8 são independentemente selecionados a partir de hidrogênio; ou alifático substituídos ou não-substituídos, ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; e os sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo. Em determinadas modalidades, m é 1. Em determinadas modalidades, n é 1. Em determinadas modalidades, q é 2. Em determinadas modalidades, X é O. Em outras modalidades, X é NH. Em determinadas modalidades, R_2 e R_3 são alifáticos acíclicos não-substituídos ou substituídos, ramificados ou não-ramificados. Em determinadas modalidades, R_4 , R_5 , R_6 , e R_7 são todos hidrogênio.

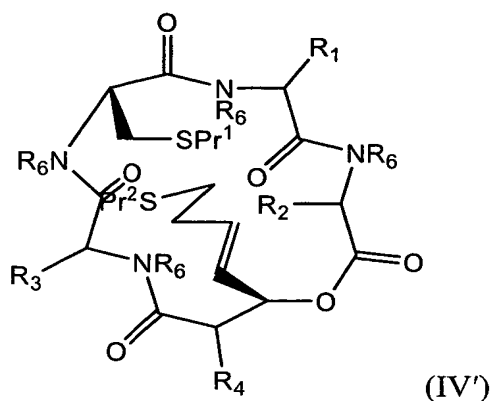
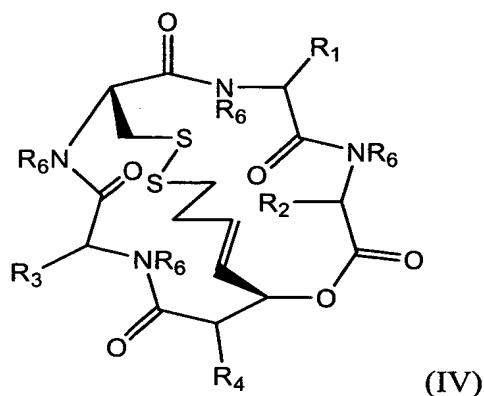
Em determinadas modalidades, o derivado da romidepsina é da fórmula (III):



na qual A é uma porção que é clivada sob condições fisiológicas para dar um grupo tiol e inclui, por exemplo, uma porção acila alifática ou aromática (para a formação de uma ligação de tioéster); um tióxi alifático ou aromático (para a formação de uma ligação de dissulfeto); ou similares; e racematos, enantiômeros, isômeros, tautômeros, sais, ésteres, e pró-fármacos dos mesmos. Esses grupos alifáticos ou aromáticos podem incluir um grupo alifático substituído ou não-substituído, ramificado ou não-ramificado, cíclico ou acíclico; um grupo aromático substituído ou não-substituído; um grupo heteroaromático substituído ou não-substituído; ou um grupo heterocíclico substituído ou não-substituído. A pode ser, por exemplo, $-\text{COR}_1$, $-\text{SC}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}_1$, ou $-\text{SR}_2$. R_1 é independentemente hidrogênio; amino substituído ou não-substituído; alifáticos substituídos ou não-substituídos,

ramificados ou não-ramificados, cíclicos ou acíclicos; um grupo aromático substituído ou não-substituído; um grupo heteroaromático substituído ou não-substituído; ou um grupo heterocíclico substituído ou não-substituído. Em determinada modalidade, R_1 é hidrogênio, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, benzila, ou bromobenzila. R_2 é um grupo alifático substituído ou não-substituído, ramificado ou não-ramificado, cíclico ou acíclico; um grupo aromático substituído ou não-substituído; um grupo heteroaromático substituído ou não-substituídos; ou um grupo heterocíclico substituído ou não-substituído. Em determinadas modalidades, R_2 é metila, etila, 2-hidroxietila, isobutila, ácidos graxos, um benzila substituída ou não-substituída, uma arila, cisteína, homocisteína, ou glutatona substituída ou não-substituída.

Em determinadas modalidades, o derivado da romidepsina é das fórmulas (IV ou IV'):



nas quais R_1 , R_2 , R_3 , e R_4 são o mesmo ou diferentes e representam uma porção de cadeia lateral de amino-ácido, cada R_6 é o mesmo ou é diferente e representa hidrogênio ou C_1 - C_4 alquila, e Pr^1 e Pr^2 são o mesmo ou são

diferentes e representam hidrogênio ou um grupo de proteção de tiol. Em determinadas modalidades, as porções de cadeia lateral de amino-ácidos são aqueles derivados a partir de amino-ácidos naturais. Em outras modalidades, as porções laterais da cadeia de amino-ácidos são aqueles derivados a partir de amino-ácidos não-naturais. Em determinadas modalidades, cada cadeia lateral de amino ácido é uma porção selecionada a partir de -H, -C₁-C₆ alquila, -C₂-C₆ alquenila, -L-O-C(O)-R', -L-C(O)-O-R", -L-A, -L-NR"R", -L-Het-C(O)-Het-R", e -L-Het-R", nas quais L é um grupo de C₁-C₆ alquileno, A é fenila ou um grupo de heteroarila de 5- ou 6- elementos, cada um de R' é o mesmo ou é diferente e representa C₁-C₄ alquila, cada um de R" é o mesmo ou é diferente e representa H ou C₁-C₆ alquila, cada um de -Het- é o mesmo ou é diferente e é um espaçador de heteroátomo selecionado a partir de -O-, -N(R'''), e -S-, e cada um de R''' é o mesmo ou é diferente e representa H ou C₁-C₄ alquila. Em determinadas modalidades, R₆ é -H. Em determinadas modalidades, Pr¹ e Pr² são os mesmos ou são diferentes e são selecionados a partir de hidrogênio e de um grupo de proteção selecionado a partir de um grupo benzila, o qual é opcionalmente substituído com C₁-C₆ alcóxi, C₁-C₆ acilóxi, hidróxi, nitro, picolila, picolila-N-óxido, antrilmetila, difenilmetila, fenila, t-butila, adamantila, C₁-C₆ aciloximetila, C₁-C₆ alcóximetila, tetrahidropirranila, benziltiometila, feniltiometila, tiazolidina, acetamidometila, benzamidometila, butoxicarbonila terciário (BOC), acetila e os derivados do mesmo, benzoila e os derivados do mesmo, carbamoila, fenilcarbamoila, e C₁-C₆ alquilacarbamoila. Em determinadas modalidades, Pr¹ e Pr² são hidrogênio. Diversos derivados da Romidepsina das fórmulas (IV) e (IV') estão descritos no Pedido de Patente PCT WO 2006/129105, publicado em 7 de dezembro de 2006; que fica incorporado aqui, por referência.

A presente invenção também é útil para a preparação de outros produtos naturais que contenham uma ligação de dissulfeto. A invenção pode ser usada para a preparação de peptídios cíclicos ou acíclicos. Em determinadas modalidades, os peptídios cíclicos que contêm uma ligação de dissulfeto são purificados com a utilização do sistema da invenção. Em determinadas modalidades, outros depsi-peptídios, além da romidepsina, são

purificados com base na presente invenção com a utilização de uma redução do pH aparente para limitar ou eliminar a redução de uma ligação intramolecular de dissulfeto.

De acordo com a invenção, a formação de adutos indesejáveis da romidepsina ou de um derivado da romidepsina pode ser evitada através de não permitir que a romidepsina seja preparada ou purificada sob condições maiores do que um pH aparente de ~7,0, mais preferencialmente maiores do que um pH aparente de ~6,5, ou de maior preferência maior do que um pH aparente de ~6,0. A preparação e a purificação é tipicamente mantida entre aproximadamente um pH aparente de 4,0 e um pH aparente de 6,0. Em determinadas modalidades, um pH aparente ainda mais baixo pode ser usado. Esse reconhecimento pode ser aplicado a qualquer método de produção ou de purificação para a preparação da romidepsina. Em determinadas modalidades, a romidepsina é purificada a partir de uma fermentação. Em outras modalidades, a romidepsina é preparada através da semissíntese ou da síntese total. Esta descoberta também pode ser aplicada com relação à preparação e/ou a produção de análogos ou derivados da romidepsina (por exemplo, sais, ésteres, pró-fármacos, isômeros, enantiômeros, tautômeros, formas protegidas, produtos derivatizados, etc.). Determinados derivados da romidepsina estão descritos aqui,.

Os processos para a preparação da romidepsina são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Ueda *et al.*, *J. Antibiot.* (Tokyo) 47: 301-310, 1994; Nakajima *et al.*, *Exp. Cell Res.* 241: 126-133, 1998; WO 02/20817; Patente U.S. 4.977.138; cada uma das quais fica incorporada aqui, por referência.

Uma vez que a romidepsina é um produto natural, ela é preparada tipicamente através do isolamento da mesma a partir de uma fermentação de um micro-organismo que produz a mesma. Em determinadas modalidades o micro-organismo pertence ao gênero *Chromobacterium*. Um micro-organismo de exemplo que é conhecido para a produção da romidepsina é o *Chromobacterium violaceum*. Qualquer variante natural ou feita pelo homem do *Chromobacterium violaceum* pode ser usada para isolar a romidepsina

com a utilização do sistema da invenção. Em determinadas modalidades, a cepa de *Chromobacterium violaceum* é a *Chromobacterium violaceum* WB968. Em determinadas modalidades, a cepa da *Chromobacterium violaceum* é uma cepa mutante da *Chromobacterium violaceum* WB968. Em determinadas modalidades, o micro-organismo é geneticamente manipulado para a produção da romidepsina. Por exemplo, os genes responsáveis com relação ao mecanismo celular que produz a romidepsina podem ser colocados dentro de outros micro-organismos, tais como bactérias ou fungos.

O organismo é cultivado sob condições adequadas para a sua produção de romidepsina. De preferência, as condições de cultura são otimizadas para a produção de um nível elevado de romidepsina com níveis mínimos de adutos de contaminação ou de degradantes. O meio de cultura inclui, de preferência, uma fonte de carbono e de nitrogênio e quaisquer vitaminas e minerais essenciais. A cultura é tipicamente cultivada sob condições aeróbicas. O tamanho da cultura pode variar a partir de 10 ml até 10.000 l ou ainda maior. Em determinadas modalidades, o volume da cultura é maior do que 500 l. Em outras modalidades, o volume é maior do que 1000 l. Em ainda outras modalidades, o volume é maior do que 2000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 3000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 5000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 6000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 7000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 8000 litros. Em outras modalidades, o volume é maior do que 9000 litros. Em determinadas modalidades, o volume da cultura varia aproximadamente de 5000 litros até aproximadamente 10000 litros. Frascos de agitação, fermentadores, bio reatores ou qualquer outra aparelhagem útil para a fermentação de micro-organismos pode ser usada. Na forma apropriada, as culturas de semente e culturas de pequenos fermentadores são usadas para semear culturas maiores.

Em determinadas modalidades, um agente de antiformação de espuma (por exemplo, o antiformador de espuma de polialquilenoglicol (Adekanol LG-109)) é usado em culturas maiores. Outros agentes de anti-

formação de espuma comercialmente disponíveis também podem ser usados. Os agentes anti-formação de espuma são especificamente úteis quando é usado um fermentador para a produção da romidepsina.

A fonte de carbono no meio de cultura pode ser qualquer carboidrato. Em determinadas modalidades, a fonte de carbono é um monossacarídeo ou um dissacarídeo (por exemplo, a glicose). Em determinadas modalidades específicas, a fonte de carbono é a glicose ou a maltodextrina. Outros carboidratos tais como o amido, maltose, frutose ou glicerina podem ser usados em determinadas modalidades. Em determinadas modalidades, a fonte de nitrogênio é um sal de amônio tal como o sulfato de amônio, nitrato de amônio, fosfato de amônio, etc. Em outras modalidades, a fonte de nitrogênio é uma peptona vegetal (por exemplo, a polipeptona NS, água de maceração de milho, Hinute R). Outras fontes de nitrogênio que podem ser usadas incluem caldo ("bouillon"), extrato de fermento, peptona de soja, farelo de glúten, farinha de sementes de algodão, farelo de soja, fermento seco e germe de trigo. Em determinadas modalidades, a fonte de nitrogênio é a uréia ou amino-ácidos. Em determinadas modalidades, a fonte de nitrogênio é uma molécula orgânica pequena que contenha nitrogênio. Em determinadas modalidades, o meio é suplementado com aminoácidos. Por exemplo, o meio pode ser suplementado com L-arginina, L-histidina ou L-cisteína. Em determinadas modalidades, o meio é suplementado com L-cisteína. Ver a WO 02/20817; incorporada aqui, por referência. Em determinadas modalidades o meio é suplementado com L-cisteína e L-valina. Essa suplementação é considerada como aumentando a quantidade de romidepsina produzida na fermentação, e/ou reduzindo a quantidade de substâncias relacionadas e/ou degradantes. O meio de cultura pode incluir minerais tais como o magnésio (por exemplo, o sulfato de magnésio) e fosfato (por exemplo, o di-hidrogenofosfato de potássio, hidrogênio-fosfato de dissódio). Em determinadas modalidades, o meio de cultura inclui glicose, peptona vegetal (polipeptona NS) ou água de maceração de milho (CSL), sulfato de magnésio e água. Em determinadas modalidades, o meio de cultura inclui glicose, polipeptona (polipeptona NS), sulfato de magnésio, um agente anti-formação de

espuma, e água. Em determinadas modalidades, o meio de cultura inclui glicose (0,45 a 1,0%), peptona vegetal (polipeptona NS) ou CSL (0,9 a 4,0%), sulfato de magnésio (0,0054 a 0,010%), um agente anti-formação de espuma (0,09% a 0,11%) e água (o restante). Em determinadas modalidades, o meio de cultura inclui glicose, amido oxidado (por exemplo, Pinodex # 100) ou maltodextrina, peptona de soja (por exemplo, Hinute R), sulfato de amônio, sulfato de magnésio, di-hidrogeno fosfato de potássio, hidrogeno fosfato de dissódio, agente anti-formação de espuma (por exemplo, Adekanol LG-109), L-cisteína, L-valina, e água. Em determinadas modalidades, o meio de cultura inclui glicose (2 a 10%), amido oxidado (por exemplo, Pino-dex # 100) ou maltodextrina (1 a 15%), peptona de soja (por exemplo, Hinute R)(1 a 6%), sulfato de amônio (0 a 0,5%), sulfato de magnésio (0 a 2%), di-hidrogeno fosfato de potássio (0,275 a 1,65%, hidrogeno fosfato de dissódio) (0,18 a 1,8%), agente anti-formação de espuma (por exemplo, Adekanol LG-109) (0,2 a 0,66%), L-cisteína (0,30 mM), L-valina (0 a 15 mM), e água.

A cultura é tipicamente cultivada sob condições (por exemplo, temperatura, pH, concentração de oxigênio, etc.), adequadas para a cultura do organismo. Em determinadas modalidades, o pH da cultura é monitorado e/ou ajustado. O pH da cultura pode variar a partir de um pH de 5,0 até 7,5. Qualquer organismo para a produção da romidepsina terá uma temperatura de preferência para crescimento dependendo das condições sob as quais a cultura é cultivada. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura que varia a partir de 15°C até 37°C, de preferência a partir de 23°C até 32°C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura entre 18°C até 27°C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 18 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 19 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 20 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 21 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 22 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultiva-

da em uma temperatura de aproximadamente 23 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 24 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 25 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 26 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 27 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 28 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 29 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 30 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 31 °C. Em determinadas modalidades, a cultura é cultivada em uma temperatura de aproximadamente 32 °C.

A concentração de oxigênio na cultura é mantida em um nível que varia a partir de 10 a 50%. Em determinadas modalidades, a concentração de oxigênio é mantida acima de 20%. O nível de oxigênio é mantido através de aeração, pressão e/ou agitação.

A cultura resultante é tipicamente cultivada durante aproximadamente de 10 até 100 horas. A cultura pode ser colhida depois de 20, 30, 40, 50, 60, 70 ou 80 horas. Em determinadas modalidades, a cultura é colhida depois de aproximadamente 30, 35, 40, 45 ou 50 horas. Em determinadas modalidades, a cultura é colhida em aproximadamente 36 horas. Em determinadas modalidades, a cultura é colhida em aproximadamente 50 horas. Tipicamente a cultura é cultivada até a saturação. Uma vez que a romidepsina é um metabólito secundário, os rendimentos máximos são derivados a partir das últimas etapas da cultura. Em algumas modalidades, a cultura é colhida em fase log. Como poderá ser apreciada por uma pessoa versada na técnica, a cultura é tipicamente colhida antes que quantidades significativas de degradantes sejam formadas. O tempo da colheita pode ser determinado de forma empírica através da análise de uma amostra da fermentação para a produção da romidepsina. Em determinadas modalidades, a cultura é co-

lhida quando a titulação da romidepsina atinge entre 0,5 e 1,5 kg. Em determinadas modalidades, a cultura é colhida quando a titulação atinge pelo menos 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, ou 1,1 g/kg. Em determinadas modalidades, a cultura é colhida quando a titulação atinge pelo menos 0,8 g/kg. A amostra também pode ser analisada com relação a substâncias relacionadas ou degradantes, e a cultura colhida quando um nível desejado de romidepsina, nível desejado de substâncias relacionadas ou degradantes ou uma proporção das duas é alcançado. O tempo da colheita também pode ser determinado com base no consumo de um componente no meio tal como a glicose. Em outras modalidades, o tempo de colheita é baseado sobre a produção de um metabólito. O tempo da colheita pode ser determinado com base sobre uma combinação dos critérios acima.

Depois que a cultura é cultivada durante uma quantidade de tempo suficiente, a cultura é colhida. A romidepsina desejada pode ser encontrada no meio de cultura bem como nas células da cultura. As células são opcionalmente mortas e/ou lisadas antes da purificação. Em determinadas modalidades, as células são mortas com a adição de um ácido tal como o ácido sulfúrico. Em determinadas modalidades, o pH é abaixado para aproximadamente o pH 2,0 a 3,0.

O material resultante é em seguida opcionalmente reduzido em volume. A romidepsina é purificada através de qualquer técnica de purificação conhecida na técnica para a purificação de peptídios, produtos naturais e/ou moléculas orgânicas. As técnicas de purificação de exemplo incluem a cromatografia em batelada, cromatografia de coluna e cristalização. O processo de purificação pode incluir uma ou mais etapas com a finalidade de alcançar o grau de purificação desejado. Em determinadas modalidades o material extraído é purificado com a utilização de uma resina de absorção não-iônica. Em determinadas modalidades, é usada uma resina de fase reversa na etapa de fracionamento. Em determinadas modalidades específicas, são usadas etapas múltiplas de cromatografia de coluna com a utilização de uma resina de fase reversa. As resinas úteis para o processo de purificação, a título de exemplo, incluem alumina, sílica-gel, Sepabeads SP850,

Diaion HP20SS, and Diaion HP20. Em determinadas modalidades, a Diaion HP20SS e/ou a Diaion HP20 são obtidas da Mitsubishi Chemical Corporation. Em determinadas modalidades, a alumina é usada como o material da coluna. Em determinadas modalidades, o sílica-gel é usado como a resina.

- 5 Em determinadas modalidades, uma ou mais etapas da cromatografia de coluna são executadas em um pH aparente de menos do que 6,0. Em determinadas modalidades, uma ou mais dessas etapas é executada em um pH aparente entre 4,0 e 6,0. Em determinadas modalidades, todas as etapas da cromatografia de coluna são executadas em um pH aparente de menos
- 10 do que 6,0. Em determinadas modalidades, todas as etapas da cromatografia de coluna são executadas em um pH aparente que varia a partir de 4,0 até 6,0.

- Em determinadas modalidades, a purificação da romidepsina envolve a purificação do material extraído com a utilização de mais do que
- 15 uma etapa de cromatografia em batelada ou de coluna. Em determinadas modalidades, uma etapa de cromatografia em batelada é seguida por etapas de cromatografia de coluna. Em determinadas modalidades, o material extraído é purificado através de cromatografia em batelada com Sepabeads SP850, seguida por uma coluna empacotada com Diaion HP20SS, seguida
- 20 por uma coluna empacotada com Diaion HP20, e finalmente por uma coluna empacotada com alumina. Todas essas etapas de cromatografia são executadas de preferência em um pH aparente variando a partir de 4,0 até 6,0. Em outras modalidades, o material extraído é purificado com a utilização de uma coluna empacotada com Diaion HP20, seguida por uma coluna empacotada
- 25 com Diaion HP20SS, e finalmente seguida por outra coluna empacotada com Diaion HP20. Nesse processo alternativo de purificação, todas as etapas da cromatografia de coluna são executadas de preferência em um pH aparente variando a partir de 4,0 até 6,0. Cada uma das colunas é opcionalmente lavada com água ou com outra solução aquosa seguida pela eluição
- 30 da romidepsina com a utilização de uma solução aquosa de um solvente orgânico (por exemplo, a acetona). Em determinadas modalidades, o material extraído é purificado com a utilização de sílica-gel. A cromatografia sobre

sílica-gel também pode ser usada como uma etapa adicional de purificação em conjunto com cromatografia usando outras resinas ou materiais de empacotamento. Em determinadas modalidades, o material extraído é purificado com a utilização de alumina. A cromatografia com alumina também pode ser usada como uma etapa adicional de purificação em conjunto com a cromatografia utilizando outras resinas ou materiais de empacotamento.

Em determinadas modalidades, o material com a romidepsina bruta é empacotado sobre uma matriz pré-equilibrada em um pH aparente de menos do que 6,0, de preferência com um pH aparente variando a partir de 4,0 até 6,0. A matriz é em seguida lavada para a remoção das impurezas. Tipicamente, a lavagem da matriz é feita com uma solução mais polar (isto é, uma percentagem maior de água) do que a da eluição da romidepsina. Por exemplo, a matriz pode ser lavada com até de 25 a 50% de acetona aquosa seguida pela eluição da romidepsina com 50 até 100% de acetona aquosa. Como poderá ser apreciado por aquelas pessoas versadas na técnica, os solventes de lavagem e de eluição são determinados pela matriz usada e a polaridade do composto.

Em determinadas modalidades, uma ou mais das etapas da cromatografia (incluindo a carga, lavagem e eluição da resina) são executadas em um pH aparente de menos do que 6,0. Em determinadas modalidades específicas, as etapas da cromatografia são executadas em um pH aparente que varia a partir de 3,0 até 6,0. Em outras determinadas modalidades, as etapas da cromatografia são executadas em um pH aparente que varia a partir de 4,0 até 6,0. O pH aparente da solução empacotada sobre a matriz pode ser ajustado para o pH aparente desejado com a adição de um ácido. Qualquer um dos ácidos descritos aqui, pode ser usado para o abaixamento do pH aparente da solução. O pH aparente das soluções de lavagem e de eluição, também pode ser ajustado para o pH aparente desejado. Em determinadas modalidades, o pH aparente de todas as soluções que contenham a romidepsina é mantido abaixo de um pH aparente de aproximadamente 6,0, impedindo, por meio disso, a formação de adutos indesejáveis. Em determinadas modalidades, o pH aparente da solução é tamponado em um pH

aparente que varia a partir de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0. Em determinadas modalidades, o pH aparente das soluções de acetona e água é ajustado para o pH aparente desejado com a utilização de ácido acético, ácido clorídrico, tampão de acetato de amônia, ou ácido cítrico. Em determinadas modalidades, é usado um sistema de tamponamento de acetato.

A romidepsina pode alternativamente ou adicionalmente ser purificada através de cristalização. A purificação por cristalização pode ser usada em conjunto com outros métodos de purificação incluindo a cromatografia de coluna e/ou em batelada. Em determinadas modalidades, a cristalização é usada depois da purificação por cromatografia de coluna e/ou em batelada. Em determinadas modalidades específicas, a cristalização é realizada depois da purificação através de cromatografia de coluna e/ou em batelada, como descrito acima. A cristalização pode ter lugar em qualquer solvente adequado. A romidepsina é, de preferência, minimamente solúvel no solvente. Em determinadas modalidades, o solvente de cristalização é um álcool. Em determinadas modalidades, o solvente de cristalização é o metanol. Em determinadas modalidades, o solvente de cristalização é o etanol. Em determinadas modalidades, é usado um sistema de solventes misto. O solvente de cristalização pode ser uma mistura de álcool e água. Em outras modalidades, o solvente de cristalização é uma mistura de acetona e água. Em determinadas modalidades específicas, a romidepsina é dissolvida em uma solução aquosa de acetona (por exemplo, 85% de acetona) e precipitada através da adição lenta de água. Em determinadas modalidades, a romidepsina é dissolvida em um solvente (por exemplo, metanol), e a solução resultante é concentrada, fazendo com que a romidepsina se cristalice. Em outras modalidades, a romidepsina é dissolvida em uma mistura de água e um solvente orgânico (por exemplo, acetona aquosa à 85%), e a romidepsina é precipitada através da adição de água. Os cristais obtidos a partir da etapa de cristalização são tipicamente coletados por filtração e opcionalmente lavados e secos. Em determinadas modalidades, o pH aparente dos solventes de cristalização é abaixo de 6,0. Em determinadas modalidades específicas,

o pH aparente do solvente fica entre 4,0 e 6,0. Qualquer lavagem dos cristais resultantes também é executada em um pH aparente reduzido (por exemplo, entre um pH aparente de 4,0 e 6,0).

5 Alternativamente ou adicionalmente, o armazenamento ou o tempo de retenção da romidepsina durante o processo de cristalização é de menos do que cerca de 20 horas. Em determinadas modalidades, o armazenamento ou o tempo de retenção é de menos do que 5 horas. Em determinadas modalidades específicas, o processo de cristalização é realizado imediatamente quando da formação da solução de cristalização.

10 A invenção proporciona a romidepsina purificada isenta ou substancialmente isenta de adutos indesejáveis. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 98% isenta de adutos contaminantes, pelo menos 99% isenta de adutos contaminantes, ou pelo menos 99,5% isenta de adutos. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 98%
15 monomérica, pelo menos 99% monomérica, ou pelo menos 99,5% monomérica. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,9% monomérica. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,95% monomérica. Em determinadas modalidades, a romidepsina não inclui romidepsina dimerizada, oligomerizada ou polimerizada que possa ser
20 detectada.

Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 98% pura, pelo menos 99% pura ou pelo menos 99,5% pura. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,7% pura. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,8% pura. Em determinadas
25 modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,9% pura. Em determinadas modalidades, a romidepsina é pelo menos 99,95% pura. Em determinadas modalidades específicas, a romidepsina contém menos do que 0,2% de "outras desconhecidas". Em determinadas modalidades específicas, a romidepsina contém menos do que 0,1% de impurezas denominadas de "outras desconhecidas". Essa romidepsina altamente purificada é útil para a prepa-
30 ração de composições farmacêuticas. Essas composições são especificamente úteis para o tratamento do câncer e de outras doenças proliferativas.

A composição também pode ser usada em outras doenças que podem ser tratadas através da inibição da atividade da desacetilase histona. A composição também pode ser usada em outras doenças que podem ser tratadas através da inibição da atividade de desacetilase tubulina. A composição também pode ser usada em outras doenças que podem ser tratadas através da inibição da atividade de desacetilase. A romidepsina purificada da invenção também é útil para as finalidades de pesquisa.

A pureza da romidepsina pode ser avaliada com a utilização de qualquer método conhecido na técnica. Os métodos para a avaliação da pureza incluem a aparência, HPLC, rotação específica, espectroscopia RMN, espectroscopia IV espectroscopia UV visível, análise por difração de raios X sobre pó (XRPD), análise de elementos, espectroscopia de massa LC, e espectroscopia de massa. Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de HPLC, que tem um limite de detecção de impurezas de aproximadamente 0,05%. Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de espectroscopia RMN. Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de espectroscopia IV Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de espectroscopia de UV visível. Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de análise por XRPD.

Em determinadas modalidades, a pureza é avaliada através de rotação específica em um solvente apropriado. Em determinadas modalidades o solvente usado para a rotação específica é o clorofórmio (CHCl_3). Em outras modalidades, o solvente usado é um álcool tal como o metanol ou etanol. Em ainda outras modalidades, o solvente usado é a água ou uma solução de água e álcool. Em determinadas modalidades, a rotação específica é verificada com a utilização de um método de compêndio tal como aquele descrito nas U.S. Pharmacopeia, European Pharmacopeia, JP Pharmacopeia, or British Pharmacopeia. Em determinadas modalidades, a rotação específica é executada com a utilização de uma solução de romidepsina em clorofórmio. A concentração da solução pode variar a partir de 5 mg/ml até 30 mg/ml. Em determinadas modalidades, a concentração é de aproximadamente 20 mg/ml. A rotação da romidepsina varia a partir de $\pm 38^\circ$ até $\pm$

47°. Em determinadas modalidades, a rotação específica varia a partir de $\pm 39^\circ$ até $\pm 41^\circ$. Em determinadas modalidades, a rotação específica varia a partir de $\pm 40,0^\circ$ até $\pm 40,5^\circ$. Em determinadas modalidades específicas, a rotação específica é de aproximadamente $\pm 40^\circ$. Foi descoberto que a presença adutos contaminantes resulta em um precipitado quando a romidepsina é dissolvida em clorofórmio.

Quando em solução, a romidepsina é armazenada de preferência em um pH aparente abaixo de aproximadamente 6,0. Em determinadas modalidades, o pH aparente varia a partir de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0. Em determinadas modalidades, uma formulação ou preparação de romidepsina é tamponada para impedir que o pH aparente se eleve acima de 7,0, mais preferencialmente acima de 6,0. Em determinadas modalidades, a formulação ou preparação é tamponada para um pH aparente variando a partir de aproximadamente 4,0 até aproximadamente 6,0.

Usos

A romidepsina preparada como descrito aqui, pode ser usada *in vitro* ou *in vivo*. A romidepsina é especificamente útil para o tratamento de neoplasmas *in vivo*. No entanto, a combinação também pode ser usada *in vitro* para finalidades de pesquisa ou clínicas (por exemplo, para a determinação da suscetibilidade da doença de um paciente com relação à romidepsina). Em determinadas modalidades, o neoplasma é um neoplasma benigno. Em outras modalidades, o neoplasma é um neoplasma maligno. Qualquer câncer pode ser tratado com a utilização da romidepsina de forma isolada ou em combinação com outro agente farmacêutico.

Em determinadas modalidades, a malignidade é uma malignidade hematológica. As malignidades hematológicas são tipos de cânceres que afetam o sangue, a medula óssea, e/ou os nódulos linfáticos. Os exemplos de malignidades hematológicas que podem ser tratadas com a romidepsina incluem porém não estão limitados a leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielogênica aguda (AML), leucemia mielogênica crônica (CML), leucemia linfócita aguda (CLL), leucemia de célula de cabelo, linfoma Hodgkin, linfoma não Hodgkin, linfoma de célula T cutânea (CTCL), linfoma de célula

T periférica (PTCL), mieloma múltiplo e síndrome mielodisplásica. Em determinadas modalidades, a combinação da invenção é usada para o tratamento mieloma múltiplo. Em determinadas modalidades, o câncer é um mieloma múltiplo relapso e/ou refratário. Em outras modalidades, a combinação da invenção é usada para o tratamento da leucemia linfócita crônica (CLL). Em determinadas modalidades específicas, o câncer é a CLL relapsa e/ou refratária. Em outras modalidades, a combinação da invenção é usada para o tratamento da leucemia mielogênica crônica (CML). Em determinadas modalidades, a combinação da invenção é usada para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (ALL). Em determinadas modalidades, a combinação da invenção é usada para o tratamento da leucemia mielogênica aguda (AML). Em determinadas modalidades, o câncer é o linfoma da célula T cutânea (CTCL). Em outras modalidades, o câncer é o linfoma da célula T periférica (PTCL). Em determinadas modalidades, o câncer é uma síndrome mielodisplásica.

Outros cânceres além das malignidades hematológicas também podem ser tratados com a utilização da romidepsina. Em determinadas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Os cânceres que podem ser tratados, a título de exemplo, com a utilização da terapia de combinação incluem o câncer do cólon, câncer do pulmão, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer do estômago, câncer de esôfago, câncer de pele, câncer do cérebro, câncer do fígado, câncer do ovário, câncer cervical, câncer do útero, câncer do testículo, câncer da próstata, câncer da bexiga urinária, câncer do rim, câncer neuroendócrino, etc. Em determinadas modalidades, a romidepsina é usada para o tratamento do câncer pancreático. Em determinadas modalidades, a romidepsina é usada para o tratamento do câncer da próstata. Em determinadas modalidades específicas, o câncer da próstata é refratário ao hormônio do câncer da próstata.

No tratamento de neoplasmas tais como o câncer em um sujeito, a romidepsina é tipicamente dosada a 1 a 28 mg/m². Em determinadas modalidades, Romidepsina é dosada a 1 a 15 mg/m². Em determinadas modalidades, Romidepsina é dosada a 5 a 14 mg/m². Em determinadas modali-

dades específicas, a romidepsina é dosada a 8, 10, 12 ou 14 mg/m². A romidepsina é tipicamente administrada em um ciclo de 28 dias com a romidepsina sendo administrada nos dias 1, 8 e 15. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada nos dias 1 e 15 com o dia 8 sendo pulado.

5 Como será notado por uma pessoa versada na técnica, a dosagem e a sincronização da administração de uma dosagem de romidepsina podem variar dependendo do paciente que está sendo tratado. Por exemplo, efeitos colaterais adversos podem ser considerados para o abaixamento da dosagem da romidepsina administrada.

10 A romidepsina também pode ser usada para tratar e/ou matar células *in vitro*. Em determinadas modalidades, uma concentração citotóxica de romidepsina é posta em contato com células com a finalidade de matar as mesmas. Em determinadas modalidades, a concentração da romidepsina varia a partir de 0,01 nM até 100 nM. Em determinadas modalidades, a con-

15 centração da romidepsina varia a partir de 0,1 nM até 50 nM. Em determinadas modalidades, a concentração da romidepsina varia a partir de 1 nM até 10 nM.

Qualquer tipo de célula pode ser testado ou morto com a romidepsina. As células podem ser derivadas a partir de uma fonte animal, vegetal,

20 tal, bacteriana ou de fungos. Em determinadas modalidades, as células são células de animais. Em determinadas modalidades as células são células de mamíferos. Em determinadas modalidades, as células são células de seres humanos. As células podem ser derivadas de um ser humano macho ou fêmea em qualquer estágio de desenvolvimento. Em determinadas modalida-

25 des, as células são células de primatas. Em determinadas modalidades, as células são derivadas a partir de um roedor (por exemplo, camundongo, rato, porquinho da índia, hamster, gerbo). Em determinadas modalidades, as células podem ser derivadas a partir de um animal doméstico tal como um cão, gato, vaca, cabra, porco, etc. As células também podem ser derivadas a par-

30 tir de um animal ou vegetal geneticamente manipulado, tal como um camundongo transgênico.

As células usadas podem ser do tipo natural ou células mutan-

tes. As células podem ser geneticamente manipuladas. Em determinadas modalidades, as células são células normais. Em determinadas modalidades, as células são células neoplásicas. Em determinadas modalidades, as células são células de câncer. Em determinadas modalidades, as células são derivadas a partir de uma malignidade hematológica. Em outras modalidades, as células são derivadas a partir de um tumor sólido. Por exemplo, as células podem ser derivadas a partir de um tumor do paciente (por exemplo, a partir de uma biopsia ou de uma excisão cirúrgica). Esses testes com relação a citotoxidez podem ser úteis para a determinação de se um paciente irá responder a uma terapia de combinação específica. Esse teste pode ser útil na determinação da dosagem necessária para o tratamento da malignidade. Esse teste da susceptibilidade de um câncer de um paciente com relação a romidepsina poderá evitar a administração não necessária de fármacos sem nenhum efeito para o paciente. O teste também pode permitir o uso de doses mais baixas de um ou de ambos os fármacos se o câncer do paciente for especificamente suscetível à romidepsina.

Em outras modalidades, as células são derivadas a partir de linhagens de células de câncer. Em determinadas modalidades, as células são a partir de malignidades hematológicas tais como aquelas discutidas aqui. As linhagens de células da leucemia humana incluem as U937, HL-60, THP-1, Raji, CCRF-CEM, e Jurkat. As linhagens de células CLL a título de exemplo, incluem JVM-3 e MEC-2. As linhagens de células de mieloma, a título de exemplo, incluem MM1.S, MM1.R (resistentes à dexametasona), RPMI8226, NCI-H929, e U266. As linhagens de células de linfoma, a título de exemplo, incluem Karpas, SUDH-6, SUDH-16, L428, KMH2, e a linhagem de células de linfoma de manto Granta. Em determinadas modalidades, as células são células AML ou células de mieloma múltiplo (CD138⁺). Em determinadas modalidades, as células são células-tronco hematopoiéticas ou células progenitoras. Por exemplo, em determinadas modalidades, as células são células progenitoras hematopoiéticas tais como as células CD34⁺ da medula óssea. Em determinadas modalidades, as linhagens de células são resistentes a um agente quimioterapêutico específico. Em outras modalida-

des, a linhagem de células é resistente a esteróides (por exemplo, resistentes à dexametazona). Em determinadas modalidades específicas, as células são células de mieloma múltiplo humano resistentes a esteróides.

Composições Farmacêuticas

- 5 Esta invenção também proporciona composições farmacêuticas que compreendem a romidepsina preparada na forma descrita aqui,. Em determinadas modalidades, as composições exibem atividade citostática ou citotóxica contra células neoplásicas tais como as das malignidades hematológicas. A dosagem de exemplo da romidepsina está descrita acima. Em
- 10 determinadas modalidades, a composição farmacêutica irá incluir a quantidade de romidepsina para uma dose do fármaco. Outras composições farmacêuticas da invenção podem incluir doses múltiplas de romidepsina, tais como o número total de doses necessárias para completar um ciclo de tratamento ou um regime total de tratamento. Em determinadas modalidades, a
- 15 quantidade de romidepsina administrada é suficiente para alcançar níveis citotóxicos (por exemplo, em níveis nanomolares) na corrente sanguínea do sujeito. Em determinadas modalidades, a quantidade administrada é suficiente para chegar a concentrações citotóxicas (por exemplo, em níveisnanomolares) se romidepsina no local do câncer do sujeito.
- 20 As preparações farmacêuticas da invenção também podem incluir outros agentes farmacêuticos de tal forma que a romidepsina e o outro agente possam ser administrados em conjunto. Essas preparações incluem quantidades de cada um dos agentes apropriadas para a administração de ambos. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em
- 25 combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, outro agente citotóxico. Os agentes citotóxicos de exemplo que podem ser administrados em combinação com a romidepsina incluem a gencitabina, decitabina, e flavopiridol. Em outras modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um agente anti-inflamatório, tal como a aspirina,
- 30 ibuprofeno, acetaminofeno, etc., medicação para alívio da dor, anti náusea, ou antipirética. Em outras modalidades determinadas, a romidepsina é administrada em combinação com um agente esteróide (por exemplo, a dexametazona).

metasona). Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um agente para o tratamento de distúrbios gastrointestinais tais como a náusea, vômito e diarreia. Esses agentes adicionais podem incluir antieméticos, antidiarreicos, reposição de fluido, reposição de eletrólito, etc. Em outras modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com uma reposição ou suplementação de eletrólitos, tais como o potássio, magnésio e cálcio, especificamente potássio e magnésio. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um agente antiarrítmico. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um concentrado de plaquetas, por exemplo, um agente que aumente a produção de plaquetas. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um agente para aumentar a produção de células do sangue tal como a eritropoietina. Em determinadas modalidades, a romidepsina é administrada em combinação com um agente para prevenir a hiperglicemia. Em determinadas modalidades, a romidepsina, que possui uma atividade de inibição de HADC, não é administrada com outro inibidor de HDAC.

Também será observado que a romidepsina pode existir na forma livre para o tratamento, ou quando apropriado, como uma forma farmacêuticamente aceitável da mesma. De acordo com a presente invenção, uma forma farmacêuticamente aceitável inclui porém não está limitada a sais farmacêuticamente aceitáveis, ésteres, sais de tais ésteres, ou qualquer outro aduto ou derivado que, quando da administração a um paciente que esteja necessitando seja capaz de prover, diretamente ou indiretamente a romidepsina, ou um metabólito ou resíduo da mesma, por exemplo, um pró-fármaco.

Na forma usada aqui, o termo "sal farmacêuticamente aceitável" se refere à aqueles sais que estão, dentro do âmbito de um julgamento médico acertado, adequados para ser usados em contato com os tecidos de seres humanos e de animais inferiores sem toxidez indevida, irritação, resposta alérgica e similares, e são comensurados com uma proporção risco/benefício razoável. Os sais farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, S. M. Berge, *et al.* descreve os sais

farmaceuticamente aceitáveis em detalhe no *J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1 a 19, 1977; incorporado aqui, por referência. Os sais podem ser preparados in situ durante o isolamento final e a purificação da romidepsina, ou de modo separado através da reação da funcionalidade de base livre com um

5 ácido orgânico ou inorgânico adequado. Os exemplos de sais de adição ácidos não-tóxicos, farmaceuticamente aceitáveis, são os sais de um grupo amino formado com ácidos inorgânicos tais como o ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico e ácido perclórico, ou com ácidos orgânicos tais como o ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tar-

10 tárico, ácido cítrico, ácido succínico, ou ácido malônico ou através da utilização de outros métodos usados na técnica tais como a troca de íons. Os outros sais farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenossulfonato, benzoato, bissulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato,

15 dodecilsulfato, etanossulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicero-fosfato, gluconato, hernissulfato, heptanoato, hexanoato, hidriodeto, 2-hidróxi-etanossulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurila, malato, maleato, malonato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-

20 fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartarato, tiocianato, p-toluenossulfonato, undecanoato, valerato, e similares. Os sais representativos de metal alcalino ou alcalino-terroso incluem os sais de sódio, lítio, potássio, cálcio, magnésio, e similares. Outros sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, quando apropriado, cátions de amô-

25 nio não-tóxico, amônio quaternário e de aminas formados com a utilização de contra íons tais como halogeneto, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquila inferior e sulfonato de arila.

Além disso, na forma usada aqui, o termo "éster farmaceuticamente aceitável" se refere a ésteres que de preferência se hidrolisam in vivo

30 e incluem aqueles que se quebram com facilidade no corpo humano para deixar o composto de origem (por exemplo, a romidepsina) ou um sal do mesmo. Os grupos de ésteres adequados incluem, por exemplo, aqueles

derivados a partir de ácidos carboxílicos alifáticos farmaceuticamente aceitáveis, especificamente os ácidos alcanóicos, alquenoicos, cicloalcanoicos e alcanodióicos, nos quais cada porção de alquila ou de alquenila não tenha vantajosamente não mais do que 6 átomos de carbono.

- 5 Os exemplos de ésteres específicos incluem os formiatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos e etilsucinato. Em determinadas modalidades, os ésteres são clivados por enzimas tais como as esterases.

Além dessa, o termo "profármacos farmaceuticamente aceitáveis", na forma usada aqui, se refere aqueles profármacos da romidepsina
10 que são, dentro do âmbito do julgamento médico fundamentado, adequados para serem usados em contato com os tecidos de seres humanos e animais inferiores, sem toxidez indevida, irritação, resposta alérgica e similares, e são comensurados com uma proporção risco/benefício razoáveis e eficazes com relação ao uso pretendido para os mesmos, bem como as formas zwitteriônicas, quando possível, da romidepsina ou de derivados da mesma. O
15 termo "profármaco" se refere a compostos que são transformados de forma rápida in vivo para dar o composto de origem, por exemplo, através de hidrólise no sangue. Uma discussão completa está provida em T. Higuchi and V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, e em Edward B. Roche, ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambos os quais ficam incorporados aqui, por referência.

Como descrito acima, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem, além disso, um veículo farmaceuticamente aceitável, o qual, na forma usada aqui, inclui qualquer e todos os solventes, dilu-
25 entes e outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou de suspensão, agentes ativos de superfície, agentes isotônicos, agentes de espessamento ou de emulsificação, conservantes, aglutinantes sólidos, lubrificantes, e similares, na medida em que adequados para a forma de dosagem específica desejada. O Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Fifteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975) descreve os diversos veículos
30 usados na formulação de composições farmacêuticas e as técnicas co-

nhcidas para a preparação dos mesmos. Exceto se qualquer meio de veículo convencional for incompatível com a romidepsina, tal como através da produção de qualquer efeito biológico indesejável ou de outra forma interaja de uma maneira deletéria com qualquer um de outro(s) componente(s) da

5 composição farmacêutica, o uso dos mesmos é contemplado como estando dentro do âmbito desta invenção. Alguns exemplos de materiais que podem servir como veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, porém não estão limitados a açúcares tais como a lactose, glicose e sacarose; amidos tais como o amido de milho e amido de batata; celulose e derivados tais como

10 carboximetila celulose de sódio, etila celulose e acetato de celulose; goma tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; Cremophor; Solutol; excipientes tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; óleos tais como o óleo de amendoim; óleo de sementes de algodão, óleo de açafrão; óleo de gergelim; óleo de oliva; óleo de milho e óleo de soja; glicóis, tais como o prolileno

15 glicol; ésteres tais como o oleato de etila e o laurato de etila; agar; agentes de tamponamento tais como o hidróxido de magnésio e o hidróxido de alumínio; ácido algínico; água isenta de pirogênio; solução salina isotônica; solução de Ringer; álcool de etila, e soluções de tampão de fosfato, bem como outros lubrificantes compatíveis não-tóxicos tais como o laurila sulfato de

20 sódio, e estearato de magnésio; bem como agentes de coloração, agentes de liberação, agentes de revestimento, agentes edulcorantes aromatizantes e de perfume, conservantes e antioxidantes também podem estar presentes na composição, de acordo com o julgamento do formulador.

Esses e outros aspectos da presente invenção serão também

25 apreciados quando da consideração dos Exemplos que se seguem, que estão destinados a ilustrar determinadas modalidades específicas da invenção porém não pretendem limitar o âmbito da mesma, como definido através das reivindicações.

Exemplos

30 Exemplo 1 - Purificação da Romidepsina

Purificação da romidepsina por resina de adsorção.

O caldo de cultura de *Chromobacterium violaceum* contendo cerca de

400 g of Romidepsina (cerca de 600 l; ajustado para o pH 2,5 com H₂SO₄) é extraído, e o caldo da extração é aplicado a uma coluna empacotada com Sepabeads SP850, uma resina de adsorção não-iônica. A Romidepsina (não mais do que 6 g de Romidepsina/resina L) é ligada à resina com uma velocidade de fluxo de não mais do que $sv = 6$. Depois da lavagem com água de bica (cerca de 3 vezes o volume de resina) e acetona aquosa à 25% (cerca de 5 vezes o volume de resina), a eluição é executada com cerca de 65% acetona aquosa a 65% e uma velocidade de fluxo de não mais do que $sv = 4$.

10 *Purificação da romidepsina por cromatografia de HP20SS*

O material da eluição é diluído com água para produzir uma solução aquosa (cerca de 75% de conteúdo de água). Esta solução é aplicada a uma coluna Diaion HP20SS. Essa resina de adsorção não-iônica adsorve a Romidepsina (cerca de 10 g de Romidepsina/Resina L) em uma velocidade de fluxo de não mais do que $sv = 5$. Depois da lavagem com acetona aquosa a 25% (cerca de 0,5 vez o o volume de resina) e acetona aquosa a 40% (cerca de 4 vezes volume de resina a), eluição é executada com acetona aquosa a 47%. O resíduo da eluição é analisado por HPLC de fase reversa (RP-HPLC). As frações ativas são combinadas em um tanque de retenção intermediário.

20 *Substituição do solvente aquoso com solvente não-aquoso com a resina de adsorção.*

O resíduo da eluição obtido a partir da coluna HP20SS é diluído com água para a produção de uma solução aquosa (cerca de 80% de teor de água). Esta solução é aplicada a uma coluna Diaion HP20. Depois da lavagem com acetona aquosa a 20%, a eluição é executada com acetona. O resíduo da eluição é concentrado *in vacuo*. Depois da adição do acetato de etila do concentrado, o concentrado é ainda mais concentrado *in vacuo*. Esta etapa é executada repetidamente.

30 *Purificação da Romidepsina com alumina*

O concentrado resultante é dissolvido em acetato de etila (cerca de 6 mg/ml) e aplicado a uma coluna de resina de alumina (cerca de 75 g de

Romidepsina/Resina L). A coluna é revelada com acetato de etila (cerca de 2 vezes o volume da alumina) e uma mistura de acetona e acetato de etila (0,5 - 2,0 v/v, cerca de 8 vezes o volume da alumina). Depois da adição da acetona ao concentrado, a solução resultante é ainda mais concentrada.

5 *Cristalização 1 (metanol)*

O concentrado obtido a partir da etapa anterior é diluído com metanol e concentrado *in vacuo* para a produção de cristais de Romidepsina bruta. Os cristais precipitados são recolhidos através de filtração.

Cristalização 2 (acetona/água)

- 10 Os cristais de Romidepsina bruta são dissolvidos em acetona aquosa a 85% (cerca de 13 l/kg de cristais de Romidepsina bruta), e precipitados através da adição lenta de água purificada (cerca de 65 l/kg de cristais de romidepsina bruta) com agitação. Os cristais precipitados são recolhidos através de filtração e lavados com acetona aquosa a 15% (cerca de 5 l/kg
- 15 de romidepsina bruta). os cristais molhados são secos sob vácuo á < - 70°C.

Equivalentes e Âmbito

- Anteriormente exposto foi uma descrição de determinadas modalidades não-limitativas da invenção. Aquelas pessoas versadas na técnica irão reconhecer, ou serão capazes de determinar usando não mais do que a
- 20 experimentação de rotina, muitos equivalentes com relação às modalidades específicas da invenção descrita aqui. Aquelas pessoas versadas na técnica irão apreciar que várias mudanças e modificações a esta descrição podem ser feitas sem que se afastem do espírito e do âmbito da presente invenção, na forma em que é definida nas reivindicações em anexo.

- 25 Nas reivindicações, os artigos tais como "um", "uma" e "o(s)/a(s)" significam um ou mais do que um, a não ser que indicado ao contrário ou evidente de outra forma a partir do contexto. As reivindicações ou as descrições que incluam "ou" entre um ou mais membros de um grupo são consideradas satisfeitas se um, mais do que um, ou todos os membros do
- 30 grupo estejam presentes no, empregados no ou relevantes de outro modo com relação a um determinado produto ou processo, a não ser que indicado ao contrário ou evidente de outra forma a partir do contexto. A invenção in-

clui modalidades nas quais exatamente um membro do grupo está presente no, empregado no, ou relevante de outro modo com relação a um determinado produto ou processo. A invenção inclui modalidades nas quais mais do que um ou todos os membros do grupo estão presentes no, empregados no, ou relevantes de outro modo com relação a um determinado produto ou processo. Além disso, deve ser entendido que a invenção engloba todas as variações, combinações e permutações nas quais uma ou mais limitações, elementos, cláusulas, termos descritivos, etc., a partir de uma ou mais das reivindicações ou a partir de porções relevantes da descrição são introduzidos(as) em outra reivindicação. Por exemplo, qualquer reivindicação que seja dependente de outra reivindicação pode ser modificada para a inclusão de uma ou mais limitações encontradas em qualquer outra reivindicação que seja dependente da mesma reivindicação base. Além disso, quando as reivindicações descrevem uma composição, deve ser entendido que os métodos para a utilização da composição para qualquer uma das finalidades descritas aqui, e métodos para a fabricação da composição de acordo com qualquer um dos métodos para a fabricação descritos aqui, ou outros métodos conhecidos na técnica sejam incluídos, a não ser que indicado, ou a não ser que se torne evidente a uma pessoa versada na técnica que uma contradição ou uma inconsistência poderia ser levantada. Além disso, a invenção engloba composições feitas de acordo com qualquer um dos métodos para a preparação de composições descritas aqui.

Quando elementos estão presentes como listas, por exemplo, no formiato do grupo Markush, deve ser entendido que cada subgrupo dos elementos também está descrito, e que qualquer elemento(s) pode(m) ser removido(s) a partir do grupo. Também é notado que o termo "compreendendo" está destinado a ser aberto e permite a inclusão de elementos ou etapas adicionais. Deve ser entendido que, em geral, quando a invenção ou aspectos da invenção é/são referidos como compreendendo elementos, características, etapas, etc., específicos, determinadas modalidades da invenção ou aspectos da invenção consistem, ou consistem essencialmente em tais elementos, características, etapas, etc. Para finalidades de simplicidade, aque-

las modalidades não foram especificamente mostradas *in haec verba* aqui. Desse modo, para cada uma das modalidades da invenção que compreendem um ou mais elementos, características, etapas, etc., a invenção também proporciona modalidades que consistem ou consistem essencialmente naqueles elementos, características, etapas, etc.

Quando são dadas faixas, os pontos finais estão incluídos. Além do mais, deve ser entendido que, a não ser que indicado de outro modo ou evidente de outra forma a partir do contexto e/ou do entendimento de uma pessoa versada na técnica, os valores que estão expressos como faixas podem assumir qualquer valor específico dentro das faixas estabelecidas nas diferentes modalidades da invenção, até o décimo da unidade do limite mais baixo da faixa, a não ser que o contexto indique claramente de outra forma. Também deve ser entendido que, a não ser que indicado de outro modo ou evidente de outra forma a partir do contexto e/ou do entendimento de uma pessoa versada na técnica, os valores que estão expressos como faixas podem assumir qualquer uma faixa dentro da faixa determinada, na qual os pontos finais da subfaixa são expressos no mesmo grau de exatidão como o décimo da unidade do limite mais baixo da faixa.

Além disso, deve ser entendido que qualquer modalidade específica da presente invenção pode ser explicitamente excluída a partir de qualquer uma de uma ou mais das reivindicações. Qualquer modalidade, elemento, característica, aplicação ou aspecto das composições e/ou dos métodos da invenção pode ser excluído de qualquer de uma ou mais reivindicações. Com a finalidade de sumarizar, as modalidades nas quais um ou mais dos elementos, características, finalidades ou aspectos forem excluídos não estão descritas explicitamente aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo:
romidepsina, em que pelo menos 98% da romidepsina é monomérica; e um excipiente farmacêuticamente aceitável.
- 5 2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos 99% da romidepsina é monomérica.
3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos 99,5% da romidepsina é monomérica.
4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1,
10 em que pelo menos 99,95% of da romidepsina é monomérica.
5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a composição está substancialmente isenta de romidepsina dimerizada, oligomerizada, ou polimerizada.
6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1,
15 em que a composição inclui menos do que ou igual a 1,0% do total de impurezas e menos do que ou igual a 0,2% de impurezas individuais.
7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a composição inclui uma quantidade de romidepsina eficaz para o tratamento de um neoplasma.
- 20 8. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é o câncer.
9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é uma malignidade hematológica.
10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7,
25 em que o neoplasma é uma leucemia ou linfoma.
11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é o linfoma de Hodgkin.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma não é o linfoma de Hodgkin.
- 30 13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é o mieloma múltiplo.
14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7,

em que o neoplasma é um linfoma da célula T cutânea.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma um linfoma da célula T periférica.

5 16. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma is leucemia linfócita crônica. (CLL).

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é a leucemia mielóide crônica (CML).

18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma leucemia mielóide aguda (AML).

10 19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é uma síndrome mielodisplásica.

20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é o câncer pancreático.

15 21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o neoplasma é o câncer da próstata.

22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a composição inclui 1 a 56 mg de romidepsina.

23. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, formulada para a administração oral.

20 24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, formulada para a administração parenteral.

25. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, formulada para a administração intravenosa.

25 26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também outro agente citotóxico.

27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, em que o agente citotóxico é a is gemcitabina ou a decitabina.

28. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, em que o agente citotóxico é flavopiridol.

30 29. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente antiinflamatório.

30. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1,

compreendendo também um aliviador de dor.

31. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente anti náusea.

5 32. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente antipirético.

33. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também uma suplementação de eletrólito.

34. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também a suplementação de potássio.

10 35. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também a suplementação de magnésio.

36. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente anti arritmico.

15 37. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um concentrado de plaquetas.

38. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também a eritropoietina.

39. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente anti-hiperglicêmico.

20 40. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo também um agente esteróide.

41. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 40, em que o agente esteroide é a dexametazona.

25 42. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a composição não inclui outro inibidor de HDAC além da romidepsina.

30 43. Método para a preparação de uma composição farmacêutica de romidepsina que compreende a combinação de uma composição de romidepsina pelo menos 98% pura com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

44. Kit compreendendo pelo menos uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 42 e instru-

ções para a administração de uma composição.

Fluxograma do Processo de Fabricação Fk228

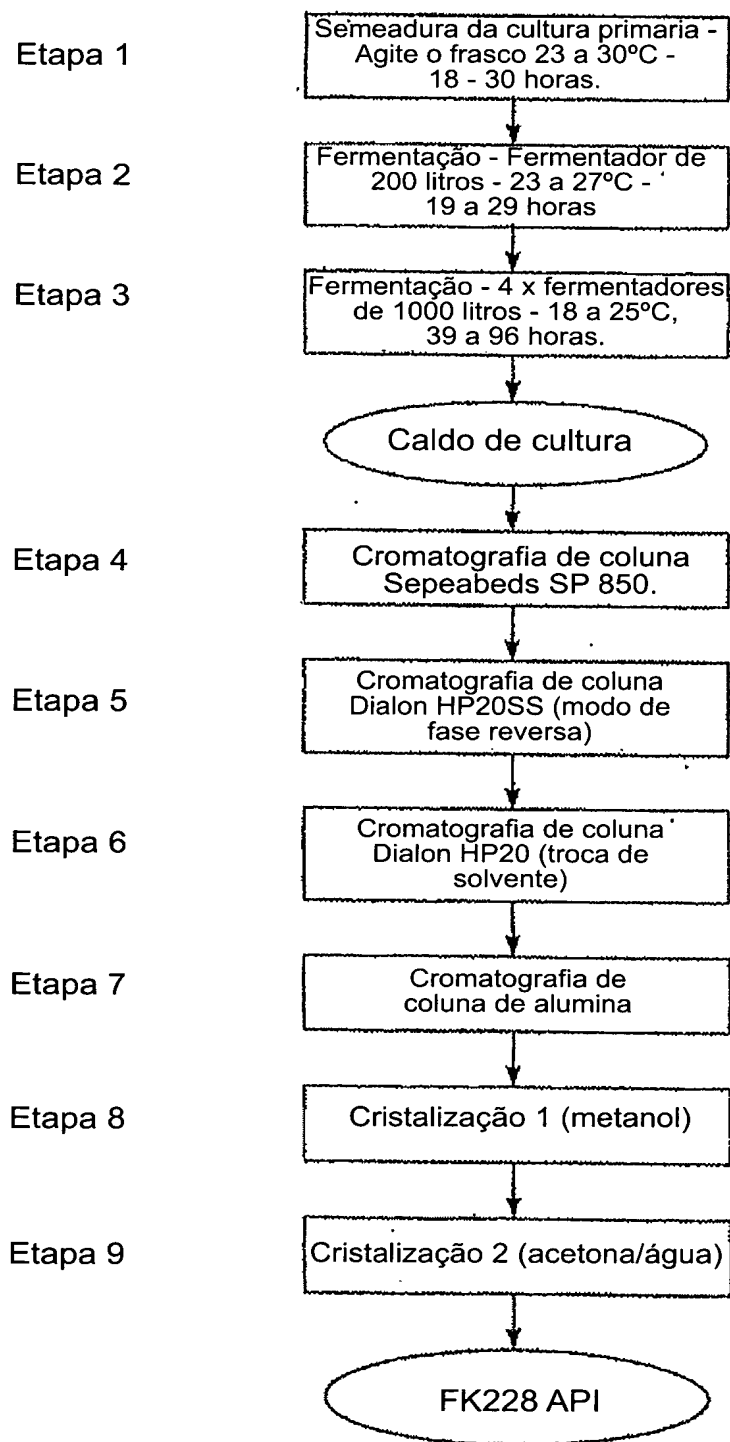


Fig. 1

RESUMO

Patente de Invenção: **"PREPARAÇÃO DA ROMIDEPSINA"**.

5 A invenção proporciona um processo aperfeiçoado para a preparação da romidepsina. O processo envolve a produção, purificação ou a armazenagem da romidepsina sob condições que impeçam a formação de adutos indesejáveis. A purificação da romidepsina em pH aparente mais baixo do que aproximadamente 6,0 (por exemplo, entre um pH aparente de 4,0 e 6,0) foi descoberta como impedindo a redução da ligação de dissulfeto da romidepsina e a formação subsequente de adutos dimerizados, oligomerizados, ou polimerizados. A invenção também proporciona composições farmacêuticas de romidepsina monomérica isenta de adutos dimerizados, oligomerizados, ou polimerizados.

10