



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

(11) PI 0107210-2 B1

(22) Data do Depósito: 12/09/2001

(45) Data de Concessão: 26/09/2017



(54) Título: SAIS DE AMINA MONO- OU DI-ORGÂNICA, SAIS DE MONO- E DI-AMINOÁCIDOS E SAIS DE ÉSTERES DE MONO- E DI-AMINOÁCIDOS DA PRÓ-DROGA FOSFATO DE COMBRETASTATINA A-4, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07F 9/12; C07C 229/26; C07C 279/14; C07C 229/08; C07C 215/10; C07C 215/12; C07C 211/14; C07D 233/61; C07D 209/20; A61K 31/66; A61P 35/00

(30) Prioridade Unionista: 07/12/2000 US 60/251,921, 14/09/2000 US 60/232,568

(73) Titular(es): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

(72) Inventor(es): JOHN J. VENIT; MANDAR V. DALI; MANISHA M. DALI; YANDE HUANG; CHARLES E. DAHLHEIM; RAVIADRA W. TEJWANI

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SAIS DE AMINA MONO- OU DI-ORGÂNICA, SAIS DE MONO- E DI-AMINOÁCIDOS E SAIS DE ÉSTERES DE MONO- E DI-AMINOÁCIDOS DA PRÓ-DROGA FOSFATO DE COMBRETASTATINA A-4, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DOS MESMOS"**.

Este pedido reivindica a prioridade do Pedido US Série Nº 60/232.568, depositado em 14 de setembro de 2000, e do Pedido US Série Nº 60/251.921, depositado em 7 de dezembro de 2000, sendo que os pedidos provisórios de ambos estão aqui incorporados em sua integridade a título de referência.

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a novos e úteis sais de mono- ou di-aminas orgânicas, sais de mono- e di-aminoácidos e sais de ésteres de mono- e di-aminoácidos da pró-droga fosfato de combretastatina A-4 (CA4), sais estes que têm uma solubilidade maior que a combretastatina A-4 nativa e regeneram rapidamente a combretastatina A-4 em condições fisiológicas.

15 Fundamentos da Invenção

O câncer é considerado uma doença séria e difusa. O Instituto Nacional do Câncer estimou que somente nos Estados Unidos 1 em 3 pessoas serão atingidas pelo câncer durante a vida. Além disso, aproximadamente 50% a 60% das pessoas que contraem câncer vão finalmente sucumbir à doença. Assim, com a criação do Instituto Nacional do Câncer no início da década de 70, a quantidade de recursos angariados para pesquisa do câncer aumentou drasticamente.

Embora o câncer seja comumente considerado uma doença individual, ele na verdade compreende uma família de doenças onde a diferenciação celular normal é modificada, tornando-se anormal e descontrolada. Como consequência, essas células malignas proliferam rapidamente. Por fim, as células se espalham e metastatizam de sua origem e colonizam outros órgãos, finalmente matando seu hospedeiro. Devido à ampla variedade de cânceres atualmente observados, foram desenvolvidas numerosas estratégias para destruir o câncer no corpo. Tal método utiliza quimioterápicos citotóxicos. Esses compostos são administrados a pessoas com

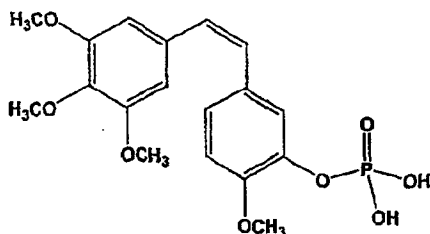
câncer com o objetivo de destruir as células malignas ao mesmo tempo em que deixa as células sadias normais intactas. Exemplos particulares de tais compostos incluem 5-fluoruracil, cisplatina e metotrexato.

Combretastatina A-4 foi inicialmente isolada da madeira externa da árvore africana *Combretum caffrum* (Combretaceae) e verificou-se que ela era um potente inibidor do grupo de microtubulinas. Ademais, verificou-se que combretastatina A-4 era significativamente ativa contra as linhagens de células da leucemia linfocítica L1210 e P338 murinas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI). Além disso, verificou-se que a combretastatina A-4 competia com a combretastatina A-1, um outro composto isolado de *Combretum caffrum*, como inibidor da ligação de colchicina à tubulina. Também foi determinado que ela retarda vigorosamente as linhagens de células humanas de câncer do cólon VoLo, DLD-1 e HCT-15 ($ED_{50} < 0,01 \mu\text{g/ml}$), e é um dos agentes antimitóticos mais fortes encontrados entre os constituintes de *Combretum caffrum* (Patente US 4.996.237).

Conseqüentemente, foi conduzida uma pesquisa para determinar a eficácia de combretastatina A-4 como quimioterapêutico no tratamento de uma variedade de cânceres humanos. Infelizmente, a combretastatina A-4 é essencialmente insolúvel em água. Esta característica tem interferido de forma significativa no desenvolvimento de composições farmacêuticas compreendendo combretastatina A-4. Para aumentar sua solubilidade assim como sua eficácia, foram feitos esforços para criar derivados de combretastatina A-4 como pró-drogas que vão regenerar a combretastatina A-4 em condições fisiológicas. Por exemplo, Koji Ohsumi et al. descrevem a síntese de pró-drogas de aminoácido HCl de um análogo de combretastatina, onde um sal de aminoácido está ligado ao grupo amino de um derivado de combretastatina contendo um grupo amino básico [os derivados estão descritos em Ohsumi et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 14, 539-548 (1999)]. Embora essas pró-drogas possam ter uma solubilidade aumentada em comparação com a da combretastatina A-4 nativa, elas possuem uma limitação inerente pelo fato de a regeneração da combretastatina A-4 depender da aminopeptidase endógena no sangue de um indivíduo a quem a pró-droga seja

administrada.

O ácido livre do fosfato de combretastatina A-4 ("ácido livre de CA4P") que tem a seguinte estrutura:



5 existe como uma massa oleosa. O ácido livre de CA4P é intrinsecamente
Muito Ligeiramente Solúvel (por definição de USP) a 25°C em água, com a
 solubilidade em água aumentando com um aumento no pH. Ele possui dois
 grupos ácidos com valores de pK_a de 1,2 e 6,2, que levam à formação de
 sal. Como existem problemas práticos com a manipulação de ácido livre de
 CA4P devido ao seu estado físico, é desejável a identificação de uma forma
 10 salina cristalina e estável deste composto.

As tentativas de derivatizar combretastatina A-4 envolveram a
 formação de derivados salinos de fosfato de combretastatina A-4 (derivados
 salinos de "CA4P"). Exemplos particulares desses sais estão descritos na
 Patente US 5.561.122. Embora esses sais de pró-droga possuam uma solu-
 15 bilidade maior que a da combretastatina A-4 nativa, eles também podem
 apresentar inconvenientes inerentes tal como higroscopicidade.

Higroscopicidade é um dos vários critérios importantes na es-
 colha de um sal. Veja K. Morris et al., "An Integrated Approach to the Selec-
 tion of Optimal Salt Form for a New Drug Candidate", Int. J. Pharm., 105,
 20 209-217 (1994). O grau de higroscopicidade para qualquer substância de
 droga tem impacto significativo sobre sua manipulação e estabilidade du-
 rante o tempo de vida da droga produzida.

Por conseguinte, são necessários novos e úteis sais da pró-
 droga combretastatina A-4 com propriedades físico-químicas favoráveis, e
 25 que aumentem a solubilidade, e de preferência a eficácia, da combretastati-
 na A-4 no tratamento de uma ampla variedade de distúrbios neoplásicos.

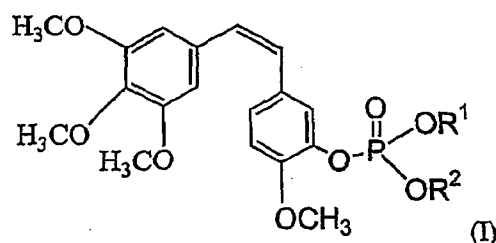
Também são necessários novos e úteis sais da pró-droga combretastatina A-4 que regenerem facilmente a combretastatina A-4 nativa in vivo e não produzam produtos secundários indesejados ou potencialmente prejudiciais quando sofrerem regeneração.

- 5 A citação de qualquer referência neste relatório não deve ser interpretada como aceitação de que tal referência esteja disponível como "Técnica Anterior" ao presente pedido.

Sumário da Invenção

- São fornecidos, de acordo com a presente invenção, novos e
 10 úteis sais de mono- ou di-aminas orgânicas, sais de mono- e di-aminoácidos e sais de ésteres de mono- e di-aminoácidos da pró-droga fosfato de combretastatina A-4, sais estes que têm uma solubilidade maior que a combretastatina A-4 nativa e regeneram rapidamente a combretastatina A-4 in vivo. A presente invenção também fornece compostos que são significativamente
 15 menos higroscópicos que os sais da pró-droga combretastatina A-4 conhecidos até então (por exemplo, não sofrem alterações significativas na forma física em condições ambientes de temperatura e umidade), possuem manipulação e estabilidade melhoradas, e podem formar soluções a um pH que minimiza ou elimina a dor no local de injeção. Os compostos da invenção
 20 fornecem assim vantagens consideráveis para uso farmacêutico.

Em geral, a presente invenção refere-se a um composto tendo a estrutura geral da fórmula I:



onde

- um de -OR¹ ou -OR² é -O⁻QH⁺ e o outro é hidroxila ou -O⁻QH⁺; e
 25 Q é
 (A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de ni-

nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

- (B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um
5 cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

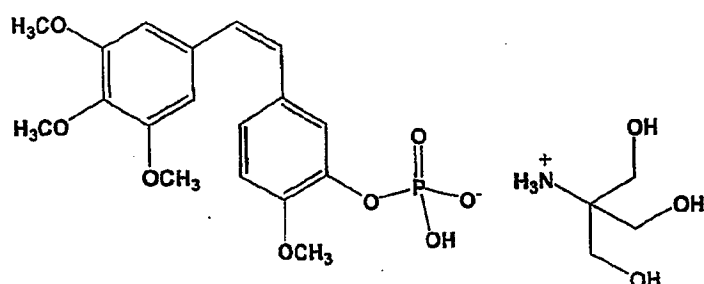
(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

- 10 Em todo este relatório, quando ambos $-\text{OR}^1$ e $-\text{OR}^2$ são $-\text{O}^-\text{QH}^+$, Q é de preferência o mesmo em ambos os grupos $-\text{OR}^1$ e $-\text{OR}^2$.

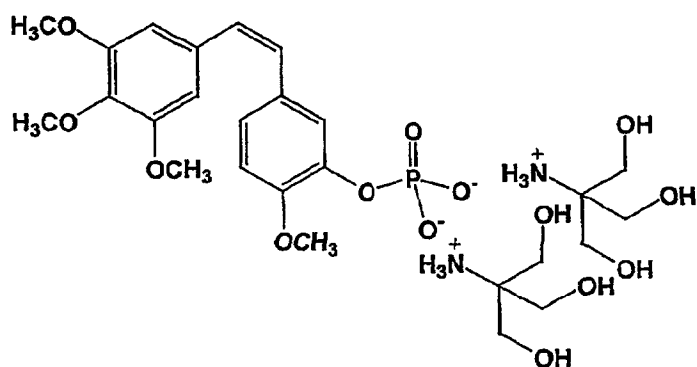
Quando Q tem a definição (A), a amina orgânica preferida tendo aplicações nesta invenção é trometamina (isto é, tris(hidroximetil)aminometano, aqui abreviado por "TRIS").

- 15 Sais de trometamina da fórmula I estão ilustrados pelas fórmulas Ia e Ib a seguir, que representam os sais de mono-trometamina e os sais de di-trometamina de fórmula I, respectivamente:

Ia



Ib

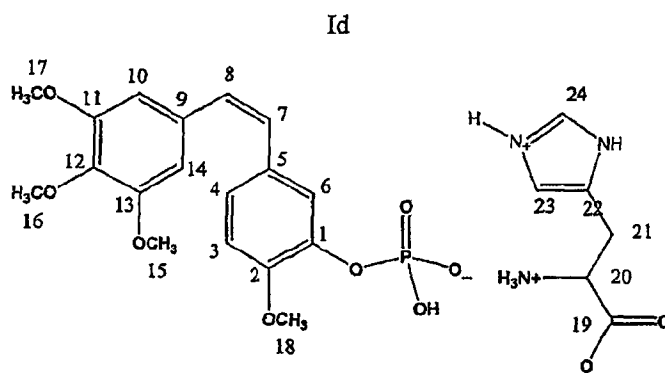
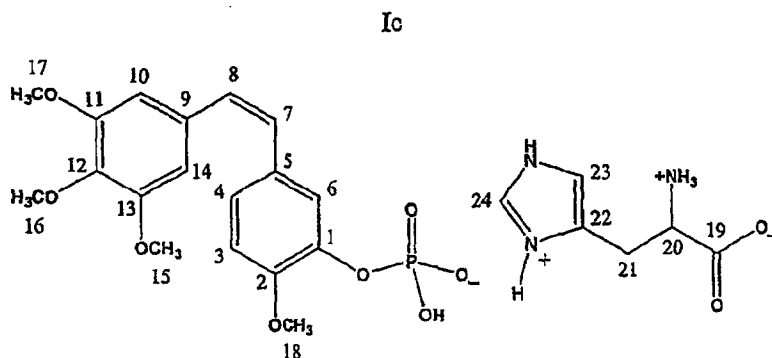


O sal de mono-trometamina de fórmula Ia é preferido.

Quando Q tem a definição (B), qualquer aminoácido tendo pelo menos dois átomos de nitrogênio tem aplicação nesta invenção. Qualquer dos nitrogênios do aminoácido pode formar o cátion de amônio quaternário de fórmula I, por exemplo, qualquer nitrogênio na cadeia lateral do aminoácido ou o nitrogênio do grupo α -amino. Aminoácidos tendo aplicações nesta invenção incluem, porém certamente sem limitação, ornitina, histidina, lisina, arginina, triptofano etc.

Quando Q tem a definição (B), um aminoácido preferido tendo aplicações nesta invenção é a histidina. Por exemplo, qualquer um dos nitrogênios do grupo imidazol da cadeia lateral da histidina ou, alternativamente, o nitrogênio do grupo α -amino da histidina pode formar o cátion de amônio quaternário da fórmula I. Como facilmente aparente, devido à natureza aromática do grupo imidazol, qualquer dos nitrogênios do grupo imida-

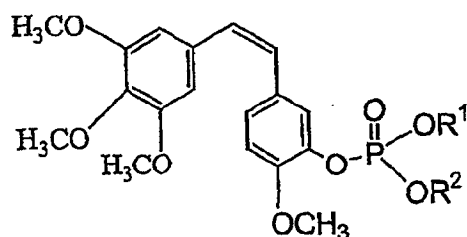
zol da cadeia lateral da histidina pode formar a estrutura da fórmula (I). Estruturas de monohistidina da fórmula I preferidas estão ilustradas pelas fórmulas Ic ou Id a seguir:



Quando Q tem a definição (C), qualquer aminoácido tem aplicações nesta invenção, tal como, porém sem limitação, glicina. Ésteres preferidos são ésteres alquílicos, tais como ésteres metílicos ou etílicos.

Além disso, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo:

(a) um composto tendo a estrutura geral da fórmula I:



(I)

onde

um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

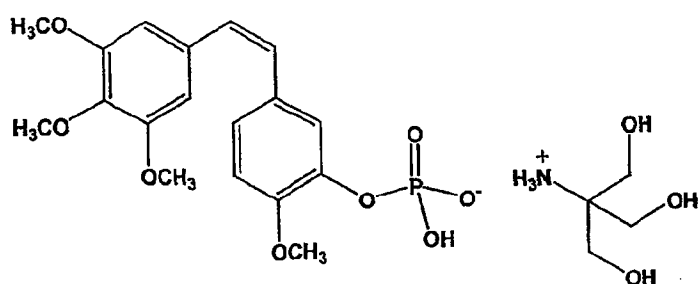
(B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres; e

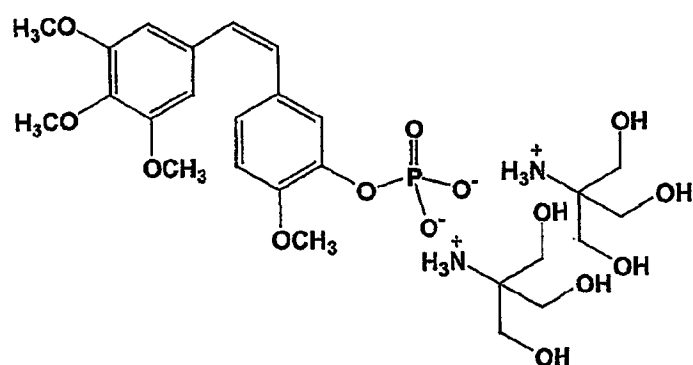
(b) um veículo farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Exemplos particulares de compostos da presente invenção tendo aplicações em tal composição farmacêutica estão descritos acima. Ademais, qualquer veículo farmacêuticamente aceitável adequado tem aplicações em uma composição farmacêutica da presente invenção. Exemplos particulares estão descritos abaixo. Uma modalidade particular de uma composição farmacêutica da presente invenção compreende um composto da presente invenção no qual trometamina é a amina orgânica, e que de preferência é um sal de trometamina tendo a estrutura de fórmula Ia ou Ib, mais preferivelmente Ia:

Ia

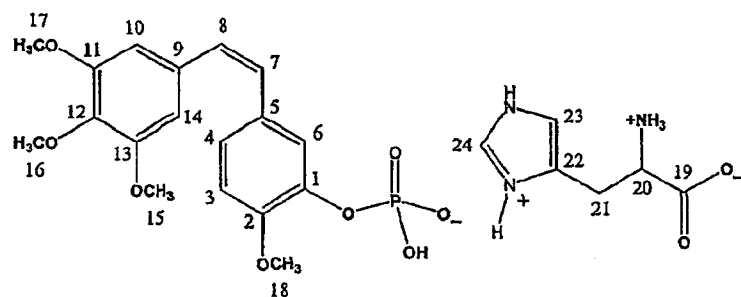


Ib

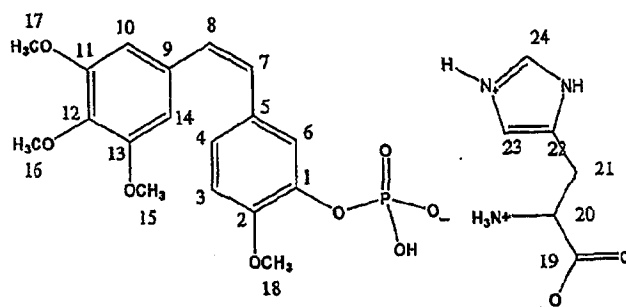


Uma outra modalidade particular de uma composição farmacêutica da presente invenção compreende um composto da presente invenção no qual histidina é o aminoácido, e que de preferência é um sal de monohistidina tendo a estrutura de fórmula Ic ou Id:

Ic



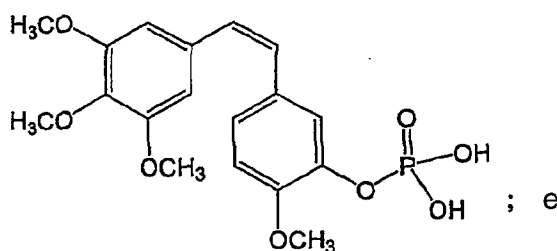
Id



Naturalmente, tal composição farmacêutica poderia compreender ainda um veículo farmacêuticamente aceitável para a mesma.

Além disso, a presente invenção refere-se ainda a composições compreendendo um sal da presente invenção. Em particular, uma composição da presente invenção pode ser formada por misturação de compostos compreendendo:

(a) um ácido livre de CA4P tendo a estrutura:



(b) um composto Q, onde Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

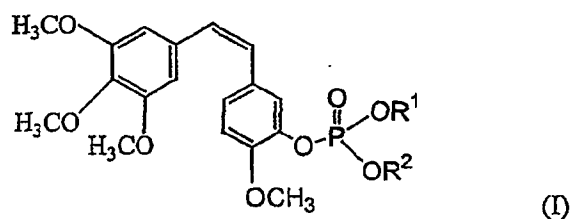
(B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

Opcionalmente, uma composição da presente invenção pode ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável.

Além disso, quando Q tem a definição (A), qualquer amina orgânica aqui definida tem aplicações em uma composição da presente invenção. Exemplos particulares incluem, porém sem limitação, trometamina, di-
 etanolamina, glicamina, N-metilglicamina, etilenodiamina e 2-(4-imidazolil)
 5 etil amina. Quando Q tem a definição (B), qualquer aminoácido tendo pelo menos dois átomos de nitrogênio tem aplicações em uma composição da presente invenção. Exemplos particulares incluem ornitina, histidina, lisina, arginina, triptofano etc. Quando Q tem a definição (C), qualquer éster de aminoácido aqui definido tem aplicações em uma composição da presente
 10 invenção. Exemplos particulares incluem glicina.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para modular o crescimento tumoral ou a metástase em um animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto tendo a estrutura geral de:



15 onde

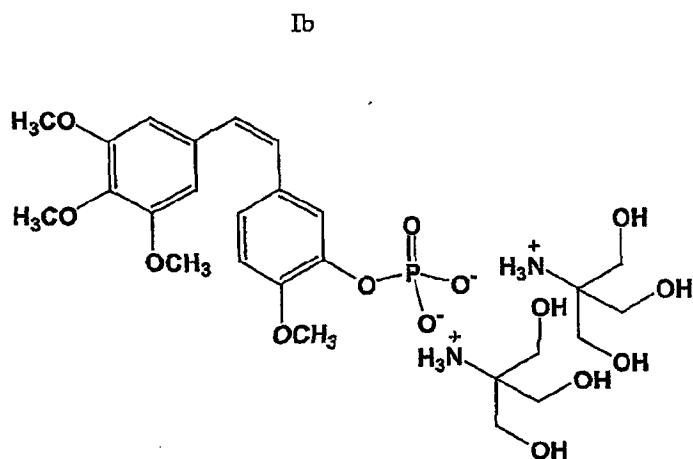
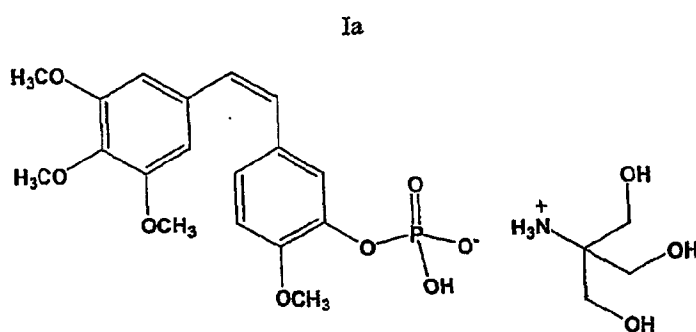
um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e
 Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário
 20 QH^+ ;

(B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

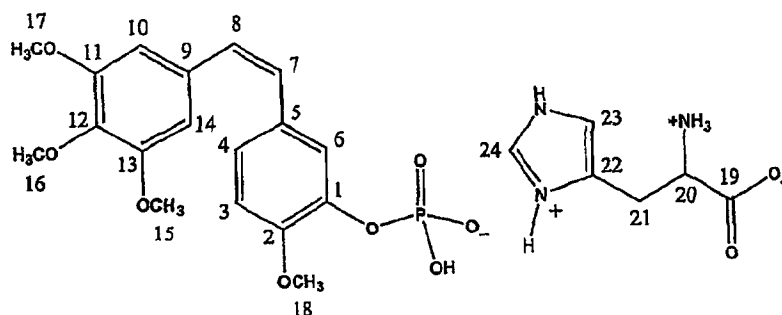
(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio
 25 onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

Em uma modalidade particular, a presente invenção refere-se a um método para modular o crescimento tumoral ou a metástase em um animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto no qual trometamina é a amina orgânica, e que de preferência é um sal de trometamina tendo a estrutura de fórmula Ia ou Ib, mais preferivelmente Ia:

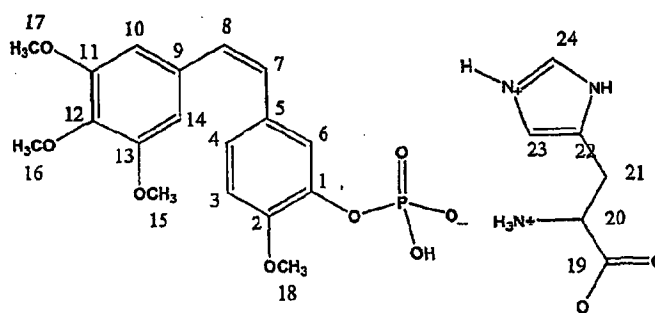


Em uma outra modalidade particular, a presente invenção refere-se a um método para modular o crescimento tumoral ou a metástase em um animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto no qual histidina é o aminoácido, e que de preferência é um sal de monohistidina tendo a estrutura de fórmula Ic ou Id:

Ic



Id



Por conseguinte, a presente invenção fornece novos e úteis sais de mono- ou di-aminas orgânicas, sais de mono- e di-aminoácidos e sais de ésteres de mono- e di-aminoácidos da pró-droga fosfato de combretastatina A-4, sais estes que são mais solúveis em soluções aquosas que a combretastatina A-4 nativa. Dessa forma, a eficácia dessa droga pode ser aumentada.

A presente invenção também fornece sais de mono- ou di-aminas orgânicas, sais de mono- e di-aminoácidos e sais de ésteres de mono- e di-aminoácidos da pró-droga fosfato de combretastatina A-4, sais estes que regeneram rapidamente a combretastatina A-4 in vivo, e que, mediante dissociação, liberam uma amina orgânica, um aminoácido ou um éster de aminoácido como um subproduto fisiologicamente tolerável.

Em sua modalidade mais preferida, a presente invenção fornece o novo sal de trometamina (TRIS) 1:1 cristalino do agente antitumoral anti-vascular pró-droga fosfato de combretastatina A-4 tendo a estrutura de fórmula Ia. Este composto é um sal da pró-droga do tipo éster de fosfato, onde

a porção fosfato sofre desfosforilação em condições fisiológicas para produzir a porção de droga ativa, combretastatina A-4 (como mencionado abaixo, o grupo olefina que liga em ponte as porções fenila do núcleo de combretastatina A-4 está na configuração cis; o grupo olefina do sal de mono TRIS preferido do fosfato de combretastatina A-4 está igualmente na configuração cis). O sal de (mono) TRIS 1:1 de CA4P apresenta boas propriedades no estado sólido e inesperadamente é praticamente não-higroscópico. Esta e outras propriedades favoráveis fazem do sal de TRIS de CA4P um composto preferido para formulação de apresentação farmacêutica.

10 Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 mostra o perfil de absorção/desabsorção de umidade do sal de mono-TRIS de CA4P (preparado no exemplo 1) a 25°C. Os dados foram obtidos usando uma balança de umidade MB-300W Modelo VTI com níveis de umidade relativa variando de 10% a 90% em incrementos de 10%.

15 O tempo de equilíbrio máximo a cada umidade foi ajustado em 4 horas.

A figura 2 mostra os padrões de difração de raios X em pó de amostras do sal de mono-TRIS de CA4P (preparado no exemplo 1), que foram empastadas em diferentes solventes (água, isopropanol, etanol, acetonitrila e acetona) inicialmente a 70 - 75°C por 5 a 10 minutos, e em seguida à temperatura ambiente por uma noite. Os difratogramas de raios X foram registrados usando um difratômetro de raios X Miniflex Modelo Rigaku com uma fonte de Cu-K α a uma taxa de varredura de 1° por minuto de 2° a 40° 2 θ .

25 A figura 3 mostra o termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) (modelo DSC 2910, TA Instruments) do sal de mono-TRIS de CA4P (preparado no exemplo 1) obtido em um fluxo de nitrogênio com uma taxa de aquecimento de 10 graus por minuto.

A figura 4 mostra o perfil de pH-solubilidade do sal de mono-TRIS de CA4P (preparado no exemplo 1) a 25°C. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio.

30

A figura 5 mostra o termograma de calorimetria de varredura

diferencial (DSC) do sal de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3) (tamanho da amostra 2,0900 mg).

5 A figura 6 mostra o termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) do sal de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

A figura 7 mostra o termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) do sal de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

10 A figura 8 mostra os padrões de difração de raios X em pó do sal de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

A figura 9 mostra os padrões de difração de raios X em pó do sal de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

15 A figura 10 mostra o termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) do sal anidro de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

A figura 11 mostra os padrões de difração de raios X em pó do sal anidro de mono-L-histidina de CA4P (preparado no exemplo 3).

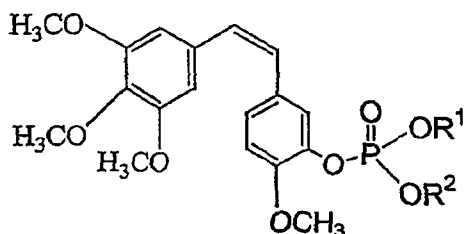
20 A figura 12 mostra o termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) do sal de éster metílico de CA4P monoglicina (preparado no exemplo 4).

A figura 13 mostra os padrões de difração de raios X em pó do sal de éster metílico de CA4P monoglicina (preparado no exemplo 4).

Descrição Detalhada da Invenção

25 A presente invenção baseia-se na descoberta de que, surpreendente e inesperadamente, podem ser formados sais de mono- ou di-aminas orgânicas, sais de mono- e di-aminoácidos e sais de ésteres de mono- e di-aminoácidos da pró-droga fosfato de combretastatina A-4 que têm solubilidade aumentada in vivo em relação à solubilidade da combretastatina A-4 nativa, regeneram rapidamente a combretastatina A-4 em condições fisiológicas e, durante a regeneração, produzem aminas orgânicas
30 fisiologicamente toleráveis, ou aminoácidos ou ésteres de aminoácidos fisiologicamente toleráveis que são facilmente metabolizados in vivo.

De um modo geral, a presente invenção refere-se a um composto tendo a estrutura geral:



onde

um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e
5 Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

(B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um
10 cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do
15 aminoácido estão na forma de ésteres.

Todos os isômeros dos presentes compostos (por exemplo, aqueles que podem existir devido a carbonos assimétricos, tais como em vários substituintes), inclusive formas enantioméricas e formas diastereoméricas, são contemplados no escopo desta invenção. Estereoisômeros individuais dos compostos da invenção podem, por exemplo, ser substancialmente isentos de outros isômeros (por exemplo, como um isômero ótico puro ou substancialmente puro tendo uma atividade específica), ou podem ser misturados, por exemplo, como racematos ou com todos os outros estereoisômeros, ou outros estereoisômeros selecionados. Os centros quirais da
20 presente invenção podem ter a configuração S ou R conforme definido pelas "IUPAC 1974 Recommendations". As formas racêmicas podem ser resolvidas por métodos físicos tais como, por exemplo, cristalização fracionada,

25

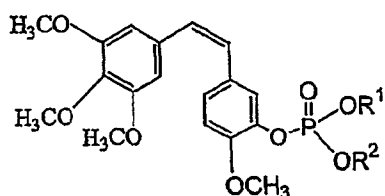
separação ou cristalização de derivados diastereoméricos ou separação por cromatografia de coluna quiral. Os isômeros óticos individuais podem ser obtidos de racematos por qualquer método adequado. O grupo olefina que liga por ponte as porções fenila do núcleo da combretastatina A-4 está na configuração cis, que é a configuração preferida para os compostos da presente invenção. O uso dos termos "combretastatina A-4" ou "CA4" como o nome, ou parte do nome, de um composto desta invenção significa um composto nesta configuração cis. Solvatos, tais como hidratos, do composto de fórmula I são contemplados nesta invenção.

Em todo o relatório descritivo, os grupos e substituintes devem ser escolhidos de modo a fornecer porções e compostos estáveis.

As modalidades aqui indicadas como exemplificativas ou preferidas destinam-se a ser ilustrativas e não-limitativas.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um composto da presente invenção, e um veículo farmaceuticamente aceitável para o mesmo. Naturalmente, os compostos da presente invenção podem ser empregados em qualquer forma, tal como uma forma sólida ou em solução (particularmente solução aquosa), como descrito mais adiante. O composto, por exemplo, pode ser obtido e empregado em uma forma liofilizada isolado ou com aditivos adequados.

Em ainda uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para modular o crescimento tumoral ou a metástase em um animal, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto tendo a estrutura geral da fórmula I:



(I)

onde

um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e

Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

5 (B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres. Naturalmente, um composto da presente invenção pode ser administrado isolado ou em uma composição farmacêutica.

Os termos e expressões aqui usados estão definidos abaixo e têm as definições indicadas, a menos que de outra forma indicado.

Conforme aqui usado, os termos "modular", "que modula" ou "modulação" referem-se à variação na taxa à qual ocorre um processo particular, à inibição de um processo particular, à reversão de um processo particular e/ou à prevenção do início de um processo particular. Assim, por exemplo, onde o processo particular compreende crescimento tumoral ou metástase, "modulação" do processo inclui diminuição da taxa à qual ocorre o crescimento tumoral e/ou a metástase, inibição do crescimento tumoral e/ou da metástase, reversão do crescimento tumoral e/ou da metástase (inclusive retração e/ou erradicação do tumor) e/ou prevenção do crescimento tumoral e/ou da metástase, particularmente em um indivíduo com propensão a tal processo.

Conforme aqui usado, a expressão "quantidade eficaz" ou "quantidade eficaz para tal" de um composto administrado a um animal é a quantidade suficiente para modular o crescimento tumoral ou a metástase em um animal. O versado na técnica pode determinar facilmente uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção a ser administrado a um animal, por exemplo, usando técnicas de rotina. Quantidades de dosa-

gem exemplificativas para um homem adulto variam de cerca de 0,05 a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal de composto ativo por dia, que podem ser administrados em dose única (por exemplo, como um bolo ou como uma infusão por um período à dose máxima tolerada ou abaixo dela) ou na forma de doses divididas individuais (por exemplo, como dosagens consecutivas abaixo da dose máxima tolerada), tal como de 1 a 4 vezes ao dia. Ficará entendido que o nível de dose específico e a frequência de administração para qualquer indivíduo particular podem ser variados e vão depender de uma variedade de fatores que incluem a atividade do composto específico empregado, a estabilidade metabólica e a duração de ação do composto, a espécie, a idade, o peso corporal, o estado de saúde em geral, o sexo e a dieta do indivíduo, o modo e a hora de administração, a taxa de excreção, a combinação de drogas e a severidade da condição particular.

Conforme aqui usado, o termo "animal" de preferência inclui indivíduos tais como animais domésticos, e mais preferivelmente seres humanos.

Conforme aqui usado, o termo "pró-droga" refere-se a um composto precursor que vai sofrer ativação metabólica in vivo para produzir a droga ativa. Dessa forma, por exemplo, um composto da invenção administrado a um indivíduo vai sofrer ativação metabólica e regenerar a combretastatina A-4 devido à dissociação de um composto da presente invenção, por exemplo, pela ação de fosfatases inespecíficas endógenas no plasma.

Conforme aqui usado, o termo "amina orgânica" refere-se a um composto orgânico (isto é, contendo carbono) contendo pelo menos um grupo amina primária (isto é, $-NH_2$), secundária (isto é, $-NH-$) ou terciária (isto é $-N-$) capaz de formar um sal fosfato no composto da fórmula I da presente invenção. Onde existir mais de um grupo amina primária, secundária e/ou terciária na referida amina orgânica, qualquer desses grupos capazes de formar o grupo amônio quaternário QH^+ de fórmula I pode fazê-lo. A presente definição de "amina orgânica" não abrange compostos de aminoácidos (veja o pedido provisório intitulado "Combretastatin A-4 Phosphate Mono- And Di-Amino Acid Salt Prodrugs", depositado por

Venit como Pedido US Série N° 60/232,568 em 14 de setembro de 2000, aqui incorporado em sua integridade a título de referência) nem determinados compostos descritos no documento WO 99/35150 (glicosamina, piperazina, piperidina, 6'-metoxi-cinchonan-9-ol, cinchonan-9-ol, pirazol, piridina, 5 tetraciclina, imidazol, adenosina, verapamil, morfolina), aqui incorporado em sua integridade a título de referência. A amina orgânica empregada é de preferência um composto fisiologicamente tolerável selecionados dos seguintes grupos:

(a) aminas orgânicas tendo um pK_a maior ou igual a 7, mais 10 preferivelmente um pK_a maior ou igual a 8;

(b) aminas orgânicas onde o nitrogênio que forma o cátion de amônio quaternário QH^+ na fórmula I está ligado a um grupo alifático opcionalmente substituído ou a um grupo heterocíclico não-aromático opcionalmente substituído (ou a dois ou três grupos alifáticos e/ou heterocíclicos 15 não-aromáticos opcionalmente substituídos no caso de aminas secundárias ou terciárias, respectivamente). O "grupo alifático" é um hidrocarboneto de cadeia reta ou ramificada, saturado ou insaturado (por exemplo, alcano, alqueno ou alquino) tendo de 1 a 20, de preferência 1 a 12, mais preferivelmente 1 a 6 átomos de carbono na cadeia. O "grupo heterocíclico não- 20 aromático" é um anel saturado ou parcialmente insaturado contendo o nitrogênio que forma o cátion de amônio quaternário QH^+ na fórmula I assim como, opcionalmente, outros heteroátomos no anel tais como átomos de O, S ou N adicional. "Substituintes opcionais" de preferência são um ou mais substituintes que fornecem uma amina orgânica que, quando empregada na 25 fórmula I da presente invenção, resulta em sais fosfato da fórmula I que são cristalinos e praticamente não-higroscópicos ou não-higroscópicos. "Substituintes opcionais" preferidos incluem grupos hidroxila, amino (isto é, $-NH_2$) ou alcóxi (isto é, $-O$ -alquila), mais preferivelmente um ou mais grupos hidroxila; e/ou

30 (c) aminas orgânicas onde o nitrogênio que forma o cátion de amônio quaternário QH^+ na fórmula I é uma amina primária ligada a um grupo alifático opcionalmente substituído ou uma amina secundária ligada a

dois grupos alifáticos opcionalmente substituídos, onde os substituintes opcionais são um ou mais grupos hidroxila ou amino, mais preferivelmente grupos hidroxila.

5 Naturalmente, qualquer amina orgânica dada selecionada como amina preferida para ser usada na presente invenção pode ter as propriedades de dois ou mais grupos (a) a (c) descritos acima (por exemplo, ter um pK_a maior ou igual a 7 e ser uma amina alifática opcionalmente substituída, como descrito em (c)).

10 Qualquer amina orgânica definida dessa maneira é adequada para uso nos compostos de fórmula I da presente invenção, assim como nas presentes composições farmacêuticas e métodos. O termo "amina orgânica" inclui compostos na forma de sal com outras porções ácidas e/ou básicas (onde, por exemplo, um grupo amina forma o sal fosfato de fórmula I e um outro grupo amina forma um sal com uma porção ácida). Assim, o restante da amina orgânica compreendida em um composto da presente invenção
15 também pode conter porções salinas.

Aminas orgânicas exemplificativas incluem, porém certamente sem limitação, trometamina, dietanolamina, glicamina, N-metilglicamina, etilenodiamina e 2-(4-imidazolil) etil amina.

20 Um sal de "monoamina orgânica" de fosfato de combretastatina A-4 da fórmula I contém um grupo amina orgânica Q como parte de R^1 ou R^2 definidos acima; um sal de "diamina orgânica" de fosfato de combretastatina A-4 da fórmula I contém dois grupos amina orgânica Q, uma parte de R^1 e uma parte de R^2 definidos acima. Sais de "monoamina orgânica" da fórmula
25 I são preferidos. Definições correspondentes aplicam-se a "monoaminoácido", "diaminoácido", "éster de monoaminoácido" e "éster de diaminoácido".

Qualquer aminoácido adequado tem aplicações nesta invenção, que incluem numerosos aminoácidos naturais e não-naturais tendo aplicações em um composto da presente invenção. Exemplos particulares incluem, porém certamente sem limitação, ornitina, histidina, lisina, arginina e
30 triptofano, para mencionar apenas alguns.

Conforme aqui usado, o termo "aminoácido" refere-se a um

composto contendo um grupo amino básico (NH_2) e um grupo ácido carboxílico ácido (COOH), incluindo compostos na forma zwitteriônica (onde os grupos amino e carboxila juntos formam um zwitterion ou um sal interno) ou na forma de sal com outras porções ácidas e/ou básicas (onde, por exemplo, o

5 aminoácido contém um grupo ácido carboxílico além do grupo α - COOH , e o primeiro está na forma de sal com um metal alcalino). Assim sendo, o restante de um aminoácido compreendido em um composto da presente invenção também pode conter porções na forma de sal. O termo inclui aminoácidos não-naturais bem como aminoácidos naturais, tais como α -aminoácidos

10 (especialmente L-aminoácidos), muitos dos quais são os blocos formadores de proteínas. O termo "aminoácidos naturais" refere-se aos 20 aminoácidos que são comuns em todas as proteínas, isto é, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina, arginina, histidina, aspar-

15 tato e glutamato. A expressão "aminoácidos não-naturais" refere-se a aminoácidos que geralmente não são comuns em todas as proteínas, tais como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, N-metilisina, γ -carboxiglutamato, selenocisteína, ornitina e citrulina. Aminoácidos tendo dois ou mais átomos de nitrogênio são adequados para uso nos compostos de fórmula I da presente

20 invenção quando Q tem a definição (B), assim como nas presentes composições farmacêuticas e métodos.

Conforme aqui usado, o termo "cadeia lateral" em relação a um aminoácido é a porção de um aminoácido que é diferente para cada aminoácido, especialmente o grupo ligado ao carbono que liga os grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$ de um aminoácido.

25

Conforme aqui usado, o termo "praticamente não-higroscópico", com referência a um composto, de preferência significa menos de 1% de ganho de peso de água por peso do composto (mais preferivelmente menos de 0,5% de ganho de peso de água por peso do composto) medido nas seguintes condições: uma temperatura de aproximadamente 25°C , umidades

30 relativas de 20% a 95%, e em condições de equilíbrio (isto é, medido em um momento em que as taxas de absorção de desabsorção de umidade estão

equilibradas), em relação à medição efetuada a 25°C e 0% de umidade relativa. Conforme aqui usado, o termo "não-higroscópico", com referência a um composto, de preferência significa nenhum ganho de peso mensurável por peso do composto, medido da maneira acima.

- 5 Conforme aqui usado em relação a um aminoácido, o termo "éster" refere-se a um grupo ácido carboxílico (isto é, um grupo -COOH) do aminoácido que está na forma -COO(G) onde G é uma porção orgânica tal como um grupo alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, cicloalquenila, arila ou heterociclo não-substituído ou substituído. Preferidos como grupos G são
- 10 grupos C₁₋₆ alquila tais como metila ou etila. Mais preferidos como ésteres de aminoácido são ésteres C₁₋₆ alquílicos de glicina, tais como éster metílico de glicina ou éster etílico de glicina.

- Conforme aqui usado, o termo "sal" refere-se a um composto da presente invenção que é um composto iônico, por exemplo, tendo uma liga-
- 15 ção iônica entre o nitrogênio quaternário da porção amina orgânica, aminoácido ou éster aminoácido QH⁺ e a porção fosfato do fosfato de combretastatina.

- Conforme aqui usado, uma "ligação iônica" é uma ligação química formada pela atração eletrostática entre íons ou estruturas químicas
- 20 positivas e negativas. Uma ligação deste tipo pode ser facilmente dissociada (ou ionizada) em uma solução aquosa. A dissolução de um composto da presente invenção em um solvente, particularmente um solvente aquoso, assim como a liofilização de tal solução são modalidades abrangidas pela presente invenção.

- Conforme aqui usado, a expressão "fisiologicamente tolerável" na descrição de uma espécie química presente in vivo, tal como uma amina orgânica, aminoácido ou éster de aminoácido, refere-se à incapacidade da
- 25 espécie química para induzir efeitos secundários inaceitáveis nas condições de tratamento do animal. De preferência, espécies químicas "fisiologicamente toleráveis" não produzem efeitos secundários prejudiciais.
- 30

Como explicado acima, a presente invenção refere-se a um método para modular o crescimento e/ou a metástase de tumores, de prefe-

rência tumores sólidos, usando um composto da presente invenção. Conforme aqui usado, os termos "tumor" ou "crescimento tumoral" podem ser usados intercambiavelmente, e referem-se a um crescimento anormal de tecido resultante da multiplicação progressiva descontrolada de células e

5 não tendo qualquer função fisiológica. Um tumor sólido pode ser maligno, por exemplo tendendo a metastatizar e constituir uma ameaça de vida, ou benigno. Exemplos de tumores sólidos que podem ser tratados de acordo com um método da presente invenção incluem sarcomas e carcinomas tais como, porém sem limitação: fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma,

10 condrossarcoma, linfoma, tal como linfoma não-Hodgkin, sarcoma osteogênico, cordoma, tumores esofágicos, angiossarcoma, osteossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, sarcoma sinovial, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomi-

15 ossarcoma, carcinoma de cólon, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer pancreático, câncer de mama tal como câncer de mama metastático, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, adenocarcinoma de cólon e reto, carcinoma de glândulas sudoríparas, carcinoma de glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma

20 medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, metástases de fígado, carcinoma de duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, carcinoma tireoidiano tal como câncer tireoidiano anaplástico, tumor tireoidiano medular, tumor de Wilm, câncer cervical, tumor testicular, tumores pulmonares tais como carcinoma pulmonar não-

25 microcelular, carcinoma pulmonar microcelular, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma e retinoblastoma.

Além do mais, os tumores compreendendo alterações disproliferativas (tais como metaplasias e displasias) podem ser tratados ou prevenidos com um composto ou um método da presente invenção em tecidos epiteliais tais como aqueles no cérvix, esôfago e pulmão. Assim sendo, a pre-

30

- sente invenção oferece o tratamento de condições que se sabe ou se suspeita precederem a evolução para neoplasia ou câncer, em particular, onde tenha ocorrido o crescimento de células não-neoplásticas consistindo em hiperplasia, metaplasia ou, mais particularmente, displasia (para uma leitura
- 5 dessas condições de crescimento anormal, veja Robbins e Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª ed., W. B. Saunders Co., Filadélfia, pp. 68-79). Hiperplasia é uma forma de proliferação celular controlada envolvendo um aumento no número de células em um tecido ou órgão, sem alteração significativa na estrutura ou função. Como um único exemplo, hiperplasia endometrial geralmente precede o câncer endometrial. Metaplasia é uma forma
- 10 de crescimento celular descontrolado no qual um tipo de célula adulta ou completamente diferenciada substitui um outro tipo de célula adulta. A metaplasia pode ocorrer em células do tecido epitelial ou conjuntivo. A metaplasia atípica envolve um epitélio um tanto desordenadamente metaplástico.
- 15 A displasia freqüentemente é um precursor de câncer, e é encontrado principalmente nos epitélios; esta é a forma mais desordenada de crescimento de células não-neoplásticas, envolvendo uma perda na uniformidade celular individual e na orientação arquitetural das células. As células displásticas geralmente possuem núcleos anormalmente grandes e fortemente coloridos,
- 20 e apresentam pleomorfismo. A displasia caracteristicamente ocorre onde existe irritação ou inflamação crônica, e normalmente é encontrada no cérvix, passagens respiratórias, cavidade oral e vesícula biliar. Para uma leitura de tais distúrbios, veja Fishman et al., 1985, Medicine, 2ª ed., J. B. Lippincott Co., Filadélfia.
- 25 Outros exemplos de tumores que são benignos e podem ser tratados com um composto ou um método da presente invenção incluem malformações arteriovenosas (AV), particularmente em sítios intracranianos e mioleomas.
- Os compostos da presente invenção também são úteis em métodos
- 30 todos para o tratamento de distúrbios proliferativos vasculares não-malignos tais como degeneração macular, psoríase e restenose, e, em geral, no tratamento de doenças inflamatórias caracterizadas por proliferação vascular.

Tais doenças e distúrbios estão descritos no documento WO 00/48606, aqui incorporado em sua integridade a título de referência.

Composições farmacêuticas

A presente invenção também se estende a uma composição
5 farmacêutica compreendendo um composto da presente invenção descrito acima, e um veículo farmaceuticamente aceitável para o mesmo. A expressão "farmaceuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que são fisiologicamente toleráveis e de preferência tipicamente não produzem reações alérgicas ou desagradáveis similares, tais
10 como indisposição, tonteira e outras, quando administradas a seres humanos. De preferência, conforme aqui usado, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por um órgão regulador do governo federal ou estadual ou incluído na Farmacopéia Norte-Americana ou outras farmacopéias geralmente aceitas para uso em animais, e mais particularmente em
15 seres humanos. O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o composto é administrado. Esses veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem petroleira, animal, vegetal ou sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim, álcoois, por
20 exemplo etanol, propanol, polietileno glicol, propileno glicol, sorbitol, glicerina etc., Cremophor e outros, incluindo misturas dos mesmos. Soluções aquosas ou soluções salinas aquosas e soluções aquosas de dextrose e glicerol são de preferência empregadas como veículos, particularmente para soluções injetáveis. Veículos farmacêuticos adequados estão descritos em
25 "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser formulada para administração por injeção, ou para administração oral, pulmonar, nasal, transdérmica, ocular ou outras formas de administração. Em geral, a presente invenção compreende composições farmacêuticas com
30 prendendo quantidades eficazes de um composto da presente invenção junto com, por exemplo, diluentes, preservativos, solubilizantes, emulsificantes, adjuvantes e/ou outros veículos farmaceuticamente aceitáveis. Tais

composições incluem diluentes com vários teores de tampão (por exemplo, TRIS ou outras aminas, carbonatos, fosfatos, aminoácidos, por exemplo clo-
 5 ridrato de glicinamida (especialmente na faixa de pH fisiológico), N-glicilglicina, fosfato de sódio ou potássio (dibásico, tribásico) etc. ou TRIS-
 HCl ou acetato), pH e resistência iônica; aditivos tais como detergentes e
 agentes solubilizantes (por exemplo, tensoativos tais como Pluronic, Twe-
 10 en 20, Tween 80 (Polisorbato 80), Cremophor, polióis tais como polietileno
 glicol, propileno glicol etc.), antioxidantes (por exemplo ácido ascórbico,
 metabissulfito de sódio), preservativos (por exemplo Thimersol, álcool ben-
 zílico, parabenos etc.) e substâncias de enorpamento (por exemplo açúca-
 res tais como sacarose, lactose, manitol, polímeros tais como polivinilpirroli-
 donas ou dextrana etc.) e/ou incorporação do material em preparações par-
 ticuladas de compostos poliméricos tais como ácido polilático, ácido poli-
 glicólico etc. ou em lipossomas. Ácido hialurônico também pode ser usado.
 15 Tais composições podem ser empregadas para afetar o estado físico, a es-
 tabilidade, a taxa de liberação in vivo e a taxa de depuração in vivo de um
 composto da presente invenção. Veja, por exemplo, Remington's Pharma-
 ceutical Sciences, 18^a Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)
 páginas 1435-1712, que está aqui incorporado a título de referência. As
 20 composições podem ser preparadas, por exemplo, na forma líquida, ou po-
 dem estar na forma de pó seco, tal como a forma liofilizada. Métodos parti-
 culares de administração dessas composições estão descritos abaixo.

O ajuste do pH pode ser feito da maneira desejada. É preferido,
 por exemplo, aumentar a solubilidade dos compostos da presente invenção
 25 para ajustar o pH das composições farmacêuticas compreendendo esses
 compostos a um pH maior que 7, mais preferivelmente um pH maior que 8
 (tal como um pH de cerca de 8,5).

Para sais da pró-droga CA4P tais como os de fórmula I da pre-
 sente invenção, a formação da matriz ativa (CA4) ocorre a um pH mais bai-
 30 xo. Os presentes inventores descobriram que a adição de um agente tam-
 ponante/de ajuste de pH impede a queda do pH durante o congelamento,
 dessa forma proporcionando uma formulação liofílica mais estável. Foi ainda

surpreendentemente descoberto que, para formulações liofílicas de sais da pró-droga CA4P tais como os da fórmula I da presente invenção, ajuste do pH empregando hidróxido de sódio como o agente de ajuste de pH pode resultar na formação da matriz ativa (cis) CA4 (que é infimamente solúvel em água e pode formar particulados indesejáveis em uma solução aquosa), e que o uso de um agente de ajuste de pH diferente de hidróxido de sódio pode diminuir a formação de CA4. O uso de TRIS como agente de ajuste de pH e tampão, por exemplo, diminui a formação da matriz ativa (cis) CA4 em relação ao uso de hidróxido de sódio para ajuste de pH, e portanto é particularmente preferido para uso nas composições da presente invenção. Por exemplo, foram observados compostos da fórmula I onde Q é TRIS ou histidina de modo que líofilos preparados usando NaOH como agente de ajuste de pH mostraram hidrólise da matriz cis-CA4 mediante armazenamento ao passo que ajuste do pH usando um agente tamponante adequado diferente de NaOH, por exemplo TRIS, diminuiu a formação da matriz insolúvel. Um outro aspecto da presente invenção refere-se portanto a composições liofílicas farmacêuticas (de preferência preparadas de soluções com pH ajustado) compreendendo um composto da presente invenção e um agente de ajuste de pH diferente de hidróxido de sódio, de preferência compreendendo uma base orgânica tal como um aminoácido ou uma amina orgânica, especialmente TRIS, como agente de ajuste de pH. Assim, embora o uso de hidróxido de sódio incluído nas composições liofílicas da presente invenção, tal uso é menos preferido, por exemplo, para composições farmacêuticas a serem administradas por via intravenosa onde a formação de sólidos é indesejável.

Também podem ser preparadas composições farmacêuticas, por exemplo soluções (especialmente soluções aquosas, por exemplo, a concentrações de 15 mg/ml, 30 mg/ml e 60 mg/ml), compreendendo um composto da presente invenção e um agente de ajuste de pH que inclui hidróxido de sódio, de preferência compreendendo uma base orgânica tal como um aminoácido tal como arginina, glicina, ou uma amina orgânica, por exemplo etanolamina, especialmente TRIS, como o agente de ajuste de pH.

A estabilidade da solução aquosa aumenta quando o pH da formulação aumenta de pH 9,0 para pH 10,5. A estabilidade da solução também é melhor a resistências iônicas mais altas. Por exemplo, a formulação de uma solução com NaOH como o agente de ajuste de pH a um pH igual a 10 pode
5 indicar estabilidade comparável à da formulação liofilizada preparada com TRIS como o agente tamponante a um pH igual a 8,5.

Proteção contra luz é de preferência empregada para as composições farmacêuticas da presente invenção.

Métodos para modular o crescimento tumoral ou a metástase

10 Combretastatina é um agente antimitótico muito potente derivado da madeira externa de *Combretum caffrum* e apresenta potente toxicidade contra uma ampla variedade de linhagens celulares de câncer humano. Conseqüentemente, a administração de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção a um indivíduo pode reduzir o crescimento
15 tumoral e/ou a metástase no indivíduo ou, alternativamente, se o indivíduo não tiver metástase ou crescimento tumoral detectável, vai prevenir contra metástase e/ou crescimento tumoral. Naturalmente, um composto da presente invenção pode ser administrado isolado ou com um veículo farmacêuticamente aceitável.

20 Por conseguinte, a presente invenção refere-se a métodos para modular o crescimento tumoral ou a metástase, o qual compreende, inter alia, a administração de uma quantidade eficaz de um sal de mono- ou diamina orgânica da pró-droga fosfato de combretastatina A-4 da presente invenção que regenera rapidamente a combretastatina A-4 in vivo. Como explicado acima, a expressão "quantidade eficaz", como aqui usada, refere-se
25 à quantidade do composto da presente invenção administrada a um indivíduo que seja suficiente para modular o crescimento tumoral ou a metástase, tal como para diminuir o crescimento tumoral e a metástase em um animal ou, alternativamente, para impedir a formação de crescimento tumoral em
30 um animal que não apresentava qualquer formação tumoral antes da administração. O versado na técnica pode determinar facilmente a quantidade eficaz de um composto da presente invenção a ser administrada, por exem-

plo, usando técnicas de rotina.

Além disso, numerosos meios de administração de um composto da presente invenção possuem aplicações em um método da presente invenção. Em particular, um composto ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser introduzido por via parenteral, transmucosa, por exemplo oral, nasal ou retal, ou transdérmica. De preferência, a administração é parenteral, por exemplo por injeção intravenosa, e também inclui, porém sem limitação, administração intra-arterial, intramuscular, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intraventricular e intracraniana. O composto ou a composição farmacêutica pode, por exemplo, ser introduzida por injeção no(s) tumor(es) sendo tratado(s) ou nos tecidos que envolvem o(s) tumor(es). "Intensificador da penetração mucosa" refere-se a um reagente que aumenta a taxa ou facilidade de penetração transmucosa de um composto da presente invenção tal como, porém sem limitação, um sal biliar, ácido graxo, tensoativo ou álcool. Em modalidades específicas, o intensificador de permeação pode ser colato de sódio, dodecil sulfato de sódio, desoxicolato de sódio, taurodesoxicolato, glicocolato de sódio, dimetil sulfóxido ou etanol. Intensificadores de penetração adequados também incluem ácido glicirretínico (Patente US N° 5.112.804 concedida a Kowarski) e polysorbato 80, este último de preferência combinado com um tensoativo não-iônico tal como nonoxinol-9, laureth-9, poloxâmero-124, octoxinol-9 ou lauramida-DEA (patente européia EP 0 242 643 B1 de Stoltz).

Em uma outra modalidade, de acordo com um método da presente invenção, um composto ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser distribuído em uma vesícula, em particular um lipossoma [veja Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid*, pp. 317-327; veja *ibid* em geral.].

Em ainda uma outra modalidade, tal composto ou composição farmacêutica pode ser distribuído em um sistema de liberação controlada, tal como usando uma infusão intravenosa, um bomba osmótica implantável,

um emplastro transdérmico, lipossomas ou outros modos de administração. Em uma modalidade particular, pode-se usar uma bomba [veja Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)]. Em

5 uma outra modalidade, pode-se usar materiais poliméricos [veja *Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Flórida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger e Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); veja tam-

10 bém Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)]. Em ainda uma outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado próximo aos tecidos alvo do indivíduo, dessa forma requerendo somente uma fração da dose sistêmica [veja, por exemplo, Goodson, in *Medical Applications of*

15 *Controlled Release, supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. De preferência, um dispositivo de liberação controlada é introduzido em um animal próximo ao sítio de ativação imunológica inadequada ou de um tumor. Outros sistemas de liberação controlada estão discutidos na revisão feita por Langer [*Science* 249:1527-1533 (1990)].

20 Administração parenteral

Como explicado acima, um composto ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrado por via parenteral a um indivíduo, e dessa forma evitar a administração pelo trato gastrointestinal do indivíduo. Técnicas particulares de administração parenteral tendo aplica-

25 ções nesta invenção incluem, porém certamente sem limitação, injeções intravenosas (bolo ou infusão), injeções intraperitoneais, injeções subcutâneas, injeções intramusculares ou cateterizações, para mencionar apenas algumas. Composições exemplificativas para administração parenteral incluem soluções ou suspensões injetáveis que podem conter, por exemplo,

30 diluentes ou solventes atóxicos adequados, parenteralmente aceitáveis, tais como manitol, 1,3-butanodiol, água, sistemas aquosos tamponados, solução de Ringer, uma solução isotônica de cloreto de sódio, ou outros agentes

dispersantes ou umectantes e agentes de suspensão adequados, que incluem mono- ou diglicerídeos sintéticos, e ácidos graxos que incluem ácido oléico, álcoois e/ou Cremophor. O ajuste do pH pode ser feito da maneira desejada.

5 Distribuição nasal

A distribuição nasal ou transmucosa de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção também é contemplada. A distribuição nasal permite a passagem de tal composto diretamente para a corrente sangüínea após a administração de uma quantidade eficaz do composto ao nariz, sem necessidade de deposição do produto no pulmão. As formulações para distribuição nasal incluem aquelas com dextrana ou ciclodextrina, bem como outros polímeros tais como polivinilpirrolidonas, metilcelulose ou outras celulosas.

Para administração nasal, um dispositivo útil é um frasco rígido e pequeno ao qual está conectado um pulverizador de dose regulada. Em uma modalidade, a dose regulada é distribuída introduzindo-se um composto ou composição farmacêutica da presente invenção em uma câmara de volume definido, que tem uma abertura dimensionada para aerosolizar uma formulação aerosol formando um spray quando o líquido na câmara é comprimido. A câmara é comprimida para administrar o composto ou composição farmacêutica. Em uma modalidade específica, a câmara é um sistema de êmbolo. Tais dispositivos encontram-se comercialmente disponíveis.

Alternativamente, pode-se usar um frasco plástico compressível tendo uma abertura dimensionada para aerosolizar uma formulação aerosol. A aerosolização ocorre quando o frasco é comprimido. A abertura normalmente fica situada na parte superior do frasco, e a parte superior geralmente é afunilada para se ajustar parcialmente às fossas nasais para administração eficiente da formulação aerosol. De preferência, o inalador nasal vai oferecer uma quantidade regulada da formulação aerosol para administração de uma dose regulada de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção.

Para distribuição transmucosa, também é contemplado o uso de

intensificadores de permeação.

Distribuição pulmonar

Esta invenção também contempla a distribuição pulmonar de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção. Um composto
 5 ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser distribuído aos pulmões de um mamífero enquanto é inalado e atravessa o revestimento epitelial do pulmão para atingir a corrente sangüínea. Outros relatórios sobre isto incluem Adjei et al. [*Pharmaceutical Research*, 7:565-569 (1990); Adjei et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (1990)
 10 (acetato de leuprolida); Braquet et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard et al., *Annals of Internal Medicine*, vol. III, pp. 206-212 (1989) (α 1-antitripsina); Smith et al., *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (1989) (α -1-proteinase); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (1990) (hormônio de crescimento humano recombinante); Debs et al., *J. Immunol.* 140:3482-3488 (1988) (interferon- γ e fator alfa de necrose tumoral), Platz et al., Patente US N° 5.284.656 (fator estimulante de colônia de granulócitos)]. Um método e uma composição para distribuição pulmonar de drogas para efeito sistêmico estão des-
 15 critos na Patente US N° 5.451.569, concedida em 19 de setembro de 1995 a Wong et al.

Também contemplada para uso na prática desta invenção encontra-se uma ampla gama de dispositivos mecânicos desenhados para distribuição pulmonar de produtos terapêuticos que incluem, porém sem li-
 25 mitação, nebulizadores, inaladores de dose regulada e inaladores de pó, todos familiares para os versados na técnica. Quanto à construção do dispositivo de distribuição, qualquer forma de aerosolização conhecida na literatura, que inclui, porém sem limitação, frascos spray, nebulização, atomização ou aerosolização por bomba de uma formulação líquida, e aerosolização de uma formulação em pó seco, pode ser usada na prática da inven-
 30 ção.

Alguns exemplos específicos de dispositivos comercialmente

disponíveis adequados para a prática desta invenção são o nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; o nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; o inalador de dose regulada Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina do Norte; e o inalador de pó Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos esses dispositivos requerem o uso de formulações adequadas para a distribuição de uma composição farmacêutica da presente invenção. Tipicamente, cada formulação é específica para o tipo de dispositivo empregado e pode envolver o uso de um material propelente apropriado, além dos diluentes, adjuvantes e/ou outros veículos usuais úteis em terapia. Também é contemplado o uso de lipossomas, microcápsulas ou microesferas, complexos de inclusão ou outros tipos de veículos. A composição farmacêutica quimicamente modificada da presente invenção também pode ser preparada em diferentes formulações dependendo do tipo de modificação química ou do tipo de dispositivo empregado.

As formulações adequadas para uso com um nebulizador, seja a jato ou ultra-sônico, tipicamente vão compreender um composto ou composição farmacêutica da presente invenção dissolvido em água a uma concentração de cerca de 0,1 a 25 mg de ingredientes biologicamente ativos por ml de solução. A formulação também pode incluir um tampão e um açúcar simples (por exemplo, para estabilização e regulação da pressão osmótica de uma composição farmacêutica da presente invenção). A formulação para nebulizador também pode conter um tensoativo para reduzir ou impedir a agregação superficial induzida de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção causada pela atomização da solução na formação do aerosol.

As formulações para uso com um dispositivo inalador de dose regulada em geral vai compreender, por exemplo, um pó finamente dividido contendo um composto ou composição farmacêutica da presente invenção suspensão em um propelente com a ajuda de um tensoativo. O propelente pode ser qualquer material adequado empregado para tal, tal como um clo-

rofluorocarbono, um hidroclorofluorocarbono, um hidrofluorocarbono ou um hidrocarboneto, incluindo triclorofluormetano, diclorodifluormetano, diclorotetrafluoretanol e 1,1,1,2-tetrafluoretano, ou combinações dos mesmos. Tensoativos adequados incluem trioleato de sorbitan e lecitina de soja. Ácido oléico também pode ser útil como tensoativo.

As formulações aerossóis líquidas contêm um composto ou composição farmacêutica da presente invenção e um agente dispersante em um diluente fisiologicamente aceitável. As formulações aerossóis em pó seco da presente invenção podem conter uma forma sólida finamente dividida de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção e um agente dispersante. Seja com a formulação aerosol líquida ou em pó seco, a formulação deve ser aerosolizada. Isto é, ela deve ser decomposta em partículas líquidas ou sólidas para assegurar que aerosolizada vai realmente atingir as membranas mucosas das fossas nasais ou do pulmão. O termo "partícula aerosol" é usado neste relatório para descrever a partícula líquida ou sólida adequada para administração nasal ou pulmonar, isto é, aquela vai alcançar as membranas mucosas. Outras considerações incluem a construção do dispositivo de distribuição, componentes adicionais na formulação e características da partícula. Estes aspectos da administração nasal ou pulmonar de uma droga são bastante conhecidos na literatura, e a manipulação de formulações, meios de aerosolização e construção de um dispositivo de distribuição podem ser facilmente identificados pelo versado na técnica.

Em uma modalidade particular, o diâmetro dinâmico médio de massa será de 5 micrômetros ou menos para garantir que as partículas da droga vão alcançar os alvéolos pulmonares (Wearley, L. L., 1991, 1991, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8:333).

Como mencionado acima, em um aspecto particular da invenção, o dispositivo para aerosolização é um inalador de dose regulada. Um inalador de dose regulada fornece uma dosagem específica quando administrada, ao invés de uma dose variável que depende da administração. Este inalador de dose regulada pode ser usado com uma formulação aero-

sol líquida ou uma formulação aerosol em pó seco. Inaladores de dose regulada são bastante conhecidos na literatura.

5 Geralmente, a aerosolização de uma formulação líquida ou em pó seco para inalação no pulmão vai requerer um propelente. O propelente pode ser qualquer propelente geralmente usado na técnica. Exemplos não-limitativos específicos desses propelentes úteis são um clorofluorocarbono, um hidrofluorocarbono, um hidroclorofluorocarbono ou um hidrocarboneto, incluindo trifluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol e 1,1,1,2-tetrafluoroetanol, ou combinações dos mesmos.

10 Sistemas de distribuição de aerosol, tais como o inalador pressurizado de dose regulada e o inalador de pó seco, foram descritos por Newman, S. P., *Aerosols and the Lung*, Clarke, S. W. e Davia, D. editors, pp. 197-22, e podem ser usados junto com a presente invenção.

Formulações aerosóis líquidas

15 A presente invenção fornece formulações aerosóis líquidas e formas de apresentação de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção. Em geral, estas formas de apresentação contêm um composto ou composição farmacêutica da presente invenção em um diluente farmaceuticamente aceitável. Diluentes farmaceuticamente aceitáveis
20 incluem, porém sem limitação, água estéril, solução salina, solução salina tamponada, solução em dextrose e outras. Em uma modalidade específica, um diluente que pode ser usado na presente invenção ou na formulação farmacêutica da presente invenção é a solução salina tamponada com fosfato, ou um solução salina tamponada geralmente com um faixa de pH entre
25 7,0 e 8,0, ou água.

A formulação aerosol líquida da presente invenção pode incluir, como ingredientes opcionais, veículos, diluentes, agentes solubilizantes ou emulsificantes, tensoativos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

30 As formulações da presente modalidade também podem incluir outros agentes úteis para manutenção do pH, estabilização da solução ou para a regulação da pressão osmótica. Exemplos dos agentes incluem, porém sem limitação, sais tais como cloreto de sódio ou cloreto de potássio, e

carboidratos tais como glicose, galactose ou manose e outros.

Formulações aerossóis em pó seco

Também é contemplado que a presente formulação aerosol pode ser preparada como uma formulação em pó seco compreendendo uma
5 forma de pó finamente dividido de um composto ou composição farmacêutica da presente invenção e um dispersante.

As formulações a serem distribuídas de um dispositivo de inalação de pó podem compreender um pó seco finamente dividido contendo um composto ou uma composição farmacêutica da presente invenção, e tam-
10 bém podem incluir um agente de encorpamento tal como lactose, sorbitol, sacarose ou manitol em quantidades que facilitam a dispersão do pó do dispositivo, por exemplo, 50 a 90% em peso da formulação. Um composto ou composição farmacêutica da presente invenção podem ser mais vantajosa-
15 mente preparados na forma de particulado com um tamanho de partícula médio inferior 10 microns, mais preferivelmente 0,5 a 5 microns, para uma distribuição mais eficaz no pulmão distal.

Em uma outra modalidade, a formulação em pó seco pode compreender um pó seco finamente dividido contendo um composto ou composição farmacêutica da presente invenção, um agente dispersante e também
20 um agente de encorpamento. Agentes de encorpamento úteis com a presente formulação incluem agentes tais como lactose, sorbitol, sacarose ou manitol, em quantidades que facilitem a dispersão do pó do dispositivo.

Administração transdérmica

Vários e numerosos métodos são conhecidos na literatura para
25 a administração transdérmica de uma droga, por exemplo, por meio de um emplastro transdérmico. Emplastros transdérmicos estão descritos, por exemplo, na Patente US N° 5.407.713, concedida em 18 de abril de 1995 a Rolando et al.; Patente US N° 5.352.456, concedida em 4 de outubro de 1994 a Fallon et al.; Patente US N° 5.332.213, concedida em 9 de agosto de
30 1994 a D'Angelo et al.; Patente US N° 5.336.168, concedida em 9 de agosto de 1994 a Sibalis; Patente US N° 5.290.561, concedida em 1 de março de

1994 a Farhadieh et al.; Patente US N° 5.254.346, concedida em 19 de outubro de 1993 a Tucker et al.; Patente US N° 5.164.189, concedida em 17 de novembro de 1992 a Berger et al.; Patente US N° 5.163.899, concedida em 17 de novembro de 1992 a Sibalís; Patente US N° 5.088.977 e
5 5.087.240, ambas concedidas em 18 de fevereiro de 1992 a Sibalís; Patente US N° 5.008.110, concedida em 16 de abril de 1991 a Benecke et al.; e Patente US N° 4.921.475, concedida em 1 de maio de 1990 a Sibalís, todos os relatórios aqui incorporados em sua integridade a título de referência.

Será facilmente observado que uma via de administração trans-
10 dérmica pode ser melhorada pelo uso de um intensificador de penetração dérmica, por exemplo, tais como os intensificadores descritos na Patente US N° 5.164.189 (supra), Patente US N° 5.008.110 (supra) e Patente US N° 4.879.119, concedida em 7 de novembro de 1989 a Aruga et al., cujo relatório está aqui incorporado em sua integridade a título de referência.

15 Além disso, um composto ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrado por via tópica. Por exemplo, um composto pode ser misturado com um veículo de pomada formando uma composição que pode ser esfregada sobre a pele. Alternativamente, um composto da presente invenção pode ser dissolvido em um solvente que se
20 sabe permear a pele. Um exemplo particular de tal solvente é dimetil sulfóxido (DMSO). Formulações em gel também são contempladas.

Distribuição oral

Contempladas para uso nesta invenção são as formas de apresentação sólidas orais, que estão descritas em linhas gerais em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. 1990 (Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), capítulo 89, que está aqui incorporado a título de referência.
25 Formas de apresentação sólidas incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, trociscos ou pastilhas, cápsulas ou péletes. Também, encapsulação lipossomal ou proteinóide podem ser usadas para formular um composto ou
30 composição farmacêutica da presente invenção (como, por exemplo, as microesferas proteinóides descritas na Patente US N° 4.925.673). Encapsula-

ção lipossomal pode ser usada e os lipossomas podem ser derivatizados com vários polímeros (por exemplo, Patente US N° 5.013.556). Uma descrição de formas de apresentação sólidas possíveis para uso terapêutico foi dada por Marshall, K. in: *Modern Pharmaceutics* editado por G. S. Banker e C. T. Rhodes, capítulo 10, 1979, aqui incorporado a título de referência. A formulação pode incluir um composto ou composição farmacêutica da presente invenção e ingredientes inertes que permitem proteção contra o ambiente estomacal e a liberação do material biologicamente ativo no intestino.

Também são especificamente contempladas as formas de apresentação orais de um composto da presente invenção, onde o composto pode ser quimicamente modificado para que a distribuição oral do derivado seja eficaz. Em geral, a modificação química contemplada é a ligação de pelo menos uma porção à molécula componente, onde a porção permite (a) inibição de proteólise; e (b) absorção na corrente sangüínea do estômago ou intestino. O aumento da estabilidade geral de um composto da presente invenção e o aumento do tempo de circulação no corpo também são desejados. Exemplos dessas porções incluem: polietileno glicol, copolímeros de etileno glicol e propileno glicol, carboximetil celulose, dextrana, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona e poliprolina. Abuchowski e Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" in: *Enzymes as Drugs*, Hocenberg e Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Outros polímeros que poderiam ser usados são poli-1,3-dioxolana e poli-1,3,6-tioxocana. Preferidos para uso farmacêutico, como indicado acima, são porções do tipo polietileno glicol.

Para um composto da presente invenção, o local de liberação pode ser o estômago, o intestino delgado (o duodeno, o jejuno ou o íleo) ou o intestino grosso. O versado na técnica pode preparar formulações que não vão dissolver no estômago, mas vão liberar um composto da presente invenção no duodeno ou em alguma parte do intestino. De preferência, a liberação vai evitar efeitos prejudiciais sobre o ambiente estomacal, seja por proteção do composto ou por liberação do material biologicamente ativo fora do ambiente estomacal, tal como no intestino.

Para assegurar plena resistência gástrica, é essencial um revestimento impermeável a pH de pelo menos 5,0. Exemplos dos ingredientes inertes mais comuns que são usados como revestimentos entéricos são trimelitato de acetato de celulose (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinila (PVAP),
5 Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulose (CAP), Eudragit L, Eudragit S e Shellac. Estes revestimentos podem ser usados como filmes mistos.

Também pode-se usar sobre os comprimidos um revestimento
10 ou mistura de revestimentos, que não se destina à proteção contra o estômago. Isto pode incluir revestimentos de açúcar ou revestimentos que facilitam a deglutição do comprimido. As cápsulas podem consistir em um invólucro duro (tal como gelatina) para distribuição de terapêutico seco, isto é, pó; para formas líquidas, pode-se usar um invólucro de gelatina mole. O
15 material de invólucro das cápsulas pode ser amido espesso ou outro papel comestível. Para pílulas, pastilhas, comprimidos modelados ou pílulas trituradas pode-se usar técnicas de aglomeração por via úmida.

Um composto da presente invenção pode, por exemplo, ser incluído na formulação como multiparticulados finos na forma de grânulos ou
20 péletes de tamanho de partícula de cerca de 1 mm. A formulação do material para administração de cápsula também pode estar na forma de pó, tampões levemente prensados ou mesmo como comprimidos. Também, um composto ou composição farmacêutica da presente invenção pode ser preparado por compressão.

25 Colorantes e agentes flavorizantes também podem ser incluídos. Por exemplo, o composto pode ser formulado (tal como por encapsulação em lipossomas ou microesferas) e em seguida ser ainda colocado em um produto comestível, tal como um refrigerante contendo colorantes e agentes flavorizantes.

30 Pode-se diluir ou aumentar o volume de um composto da presente invenção ou de uma composição farmacêutica com um material inerte. Estes diluentes podem incluir carboidratos, especialmente manitol, a-

lactose, lactose anidra, celulose, sacarose, dextranas modificadas e amido. Certos sais inorgânicos também podem ser usados como cargas que incluem trifosfato de cálcio, carbonato de magnésio e cloreto de sódio. Alguns diluentes comercialmente disponíveis são Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress e Avicell.

Desintegrantes podem ser incluídos na formulação de uma composição farmacêutica da presente invenção em uma forma de apresentação sólida. Os materiais usados como desintegrantes incluem, porém sem limitação, amido, inclusive o desintegrante comercial à base de amido, Explotab. Glicolato de amido sódico, Amberlite, carboximetilcelulose sódica, ultramilopectina, alginato de sódio, gelatina, casca de laranja, carboximetil celulose ácida, esponja natural e bentonita podem ser usados. Uma outra forma dos desintegrantes são as resinas de troca catiônica insolúveis. Gomas em pó podem ser usadas como desintegrantes e como aglutinantes e estas podem incluir gomas em pó tais como ágar, caraia ou tragacanto. Ácido algínico e seu sal sódico também são úteis como desintegrantes.

Aglutinantes podem ser usados para manter um composto ou composição farmacêutica da presente invenção unido para formar um comprimido duro e incluem materiais de produtos naturais tais como acácia, tragacanto, amido e gelatina. Outros incluem metil celulose (MC), etil celulose (EC) e carboximetil celulose (CMC). Polivinil pirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC) podem ambas ser usadas em soluções alcoólicas para granular o terapêutico.

Um agente antiatrito pode ser incluído na formulação de uma composição farmacêutica da presente invenção para impedir aderência durante o processo de formulação. Lubrificantes podem ser usados como uma camada entre o terapêutico e a parede da forma, e estes podem incluir, porém sem limitação, ácido esteárico incluindo seus sais de magnésio e de cálcio, politetrafluoretileno (PTFE), parafina líquida, óleos e ceras vegetais. Também podem ser usados lubrificantes solúveis tais como lauril sulfato de sódio, lauril sulfato de magnésio, polietileno glicol de vários pesos moleculares, Carbowax 4000 e 6000.

Agentes deslizantes que poderiam melhorar as propriedades de fluxo de um composto da presente invenção durante a formulação e ajudar o rearranjo durante a compressão podem ser adicionados. Os deslizantes podem incluir amido, talco, sílica pirogênica e silicoaluminato hidratado.

- 5 Aditivos que melhoram potencialmente a absorção de um composto da presente invenção administrado por via oral são, por exemplo, os ácidos graxos ácido oléico, ácido linoléico e ácido linolênico.

10 Formulação oral de liberação controlada pode ser desejável. A droga pode ser incorporada em uma matriz inerte que permite a liberação por mecanismos de difusão ou lixiviação, por exemplo, gomas. Matrizes de degeneração lenta também podem ser incorporadas na formulação. Alguns revestimentos entérico também possuem um efeito de liberação retardada.

15 Uma outra forma de liberação controlada de um composto da presente invenção é por um método à base do sistema terapêutico Oros (Alza Corp.), isto é, a droga é encerrada em uma membrana semipermeável que permite que a água entre e empurre a droga para fora através de uma única abertura pequena devido a efeitos osmóticos.

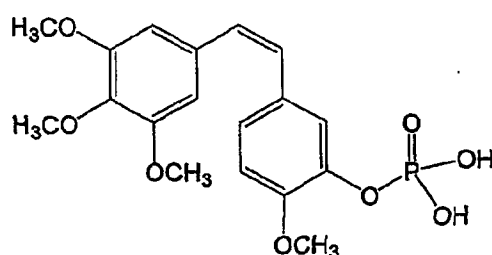
20 Outros revestimentos podem ser usados para a formulação. Estes incluem uma variedade de açúcares que poderiam ser aplicados em uma panela de revestimento. Um composto da presente invenção também poderia ser administrado como um comprimido revestido com uma película e os materiais usados neste caso podem ser, por exemplo, divididos em 2 grupos. O primeiro é o dos materiais não entéricos e incluem metil celulose, etil celulose, hidroxietil celulose, metilhidroxietil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose, carboximetil celulose sódica, povidona e os

25 polietileno glicóis. O segundo grupo inclui os materiais entéricos que normalmente são ésteres de ácido ftálico.

30 Uma mistura de materiais deve ser usada para proporcionar o revestimento de película ideal. O revestimento com película pode ser feito em uma panela para revestimento ou em um leito fluidificado ou por compressão.

Métodos de preparação

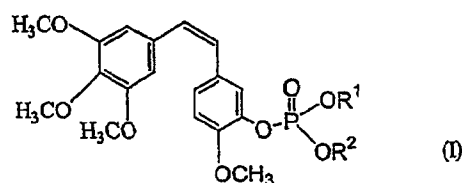
Os compostos da fórmula I descritos acima podem ser preparados por qualquer método adequado, por exemplo, por contato do composto Q desejado (especificamente amina orgânica, aminoácido ou éster de aminoácido) com o ácido livre do fosfato de combretastatina A-4 ("ácido livre de CA4P") que tem a estrutura:



em quantidades relativas suficientes para obter um sal de mono- ou diamina orgânica, um sal de mono- ou diaminoácido ou um sal de éster de mono- ou diaminoácido de fórmula I da presente invenção (por exemplo razão molar 1:1 para obter um sal de monoamina orgânica ou monoaminoácido 1:1, ou um excesso molar de amina orgânica em um solvente apropriado (por exemplo um solvente selecionado para um pKa desejável) para obter um sal de diamina orgânica). O ácido livre de CA4P pode ser obtido a partir do sal dissódico de CA4P, por exemplo, da maneira descrita nos exemplos abaixo.

O composto Q, tal como amina orgânica ou aminoácido, e o ácido livre de CA4P podem, por exemplo, ser contatados em um solvente adequado (de preferência um C₁ - C₆ álcool tal como isopropanol ou misturas aquosas do mesmo), de preferência seguido por colheita do composto de fórmula I como um composto cristalino por meios tal como filtração. O termo "solvente" inclui um único solvente ou misturas de dois ou mais solventes formando misturas de solventes miscíveis ou bifásicos. Onde desejado, o composto Q pode ser adicionado na forma de um sal, de preferência um sal farmacêuticamente aceitável, como descrito nos exemplos abaixo.

Assim, a presente invenção refere-se a um processo para preparar um composto tendo a estrutura geral da fórmula I:



onde um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e Q é

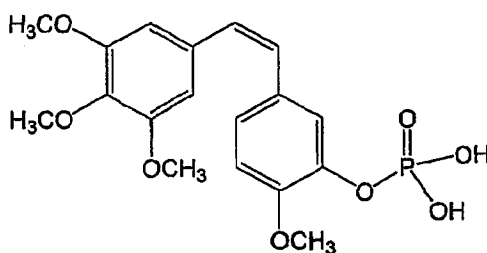
(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

5 (B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

10

Tal método da presente invenção compreende a etapa de contactar, em um solvente, o ácido livre de CA4P tendo a estrutura:



com um composto Q, onde Q é

15 (A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

(B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

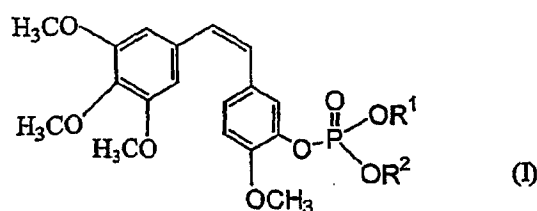
20

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de

amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

Opcionalmente, um composto da presente invenção produzido por um processo aqui descrito pode ser precipitado na forma cristalina do
5 solvente.

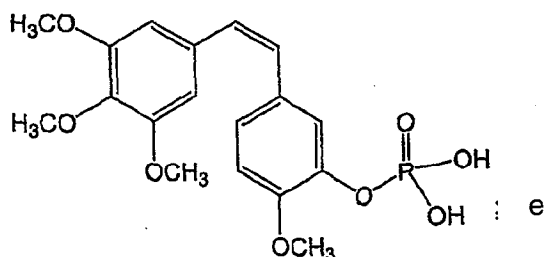
Além disso, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação de um composto tendo a estrutura geral da fórmula I:



como descrito acima, compreendendo as etapas de contatar o ácido livre de CA4P com um composto Q preferido (tal como histidina, um éster C_{1-6} alquí-
10 lico de glicina ou, mais preferivelmente, trometamina) no solvente, e em seguida colher o sal de histidina, de éster C_{1-6} alquílico de glicina ou, mais preferivelmente, de trometamina de CA4P na forma cristalina do solvente. Naturalmente, como explicado acima, numerosos solventes têm aplicações em um processo da presente invenção. Exemplos particulares incluem, po-
15 rém certamente sem limitação, $\text{C}_1 - \text{C}_6$ álcoois, tal como isopropanol ou misturas aquosas do mesmo. Em uma modalidade preferida da presente invenção, um processo aqui descrito produz o composto mono-trometamina de CA4P ("sal de mono-TRIS de CA4P" ou "sal de mono TRIS de CA4P"). Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, um processo
20 aqui descrito produz o composto mono-L-histidina de CA4P.

Misturas de um composto Q (amina orgânica, aminoácido ou sal de aminoácido) e ácido livre de CA4P, de preferência em uma solução tal como uma solução aquosa, também são contempladas nesta invenção como modalidades da invenção. Dessa forma, a presente invenção fornece ainda
25 composições formadas por misturação de compostos compreendendo:

(a) um ácido livre de CA4P tendo a estrutura:



(b) um composto Q, onde Q é

(A) uma amina orgânica contendo pelo menos um átomo de nitrogênio que, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ;

5 (B) um aminoácido contendo pelo menos dois átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ ; ou

(C) um aminoácido contendo um ou mais átomos de nitrogênio onde um dos átomos de nitrogênio, junto com um próton, forma um cátion de amônio quaternário QH^+ e, ainda, onde todos os grupos ácido carboxílico do aminoácido estão na forma de ésteres.

Opcionalmente, uma composição da presente invenção pode compreender ainda um veículo farmacologicamente aceitável.

A presente invenção será melhor entendida com referência aos
15 exemplos não limitativos a seguir, que são oferecidos a título exemplificativo da invenção. Os exemplos a seguir são apresentados com a finalidade de ilustrar de uma forma mais completa as modalidades preferidas da invenção. No entanto, eles não devem ser de modo algum interpretados como limitativos do amplo escopo da invenção.

20 EXEMPLO 1

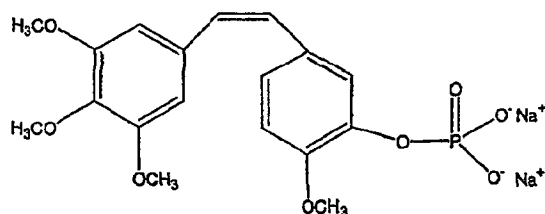
Sal de mono-trometamina da pró-droga CA4P

Em uma modalidade da presente invenção, um sal de mono-trometamina de CA4P foi descrito como um exemplo não limitativo de um composto da presente invenção. Com as informações dadas neste relatório,
25 um versado na técnica pode facilmente produzir uma variedade de sais de mono- ou diamina orgânica da pró-droga CA4P, tal como por adição da

amina orgânica desejada ao ácido livre de CA4P por um procedimento análogo àquele descrito a seguir, todos eles estando abrangidos pela presente invenção e pelas reivindicações anexas.

Reagentes e métodos

- 5 Todos os reagentes e químicos foram obtidos em fontes comerciais e usados sem ulterior purificação: Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Aldrich Chemical Co. rotulado 99,9+%, lote N° 01404PU), álcool isopropílico (B&J Brand, solvente com alto grau de pureza). Os espectros de RMN de múltiplos núcleos foram lidos em um espectrômetro Bruker DRX
- 10 400. Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C RMN estão dados em ppm em relação ao tetrametilsilano. (Os desvios químicos de ^{13}C RMN foram determinados usando metanol ("MeOH") como padrão externo.) Os espectros de ^{13}C RMN foram obtidos com próton desacoplado $\{^1\text{H}\}$. Experiências de 2D RMN (HMQC (espectroscopia de Correlação de Múltiplos Quanta Heteronucleares, uma experiência de correlação inversa de desvios químicos para determinar quais ^1H 's da molécula estão ligados a quais núcleos ^{13}C (ou outros núcleos X)); e HBMC (espectroscopia de Correlação de Múltiplas Ligações Heteronucleares, uma versão modificada de HMQC adequada para determinar conectividade ^1H - ^{13}C de longo alcance, assim como a estrutura e designações ^1H e ^{13}C da molécula)) foram realizadas para ajudar as designações dos sinais de ^1H e ^{13}C RMN para a estrutura. "Sal dissódico de CA4P" é o composto tendo a seguinte estrutura:



(veja Patente US N° 5.561.122 mencionada acima).

Sal de mono-trometamina de CA4P

- 25 Solução aquosa de IPA TRIS (0,19 M). Uma solução de TRIS 0,19 M foi preparada dissolvendo-se 1,61 g de TRIS (13,3 mmoles) em 7 ml de água desionizada, e adicionando-se 63 ml de álcool isopropílico ("IPA") à

solução aquosa resultante (10% água em IPA).

Solução de estoque de ácido livre de CA4P em álcool isopropílico (0,19 M). Sal dissódico de CA4P (12,15 g, 27,6 mmoles) foi dissolvido em 70 ml de água desionizada. Etil acetato (250 ml) e uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (150 ml) foram adicionados à solução resultante com rápida agitação. Formou-se uma torta branca. Uma solução de ácido clorídrico 0,5 N (325 ml) foi adicionada em porções para dissolver a torta (o pH final da fase aquosa foi de cerca de 1 (papel de pH)). A fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com etil acetato (3 x 200 ml). As fases orgânicas foram combinadas e secadas em Na₂SO₄ anidro. Filtração e evaporação do solvente (rotovaporizador, temperatura do banho de água = 40°C) deram uma película espessa de ácido livre de CA4P que foi dissolvida em 100 ml de IPA. A concentração da solução resultante foi determinada como sendo 0,19 M por ¹H RMN, usando o seguinte método de titulação: 45 µl de solução de L-histidina (0,17 M) e 30 µl de solução de ácido livre de CA4P foram pipetados em um frasco de HPLC de 4 ml. Os solventes foram evaporados até a secura usando o rotovaporizador. O sólido foi dissolvido em 0,7 ml de D₂O e analisado por ¹H RMN para dar uma razão de 1:0,75 de histidina para o ácido livre de CA4P. Foi obtido um total de 10 mmoles de ácido livre de CA4P (69% de rendimento).

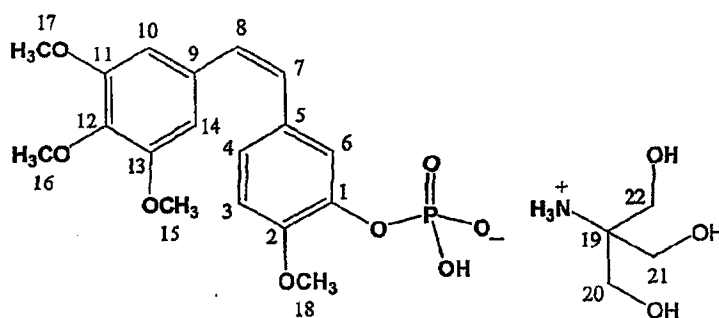
Sal de mono-TRIS de CA4P. Um balão de fundo redondo de 200 ml foi carregado com 70 ml da solução de ácido livre de CA4P preparada acima (0,19 M, 13,3 mmoles). 70 ml da solução aquosa de IPA TRIS preparada acima (0,19 M, 13,3 mmoles) foram adicionados em porções à solução de ácido livre de CA4P com rápida agitação. A pasta fluida branca resultante foi agitada à temperatura ambiente por 18 horas (por uma noite), seguida por resfriamento para 0°C (banho gelado) por 30 min. O sólido cristalino foi isolado por filtração em um papel-filtro Whatman N° 54 com sucção, lavado com álcool isopropílico frio, e secado em uma corrente de ar por 5 horas e em seguida a vácuo (dessecador a vácuo) por 113 horas para dar 7,01 g de sal de mono-TRIS de CA4P como um sólido branco. Os resultados da análise por ¹H RMN mostraram que o produto final continha IPA (cerca

de 0,9% em peso) como solvente residual (13,4 mmoles, rendimento quantitativo). O sal de mono-TRIS de CA4P tem a estrutura de fórmula Ia, onde o grupo olefina que liga em ponte as porções fenila do núcleo está na configuração cis como no material de partida fosfato de combretastatina A-4.

5 Caracterização do sal de mono TRIS de CA4P

Análise por RMN e elemental

^1H RMN (400 MHzm D_2O) δ 3,52 (s, 6H, C(15) H_3 e C(17) H_3), 3,56 (s, 6H, C(20) H_2 , C(21) H_2 , C(22) H_2)m 3,59 (s, 3H, C(16) H_3), 3,67 (s, 3H, C(18) H_3), 6,38 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, C(8)), 6,46 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, C(7)H), 10 6,48 (s, 2H, C(10)H e C(14)H), 6,79 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, C(3)H), 6,85 (amplo d, $J = 8,8$ Hz, 1H, C(4)H), 7,06 (amplo s, 1H, C(6)H); ^{13}C RMN (100 MHz, $\{^1\text{H}\}$ D_2O) δ 56,9 (2C, C15, C17), 57,0 (C18), 60,3 (3 C, C20, C21, C22), 62,0 (C16), 62,4 (C19), 107,5 (2C, C10, C14), 113,9 (C3), 122,6 (d, $J_{\text{pc}} = 3,1$ Hz, C6), 125,9 (C4), 130,0 (C8), 130,8 (C8), 130,8 (C7), 131,2 (C5), 134,7 15 (C9), 136,8 (C12), 142,2 (d, $J_{\text{PC}} = 7,7$ Hz, C1), 150,6 (d, $J_{\text{PC}} = 6,1$ Hz, C2), 153,2 (2C, C11 e C13). Análise calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_{11}\text{P}$: C, 51,06; H, 6,23; N, 2,70; P, 5,98. Encontrada: C, 51,07; H, 6,39; N, 2,58; P, 5,93.



Higroscopicidade

Verificou-se que o sal de mono TRIS de CA4P deste exemplo 20 era praticamente não higroscópico a 25°C em condições de umidade ambiente e alta umidade. Este foi um resultado inesperado, porque outras formas salinas do ácido livre de CA4P são higroscópicas em condições semelhantes. O perfil de absorção de umidade do sal de mono TRIS de CA4P está mostrado na figura 1. Experiências de umidade relativa variável-difração de

raios X ("RH-XRD") mostraram que o padrão do pó fica inalterado mediante exposição a umidades diferentes a 25°C.

Polimorfismo

Estudos de raios X de cristal simples feitos com o sal de mono TRIS de CA4P deste exemplo demonstram que ele é uma forma pura aquiral (N-1) que não contém nenhum local de solvente e que tem uma estrutura de cristal monoclinico centrossimétrica. O padrão simulado do pó, que foi derivado dos parâmetros atômicos refinados na estrutura de cristal simples monoclinica à temperatura ambiente, é consistente com o padrão observado do pó. Vários lotes do sal de mono TRIS preparados a partir de IPA/água mostraram ser reproduzíveis com base em ¹H RMN, calorimetria de varredura diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e difração de raios X de pó (p-XRD). O sal de mono TRIS de CA4P foi empastado em vários solventes diferentes tais como etanol, isopropanol, acetona, acetonitrila e água, inicialmente a 70 - 75°C por 5 - 10 min, e em seguida à temperatura ambiente por uma noite. As fases sólidas resultantes foram analisadas por DSC, TGA e p-XRD. Nenhuma das amostras empastadas mostraram a presença de qualquer solvato seja no estado de pasta ou no estado seco. Não houve diferenças nos termogramas de DSC e nos padrões de p-XRD (veja figura 2) em nenhuma dessas amostras quando comparadas com o material "como tal". Isto indica que esta forma N-1 é uma forma polimorfa simples, relativamente estável.

Outras propriedades físico-químicas

O termograma de DSC do sal de mono TRIS de CA4P mostra uma única endoterma de fusão a 196°C (figura 3). A análise termogravimétrica não revelou perda de perda abaixo de 150°C devida à volatilização. A solubilidade de equilíbrio em água do sal de mono TRIS de CA4P a 25°C foi determinada como sendo igual a 3,37 mg/ml (pH 4,8). A solubilidade em água aumenta com um aumento no pH e atinge um valor de 191 mg/ml a um pH igual a 8,2. Isto é especificamente adequado para preparar uma forma de apresentação do composto deste exemplo na faixa de pH igual a 8 - 9

(incluindo, porém sem limitação, soluções para serem diretamente administradas a um paciente ("soluções prontas para uso") ou soluções de dosificação para liofilização) para administração intravenosa. O perfil de pH - solubilidade do sal de mono TRIS de CA4P está mostrado na figura 4. O sal de mono TRIS de CA4P também apresentou boa estabilidade química no estado sólido mediante exposição a condições ambientes ou aceleradas de temperatura e umidade.

O sal de mono TRIS de CA4P deste exemplo tem portanto propriedades físico-químicas excelentes para uso em uma formulação farmacêutica, por exemplo, destinada à administração oral ou parenteral. Ao contrário de outras formas salinas não contempladas nesta invenção, o sal de mono TRIS apresentou propriedades inesperadamente superiores no estado sólido, particularmente o comportamento praticamente não higroscópico. Isto foi especialmente surpreendente em vista do grau de solubilidade em água do TRIS per se.

Sal de mono-trometamina de CA4P (scale-up)

Solução de ácido livre de CA4P em IPA. Um balão de fundo redondo, três gargalos, 12 l, foi equipado com um agitador mecânico e um funil conta-gotas. Uma solução de sal dissódico de CA4P (9,92 g, 0,227 mol) em 1,5 l de água desionizada e etil acetato (2,0 l) foi adicionada ao balão. Uma solução de ácido clorídrico (0,5 N, 950 ml, 0,475 mol) foi adicionada lentamente pelo funil conta-gotas com rápida agitação (o pH final da fase aquosa foi de cerca de 1 (papel de pH)). A fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com etil acetato (5 x 1,6 l). As fases orgânicas combinadas foram secadas em Na_2SO_4 . O etil acetato foi evaporado por rotação para formar um óleo espesso que foi dissolvido em IPA (800 ml).

Sal de mono-TRIS de CA4P. Uma solução de TRIS (25,0 g, 0,206 mol) em 800 ml de água desionizada foi carregada em um balão de fundo redondo, três gargalos, 12 l. A solução de ácido livre de CA4P em IPA preparada acima foi lentamente adicionada por meio de um funil conta-gotas com rápida agitação. Depois da adição, a solução resultante foi semeada com sal de mono-TRIS de CA4P e mecanicamente agitada à temperatura

ambiente por 1 h. Em seguida, mais IPA (2,0 l) foi lentamente adicionado à pasta fluida e a agitação continuou por mais 1 h. O sólido branco cristalino foi isolado por filtração com sucção, lavado com IPA (800 ml) e secado em um forno a vácuo a cerca de 40°C por 4 dias para dar 101,55 g de sal de mono-TRIS de CA4P. Os resultados da análise por ^1H RMN do produto final mostraram que ele continha IPA (0,4% em peso) como solvente residual (0,196 mol, 86% de rendimento total).

Análise calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_{11}\text{P}$: C, 51,06; H, 6,23; N, 2,70; P, 5,98. Encontrada: C, 50,95; H, 6,14; N, 2,69; P, 5,82.

10 EXEMPLO 2

Sal de mono-trometamina da pró-droga CA4P

Formulação de TRIS

Composições farmacêuticas em solução aquosa e liofilizadas (isto é, secados por congelamento) (sal de mono TRIS de CA4P) foram preparadas da seguinte maneira.

Uma solução aquosa do composto do exemplo 1 foi obtida dissolvendo-se o composto em água para injeção, USP até uma concentração de 60 mg/ml com a adição de uma quantidade suficiente de TRIS (base trometamina) para obter um pH de 8,5. A dissolução foi feita ao abrigo da luz.

Um líofilo foi então obtido pelo seguinte procedimento. A solução formada acima foi filtrada em um filtro esterilizante adequado de 0,2 microns e dividido em alíquotas em frascos estéreis de vidro. A solução foi liofilizada em um liofilizador Virtis a -35°C a vácuo por um período de 24 a 72 horas e em seguida secado a 5°C em alto vácuo por 24 a 48 horas para dar um líofilo.

Outras composições farmacêuticas contendo o composto do exemplo 1 podem ser preparadas de acordo com estes procedimentos. Por exemplo, como descrito acima, agentes de encoimento (por exemplo aminoácidos tais como arginina ou lisina, açúcares tais como sacarose, lactose, manitol, polímeros tais como polivinilpirrolidona ou dextrana etc.) ou outros excipientes podem ser adicionados à solução acima.

Por exemplo, uma solução aquosa do composto do exemplo 1

foi obtida dissolvendo-se o composto em água para injeção, USP até uma concentração de 30 mg/ml com a adição de um agente de encorpamento adequado tal como manitol, dextrana ou combinações dos mesmos até uma concentração de 100 mg/ml e uma quantidade suficiente de TRIS (base tro-
5 metamina) para obter um pH de 8,6. A dissolução foi feita ao abrigo da luz.

Um líofilo foi então obtido pelo seguinte procedimento. A solução formada acima foi filtrada em um filtro esterilizante adequado de 0,2 microns e dividido em alíquotas em frascos estéreis de vidro. A solução foi liofilizada em um liofilizador Virtis a -10°C em um vácuo moderado por um
10 período de 24 a 72 horas e em seguida secado a 5°C em alto vácuo por 24 a 48 horas para dar um líofilo.

Como explicado acima, qualquer amina orgânica que inclui, porém sem limitação, dietanolamina, glicamina, N-metilglicamina, etilenodiamina e 2-(4-imidazolil) etil amina, pode substituir a trometamina nos exem-
15 plos descritos acima para produzir um composto ou composição da presente invenção. As composições onde Q tem outras definições na fórmula I podem ser formadas de maneira similar.

EXEMPLO 3

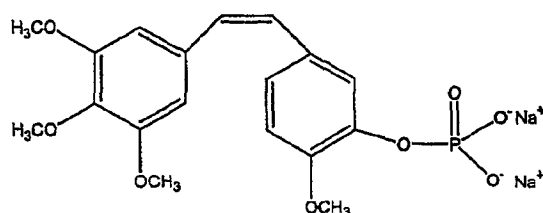
Pró-droga sal de mono-L-histidina de CA4P

20 Em uma modalidade da presente invenção, foi descrito um sal de mono-L-histidina de CA4P como um exemplo não limitativo de um composto da presente invenção. Com as informações dadas neste relatório, um versado na técnica pode facilmente produzir uma variedade de pró-drogas com o sal de mono- ou diaminoácido de CA4P, tal como por adição do ami-
25 noácido desejado ao ácido livre de CA4P por um procedimento análogo àquele descrito a seguir, todos estando abrangidos pela presente invenção e pelas reivindicações anexas.

Reagentes e métodos

30 Os reagentes e químicos a seguir foram obtidos em fontes comerciais e usados sem ulterior purificação: L-histidina (Aldrich Chemical Co. marcada 98%, lote N° 04821JR), metanol e álcool isopropílico (B&J Brand, solvente com alto grau de pureza). "Sal dissódico de CA4P" é o composto

tendo a seguinte estrutura:



(veja Patente US N° 5.561.122 mencionada acima).

Os espectros de RMN de múltiplos núcleos foram lidos em espectrômetros Bruker DPX 300 e DRX 400. Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C RMN estão dados em ppm em relação ao tetrametilsilano (os desvios químicos de ^{13}C RMN foram determinados usando metanol como padrão externo). Os desvios químicos de ^{31}P RMN estão dados em ppm em relação a H_3PO_4 85% (padrão externo). Os espectros de ^{13}C e ^{31}P RMN foram obtidos com próton desacoplado $\{^1\text{H}\}$. Experiências de 2D RMN (HMQC e HBMC) foram realizadas para ajudar as designações dos sinais de ^1H e ^{13}C RMN para a estrutura. DSC foi feita em um calorímetro de varredura diferencial DSC/2920, TA Instruments.

Sal hidratado de mono-L-histidina de CA4P

Solução de estoque aquosa de L-histidina (0,2 M). L-histidina (0,3167 g, 2,0 mmoles) foi dissolvida em 10 ml de água desionizada para formar uma solução 0,2 M.

Solução de estoque de ácido livre de CA4P em metanol (0,6 M). Sal dissódico de CA4P (1,9194 g) foi dissolvido em 5,0 ml de água desionizada. Uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (40 ml) foi adicionada à solução resultante. Um sólido branco precipitou-se. Etil acetato (50 ml) foi adicionado e a pasta fluida resultante foi magneticamente agitada e acidificada com uma solução de ácido clorídrico 0,5 N até que a mistura bifásica fica límpida (a fase aquosa era ácida (papel de pH)). A fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com etil acetato (2 x 50 ml). As fases orgânicas foram combinadas e secadas em Na_2SO_4 . Filtração e evaporação do solvente (rotovaporizador, temperatura do banho de água = 37°C) deram uma película espessa de ácido livre de CA4P que foi recuperada com

10 ml de metanol. O metanol foi evaporado por rotação (37°C) para dar uma espuma esbranquiçada (1,52 g), que foi redissolvida em MeOH (4,79 ml) para dar uma solução com a concentração esperada de 0,8 M.

A concentração determinada acima foi ainda confirmada misturando-se 100 µl de uma solução 0,2 M de histidina (20 µmol) com 25 µl de solução de ácido livre de CA4P. Os solventes da solução resultante foram evaporados por rotação até a secura. O sólido foi analisado por ¹H RMN e mostraram uma razão molar de 1:0,75 de histidina : ácido livre de CA4P. Portanto, a concentração de ácido livre de CA4P calculado como sendo igual a 0,6 M. (Este resultado indicava que a espuma de ácido livre de CA4P continha solvente.)

Sal hidratado de mono-L-histidina de CA4P. L-histidina (900 µl, 0,2 M, 180 µmol), ácido livre de CA4P (300 µl, 0,6 M, 180 µl) e álcool isopropílico (1,0 ml) foram adicionados a um frasco de HPLC de 4 ml. A solução resultante foi evaporada por rotação (temperatura do banho de água = 39 - 40°C) para reduzir o volume para cerca de 1,5 ml. Mais 1,0 ml de álcool isopropílico foi adicionado e o volume foi novamente reduzido para cerca de 1,5 ml. Um pequeno cristal foi observado na solução. O processo de evaporação foi interrompido e o frasco foi tampado e deixado repousar à temperatura ambiente por 5 h. O sólido cristalino foi isolado por filtração em um papel-filtro Whatman N° 54 com sucção, lavado com álcool isopropílico (ca 2 ml) e secado em uma corrente de nitrogênio por uma noite para dar 82,7 mg de mono-L-histidina de CA4P como um sólido branco. A pró-droga sal de mono-L-histidina de CA4P obtida era um sólido cristalino; análise de Karl Fisher do sólido mostrou que o teor de água era de 4,66%, que foi calculado para um sólido cristalino hidratado com 1,5 moléculas de água por molécula de sal (143 µmol, 79% de rendimento):

¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 3,33 (d, J = 6,59 Hz, 2H, C(21)H₂), 3,67 (s, 6H, C(15)H₃ e C(17)H₃), 3,74 (s, 3H, C(16)H₃), 3,82 (s, 3H, C(18)H₃), 4,01 (t, J = 6,50 Hz, 1H, C(20)H), 6,53 (d, J = 12,25 Hz, 1H, C(8)H), 6,62 (d, J = 12,25 Hz, 1H, C(7)H), 6,62(s, 2H, C(10)H e C(14)H),

6,94 (d, $J = 8,00$ Hz, 1H, C(3)H), 7,01 (d, $J = 8,00$ Hz, 1H, C(4), 7,21 (s, 1H, C(6)H), 7,37 (s, 1H, C(23)H), 8,63 (s, 1H, C(24)H); ^{13}C RMN (100 MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 26,12 (C21), 53,93 (C20), 56,26 (2C, C15, C17), 56,35 (C18), 61,32 (C16), 106,86 (2C, C10, C14), 113,26 (c3), 118,03 (C23), 122,04 (d, $J_{\text{PC}} =$
 5 2,3 Hz, C6), 125,52 (C4), 127,80 (C22), 129,40 (C8), 130,05 (C7), 130,57 (C5), 133,99 (C9), 134,34 (C24), 136,18 (C12), 141,37 (d, $J_{\text{PC}} = 6,90$ Hz, C1), 150,01 (d, $J_{\text{PC}} = 4,60$ Hz, C2), 152,52 (2C, C11 e C13), 172,87 (C19); ^{31}P RMN (121 MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ - 2,61 (s). Análise calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$: C, 49,83; H, 5,75; N, 7,26. Encontrada: C, 50,13; H, 5,78;
 10 N, 7,26.

A análise de Karl Fisher e a análise elemental do produto deste procedimento mostraram que o sal cristalino é sesquihidratado. A análise por DSC indicou uma forma cristalina principal com uma endoterma de fusão a $158,6^\circ\text{C}$ (veja figura 5). Os dados de raios X de pó obtidos para este
 15 material estão apresentados na figura 8, padrão superior.

Foram observadas diferenças de polimorfismo, à temperatura ambiente, em função de mmoles de ácido livre de CA4P em relação ao volume total da mistura de cristalização. No procedimento acima, foi empregado 0,2 mmol de ácido livre de CA4P por ml do volume total da mistura de
 20 cristalização. Modificação do procedimento acima de modo a ser empregado 0,03 mmol de ácido livre de CA4P por ml do volume total da mistura de cristalização produziu um sal de mono-L-histidina de CA4P tendo 1,8 molécula de água por molécula de sal (veja figura 6, tamanho da amostra 3,8500 mg; a análise por DSC mostrou uma forma cristalina com uma endoterma de
 25 fusão a $184,9^\circ\text{C}$. Análise de ^1H RMN mostrou uma razão de CA4P : histidina = 1:1). Os dados de raios X de pó obtidos para este material estão apresentados na figura 8, padrão inferior. Uma outra modificação do procedimento acima de modo a ser empregado 0,07 mmol de ácido livre de CA4P por ml do volume total da mistura de cristalização produziu uma mistura de
 30 formas de sal de mono-L-histidina de CA4P, uma tendo 1,5 molécula de água por molécula de sal, e a outra tendo 1,8 molécula de água por molécula de sal (veja figura 7, tamanho da amostra 4,4500 mg; a análise de Karl

Fisher e a análise elemental desta mistura mostraram que o sal cristalino é sesquihidratado. A análise por DSC indicou duas formas cristalinas. As endotermas são semelhantes às aquelas das figuras 5 e 6, respectivamente. Os dados de raios X de pó obtidos para este material estão apresentados na
5 figura 9. Os dados de DSC e raios X de pó indicaram que as formas 1,5:1 e 1,8:1 (água:sal) acima são duas formas cristalinas diferentes. Como também apontado acima, a mistura destas duas formas é facilmente formada. Cada forma pode ser transformada para um estado puro por sementeira.

A forma hemiheptahidratada do sal de mono-L-histidina de
10 CA4P também pode ser obtida na presença de água. Esta forma, no entanto, se converte na forma sesquihidratada do sal de mono-L-histidina de CA4P.

Como explicado acima, uma variedade de aminoácidos naturais e não naturais que incluem, por exemplo, ornitina, lisina, arginina e triptofano, pode facilmente substituir a histidina na descrição acima para produzir
15 um composto da presente invenção.

Sal hidratado de mono-L-histidina de CA4P ("scale-up)

Solução de estoque aquosa de L-histidina (0,2 M). L-histidina (1,90 g, 12,0 mmoles) foi dissolvida em 60 ml de água desionizada para
20 formar uma solução 0,2 M. (Esta solução também pode ser preparada in situ).

Solução de estoque de ácido livre de CA4P em álcool isopropílico (IPA) (0,17 M). O ácido livre de CA4P pode ser preparado da seguinte maneira. O equivalente de ácido pode ser reduzido para 2,1; não é necessária a adição de cloreto de sódio. O procedimento a seguir é exemplificativo: sal dissódico de CA4P (8,94 g, 20,3 mmoles) foi dissolvido em 50 ml de água desionizada. Etil acetato (200 ml) e uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (100 ml) foram adicionados à solução resultante com rápida agitação. Formou-se uma torta branca. Uma solução de ácido clorídrico 0,5
25 N (220 ml) foi adicionada em porções para dissolver a torta (o pH final da fase aquosa foi de cerca de 1 (papel de pH)). A fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com etil acetato (1 x 200 ml e em seguida 2 x 150

ml). As fases orgânicas foram combinadas e secadas em Na_2SO_4 . Filtração e evaporação do solvente (rotovaporizador, temperatura do banho de água = 40°C) deram um filme espesso de ácido livre de CA4P que foi dissolvido em 100 ml de IPA. A concentração da solução resultante foi determinada
5 como sendo igual a 0,17 M por ^1H RMN.

Para confirmar a concentração determinada acima, 60 μl de solução de histidina (0,2 M) e 70 μl de solução de ácido livre de CA4P foram pipetados em um frasco de HPLC de 4 ml. Os solventes foram evaporados por rotação até a secura. O sólido foi dissolvido em 0,7 ml de D_2O e anali-
10 sado por ^1H RMN para dar uma razão de 1:1 de histidina para o ácido livre de CA4P. Foi obtido um total de 17 mmoles de ácido livre de CA4P (84% de rendimento).

Sal hidratado de mono-L-histidina de CA4P (scale-up). Um balão de fundo redondo de 250 ml foi carregado com 70,6 ml da solução de
15 ácido livre de CA4P (0,17 M, 12,0 mmoles) e 50 ml de IPA. Uma solução de L-histidina (60 ml, 0,2 M, 12,0 mmoles) foi adicionada em porções à solução de ácido livre de CA4P com rápida agitação. A pasta fluida branca resultante foi agitada a 40°C por 30 min, à temperatura ambiente por 3 horas, seguida por resfriamento para 0°C (banho gelado) por 1 h. O sólido cristali-
20 no foi isolado por filtração em um papel-filtro Whatman N° 54 com sucção, lavado com álcool isopropílico frio, e secado a vácuo (dessecador a vácuo) por 88 horas para dar 6,07 g de mono-L-histidina de CA4P como um sólido branco. Análise de Karl Fisher do sólido mostrou que o teor de água era de 4,48%, que foi calculado para um sólido cristalino hidratado com 1,5 molé-
25 cula de água por molécula de sal (10,5 mmoles, 87% de rendimento).

^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 3,32 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H, C(21) H_2), 3,68 (s, 6H, C(15) H_3 e C(17) H_3), 3,74 (s, 3H, C(16) H_3), 3,82 (s, 3H, C(18) H_3), 4,00 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, C(20)H), 6,53 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H, C(8)H), 6,62 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H, C(7)H), 6,64 (s, 2H, C(10)H e C(14)H), 6,95 (d, $J =$
30 8,3 Hz, 1H, C(3)H), 7,02 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, C(4)H), 7,20 (amplo s, 1H, C(6)H), 7,36 (amplo s, 1H, C(23)H), 8,62 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, C(24)H); ^{13}C

RMN (100 MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 26,11 (C21), 53,92 (C20), 56,22 (2C, C15, C17), 56,32 (C18), 61,28 (C16), 106,82 (2C, C10, C14), 113,20 (C3), 118,03 (C23), 122,01 (d, $J_{\text{PC}} = 2,3$ Hz, C6), 125,48 (C4), 127,78 (C22), 129,38 (C8), 129,97 (C7), 130,54 (C5), 133,92 (C9), 134,31 (C24), 136,16 (C12), 141,38
 5 (d, $J_{\text{PC}} = 6,1$ Hz, C1), 149,98 (d, $J_{\text{PC}} = 5,4$ Hz, C2), 152,48 (2C, C11 e C13), 172,86 (C19). Análise calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$: C, 49,82; H, 5,75; N, 7,26; P, 5,35. Encontrada: C, 49,92; H, 5,84; N, 7,26; P, 5,44.

Além disso, usando calorimetria de varredura diferencial, determinou-se que o composto obtido tinha uma endoterma principal a 158°C , e
 10 uma endoterma secundária a 174°C .

Qualquer aminoácido natural ou não natural adequado pode facilmente substituir o aminoácido neste procedimento para produzir outros compostos da presente invenção.

Quando o sal de mono-L-histidina de CA4P é cristalizado à temperatura ambiente, geralmente são obtidos hidratos. O processo de cristalização quando realizado a temperaturas elevadas acima da temperatura ambiente, especialmente acima de 70°C , permite a obtenção de sal anidro. Hidratos do sal de histidina podem ser convertidos na forma cristalina anidra (especialmente, fundindo a 210°C), por exemplo, por empastamento de uma
 15 forma hidrato em um solvente tal como etanol, metanol, isopropanol ou acetona, a uma temperatura tal como 40°C (tal como por 2 dias), seguida por filtração, lavagem e secagem a vácuo a uma temperatura tal como 45°C (tal como por uma noite). A forma anidra, que é praticamente não higroscópica, é preferida.

25 Sal anidro de mono-L-histidina de CA4P

Um balão de fundo redondo de 200 ml foi carregado com L-histidina (0,2620 g, 1,65 mmol) e 16,5 ml de água desionizada. A solução resultante foi aquecida a $74 - 76^\circ\text{C}$ (temperatura do banho de óleo) com agitação magnética. Adicionou-se uma solução de ácido livre de CA4P (8,7
 30 ml, 0,19 M em IPA, 1,65 mmol), seguida por álcool isopropílico (90 ml). A solução resultante ficou leitosa em cerca de 1 min. A agitação continuou a

75 - 76°C por 2 h e em seguida à temperatura ambiente por 1 h. O sólido cristalino em forma de agulha foi isolado por filtração em um papel-filtro Whatman N° 4 com sucção e secado em uma corrente de ar (sucção) por uma noite (19,5 h) e em um dessecador a vácuo por 24 h para dar 0,7788 g de mono-L-histidina de CA4P como um sólido branco (1,41 mmol, 86% de rendimento): p.f. 211,49°C (DSC);

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 33,30 (d, J = 6,5 Hz, 2H, H-21), 3,65 (s, 6H, H-15 e H-17), 3,72 (s, 3H, H-16), 3,80 (s, 3H, H-18), 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H-20), 6,50 (d, J = 12,3 Hz, 1H, H-8), 6,59 (d, J = 12,3 Hz, 1H, H-7), 6,60 (s, 2H, H-10 e H-14), 6,92 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-3), 6,97 (amplo d, J = 8,5 Hz, 1H, H-4), 7,19 (amplo s, 1H, H-6), 7,33 (amplo s, 1H, H-23), 8,58 (amplo s, 1H, H-24); ¹³C RMN (100 MHz, {¹H}, D₂O) δ 27,11 (C-21), 54,88 (C-20), 57,17 (2C, C-15, e C-17), 57,24 (C-18), 62,24 (C-16), 107,77 (2C, C-10 e C-14), 114,17 (C-3), 118,90 (C-23), 122,93 (d, J_{PC} 2,3 Hz, C-6), 126,40 (C-4), 128,88 (C-22), 130,29 (C-8), 131,00 (C-7), 131,47 (C-5), 134,93 (C-9), 135,32 (C-24), 137,08 (C-12), 142,31 (d, J_{PC} = 6,1 Hz, C-1), 150,91 (d, J_{PC} = 4,6 Hz, C-2), 153,45 (2C, C-11 e C-13), 173,84 (C-19). Análise calculada para C₂₄H₃₀N₃O₁₀P: C, 52,27; H, 5,48; N, 7,62; P, 5,61. Encontrada: C, 52,03; H, 5,43; N, 7,57; P, 5,57.

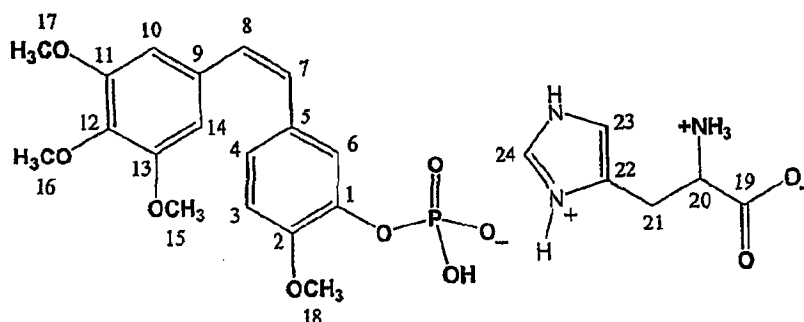
Sal anidro de mono-L-histidina de CA4P (scale-up)

Um balão de fundo redondo, três gargalos, 2000 ml, foi equipado com um agitador mecânico, um funil conta-gotas de 500 ml e um termoelemento que foi conectado a um Therm-O-Watch L7-1100SA/28T que controlava uma manta de aquecimento. L-histidina (3,42 g, 21,6 mmoles) foi adicionada ao balão, seguida por 216 ml de água desionizada. A solução resultante foi aquecida a 74 - 80°C com agitação. Ácido livre de CA4P (120 ml, 0,18 M em IPA, 21,6 mmoles) foi acrescentado, seguido por IPA (1176 ml), por meio do funil conta-gotas em uma taxa que mantivesse a temperatura da solução a 73 - 74°C (necessários 14 min). Depois da adição de IPA, a solução límpida resultante foi semeada com sal anidro de mono-L-histidina de CA4P (quantidade de traço). A temperatura da solução foi aumentada para 80°C, e a cristalização ocorreu em cerca de 3 min depois da semeadura. A temperatura caiu lentamente para 74°C em 30 min e foi mantida a 73 -

74°C por mais 1,5 h. A mistura reacional foi deixada esfriar lentamente para 31°C em 3,5 h. O sólido cristalino em forma de agulhas foi filtrado em um papel-filtro Whatman N° 4 com sucção, lavado com IPA (100 ml) e secado em uma corrente de ar (sucção) por uma noite (16 h) e em um dessecador a vácuo por 21,5 h para dar 10,11 g de sal anidro de mono-L-histidina de CA4P como sólido branco (18,3 mmoles, 85% de rendimento): p.f. 213,65°C (DSC);

¹HNMR (400 MHz, D₂O) δ 3,30 (d, J = 6,5 Hz, 2H, H-21), 3,65 (s, 6H, H-15 e H-17), 3,72 (s, 3H, H-16), 3,80 (s, 3H, H-18), 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 1H, H-20), 6,49 (d, J = 12,0 Hz, 1H, H-8), 6,58 (d, J = 12,0 Hz, 1H, H-7), 6,59 (s, 2H, H-10 e H-14), 6,91 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-3), 6,97 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H, H-4), 7,19 (amplo, J = 1,7 Hz, 1H, H-6), 7,34 (amplo s, 1H, H-23), 8,60 (d, J = 1,4 Hz, 1H, H-24); ¹³C RMN (100 MHz, {¹H}, D₂O) δ 27,07 (C-21), 54,86 (C-20), 57,18 (2C, C-15 e C-17), 57,26 (C-18), 62,24 (C-16), 107,78 (2C, C-10 e C-14), 114,18 (C-3), 118,94 (C-23), 122,95 (d, J_{PC} = 2,3 Hz, C-6), 126,43 (C-4), 128,79 (C-22), 130,31 (C-8), 130,98 (C-7), 131,49 (C-5), 134,91 (C-9), 135,29 (C-24), 137,10 (C-12), 142,31 (d, J_{PC} = 6,9 Hz, C-1), 150,92 (d, J_{PC} = 4,6 Hz, C-2), 153,45 (2C, C-11 e C-13), 173,82 (C-19).
Análise Calculada para C₂₄H₃₀N₃O₁₀P: C, 52,27; H, 5,48; N, 7,62; P, 5,61. Encontrada: C, 52,23; H, 5,35; N, 7,60; P, 5,55.

O sal anidro de mono-L-histidina de CA4P pode ser facilmente reproduzido como uma forma cristalina simples. A figura 10 mostra a DSC (tamanho da amostra 2,3600 mg); a figura 11 mostra os dados de raios X de pó para este material.



EXEMPLO 4

Preparação do sal de éster metílico de monoglicina de cis-CA4P

O seguinte procedimento para a preparação de éster metílico de monoglicina de CA4P a partir de CA4P dissódico é vantajoso. O procedimento emprega cloridrato de éster metílico de glicina diretamente na presença de N,N-diisopropilamina, proporcionando estabilidade melhorada em
5 comparação à preparação que emprega a base livre de éster metílico de glicina. Além disso, a preparação de ácido livre de CA4P é significativamente melhorada - ácido sulfúrico concentrado é empregado (por exemplo, ao invés de ácido clorídrico diluído) na neutralização (como resultado do uso, por exemplo, de etil acetato para extração e em seguida a evaporação
10 é eliminada). A formação de ácido livre de trans-CA4P é evitada neste procedimento aperfeiçoado.

Reagentes e métodos

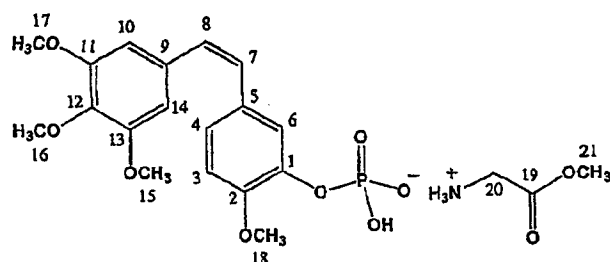
Os reagentes e químicos a seguir foram obtidos de fontes comerciais e usados sem ulterior purificação: álcool isopropílico (B&J Brand,
15 solvente com alto grau de pureza), ácido sulfúrico (EM Science, 95 - 98%, lote N° 35310), cloridrato de éster metílico de glicina (Aldrich Chemical Co., rotulado 99%, lote N° 03214 MU), N,N-diisopropilfetilamina (Aldrich Chemical Co., rotulado 99,5%, lote N° 02819 ER). Os espectros de RMN de múltiplos núcleos foram lidos em espectrômetros Bruker DRX 400. Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C RMN estão dados em ppm em relação ao tetrametilsilano
20 (os desvios químicos de ^{13}C RMN foram determinados usando MeOH como padrão externo). Experiências de 2D RMN [HMQC (espectroscopia de Correlação de Múltiplos Quanta Heteronucleares), uma experiência de correlação inversa de desvios químicos para determinar quais ^1H 's da molécula estão ligados a quais núcleos ^{13}C (ou outros núcleos X)]; e HMBC (espec-
25 troscopia de Correlação de Múltiplas Ligações Heteronucleares, uma versão modificada de HMQC adequada para determinar conectividade ^1H - ^{13}C de longo alcance, assim como a estrutura e designações ^1H e ^{13}C da molécula)] foram realizadas para ajudar as designações dos sinais de ^1H e ^{13}C RMN
30 para a estrutura. Calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi feita em um calorímetro de varredura diferencial DSC 2920, TA Instruments.

Sal do éster metílico de monoglicina de cis-CA4P

Um balão de fundo redondo de 100 ml foi carregado com sal dissódico de cis-CA4P (2,866 g, 6,51 mmoles) e IPA (30 ml). A pasta fluida resultante foi magneticamente agitada à temperatura ambiente. Uma solução de ácido sulfúrico (0,365 ml, 6,51 mmoles) em IPA (60 ml) foi adicionada à pasta fluida em porções. A mistura foi continuamente agitada por cerca de 10 min e filtrada com sucção usando papel-filtro Whatman N° 1. O sólido (Na_2SO_4 que é insolúvel em IPA) foi lavado com IPA (10 ml). O filtrado e o produto lavado, que continha ácido livre de CA4P, foram combinados em um outro balão de fundo redondo de 100 ml. Cloridrato de éster metílico de glicina (0,826 g, 6,51 mmoles) e N,N-diisopropiletilamina (1,254 ml, 7,16 mmoles) foram acrescentados à solução combinada. A mistura resultante foi aquecida em um banho de óleo com agitação magnética. A 60°C, a mistura se transformou em uma solução límpida. A 65°C, a solução se transformou em pasta fluida. A 78°C, a pasta fluida dissolveu para formar uma solução límpida. O aquecimento foi interrompido e a solução foi deixada esfriar lentamente no banho de óleo. A 60°C, a semente de sal de éster metílico de monoglicina de cis-CA4P foi adicionada à solução para formar uma pasta fluida. A agitação de 60°C até a temperatura ambiente por cerca de 1 h e em seguida à temperatura ambiente por uma noite. O sólido cristalino branco foi isolado por filtração com sucção usando um papel-filtro Whatman N° 1 e lavado com IPA (3 x 10 ml) e secado em uma corrente de ar por 6 h para dar 2,609 g de sal de éster metílico de monoglicina de cis-CA4P (5,38 mmoles, 82,6% de rendimento): análise por HPLC, 100% cis-CA4P; p.f. 136,40°C (DSC);

^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 3,52 (s, 6H, H-15 e H-17), 3,61 (s, 3H, H-16), 3,71 (s, 3H, H-18), 3,77 (s, 3H, H-21), 3,87 (s, 2H, H-20), 6,26 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H, H-8), 6,42 (s, 2H, H-10 e H-14), 6,43 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H, H-7), 6,70 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-3), 6,79 (amostra d, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-4), 7,16 (amostra s, 1H, H-6); ^{13}C RMN (100 MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 41,27 (C-20), 54,58 (C-21), 56,99 (2C, C-15, e C-17), 57,21 (C-18), 62,09 (C-16), 107,60

(2C, C-10 e C-14), 113,89 (C-3), 122,98 (C-6), 126,22 (C-4), 130,25 (C-8), 130,69 (C-7), 131,37 (C-5), 134,61 (C-9), 137,09 (C-12), 142,42 (d, $^2J_{PC} = 6,9$ Hz, C-1), 150,89 (d, $^3J_{PC} = 4,6$ Hz, C-2), 153,33 (2C, C-11 e C-13), 169,95 (C-19). Análise Calculada para $C_{21}H_{28}NO_{10}P$: C, 51,96; H, 5,81; N, 2,88; P, 6,38. Encontrada: C, 51,74; H, 5,79; N, 2,87; P, 6,30.



(Observação: Os sistemas de numeração mostrados acima, e sempre que estes sistemas de numeração forem mostrados neste relatório, são usados apenas a título de conveniência e podem não estar de acordo com a nomenclatura IUPAC).

10 A DSC do sal de éster metílico de monoglicina de cis-CA4P (tamanho da amostra: 3,7400 mg) está apresentada na figura 12; a figura 13 apresenta os dados de raios X de pó para este material (2 bateladas).

EXEMPLO 5

Preparação do sal de éster etílico de glicina do ácido livre de CA4P

15 Etil acetato (2 ml), solução de CA4P em isopropanol (150 μ l de uma solução 0,42 M, 63 micromoles) e solução de éster etílico de glicina em éter metil ter-butílico (800 μ l de uma solução 0,08 M, 64 micromoles) foram adicionados a um frasco de HPLC e agitados vigorosamente por ~3 minutos. A solução límpida resultante foi semeada com uma gota de pasta de uma
20 outra experiência e a mistura foi deixada repousar por uma noite à temperatura ambiente. Formou-se um sólido branco que não pareceu ser cristalino com base no exame microscópico e então a mistura foi deixada repousar à temperatura ambiente por mais três dias. Éter metil ter-butílico (1 ml) foi acrescentado e a mistura foi agitada por cerca de 10 minutos. Exame microscópico da mistura resultante indicou que o sólido tinha se convertido em
25 agulhas cristalinas. As agulhas foram isoladas por filtração a vácuo e seca-

das para dar o sal de éster etílico de glicina de CA4P (22,4 mg 66 M% de rendimento). Análise de RNM protônica indicou que a razão de éster etílico de glicina para CA4P era de 1,7:1. Dados de ^1H RMN para o éster etílico de glicina de CA4P:

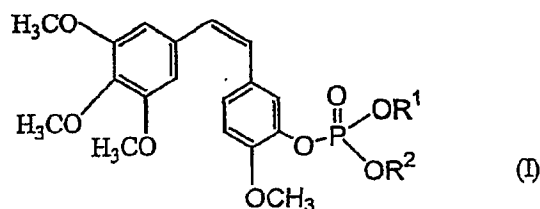
5 ^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 1,20 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3), 3,60 (s, 6H, H-15 e H-17), 3,66 (s, 3H, H-16), 3,74 (s, 3H, H-18), 3,79 (s, 2H, CH_2N), 4,21 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 6,44 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H, H-8), 6,55 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H, H-7), 6,57 (s, 2H, H-10 e H-14), 6,80 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H-3), 6,85 (amostra d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H-4), 7,23 (amostra s, 1H, H-6).

10 A presente invenção não tem seu escopo limitado pelas modalidades específicas aqui descritas. Na verdade, várias modificações da invenção, além daquelas aqui descritas, tornar-se-ão evidentes para os versados na técnica a partir da descrição precedente. Tais modificações encontram-se dentro do escopo das reivindicações anexas.

15 Várias publicações e documentos de patente foram citados neste relatório, e seus relatórios estão aqui incorporados em sua integridade a título de referência.

REIVINDICAÇÕES

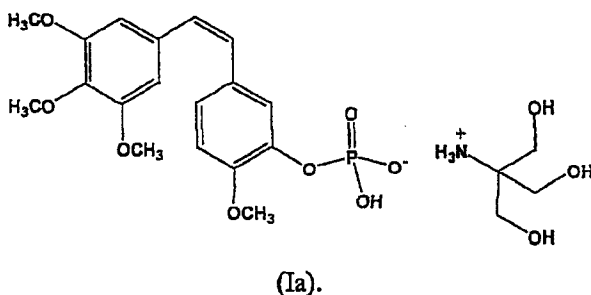
1. Composto, caracterizado pelo fato de apresentar a estrutura geral da fórmula I:



em que

5 um de $-OR^1$ ou $-OR^2$ é $-O^-QH^+$ e o outro é hidroxila ou $-O^-QH^+$; e Q é trometamina.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido composto apresenta a estrutura da fórmula Ia:



10 3. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^1 e R^2 são trometamina.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é CA4P di-trometamina.

5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

15 (a) um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4; e

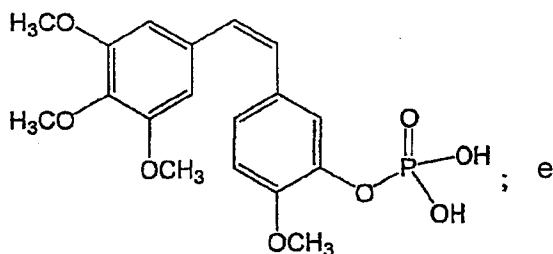
(b) um veículo farmacêuticamente aceitável do mesmo.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o pH é ajustado por um agente diferente de 20 hidróxido de sódio.

7. Composição, caracterizada pelo fato de ser formada pela mis-

tura de compostos compreendendo:

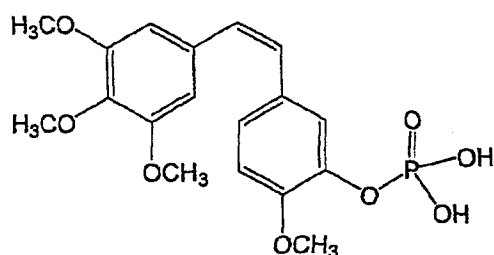
(a) um ácido livre de CA4P tendo a estrutura:



(b) um composto Q, onde Q é trometamina.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

9. Processo para preparar um composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de contactar, em um solvente, ácido livre de CA4P tendo a estrutura:



com um composto Q, onde Q é trometamina.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido composto como definido na reivindicação 1 é precipitado do referido solvente na forma cristalina.

11. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido ácido livre de CA4P é colocado em contato com trometamina em isopropanol aquoso como o referido solvente, seguido por colheita do sal de mono-trometamina de CA4P do referido solvente na forma cristalina.

Isoterma de adsorção / desadsorção

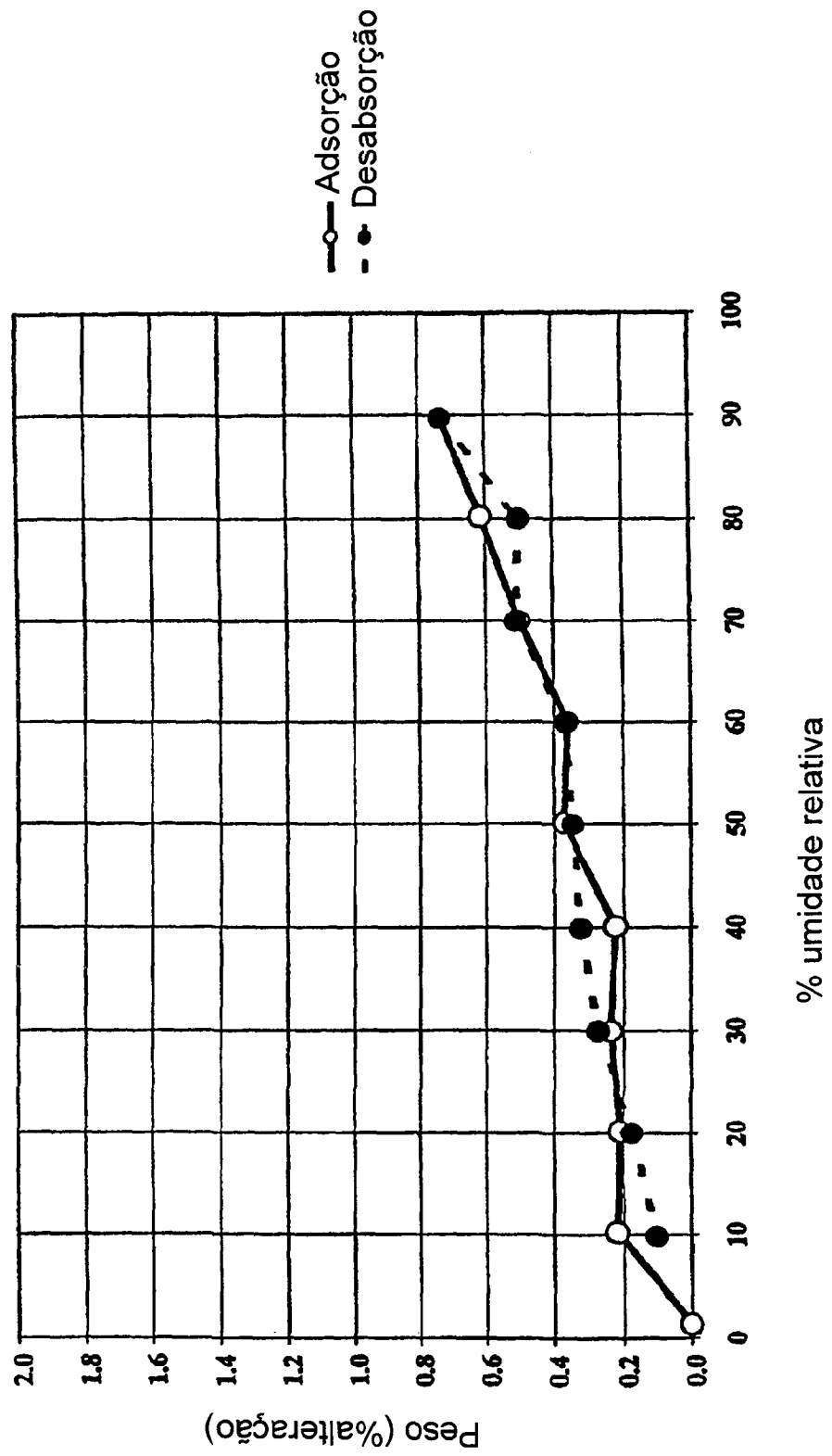


FIG. 1

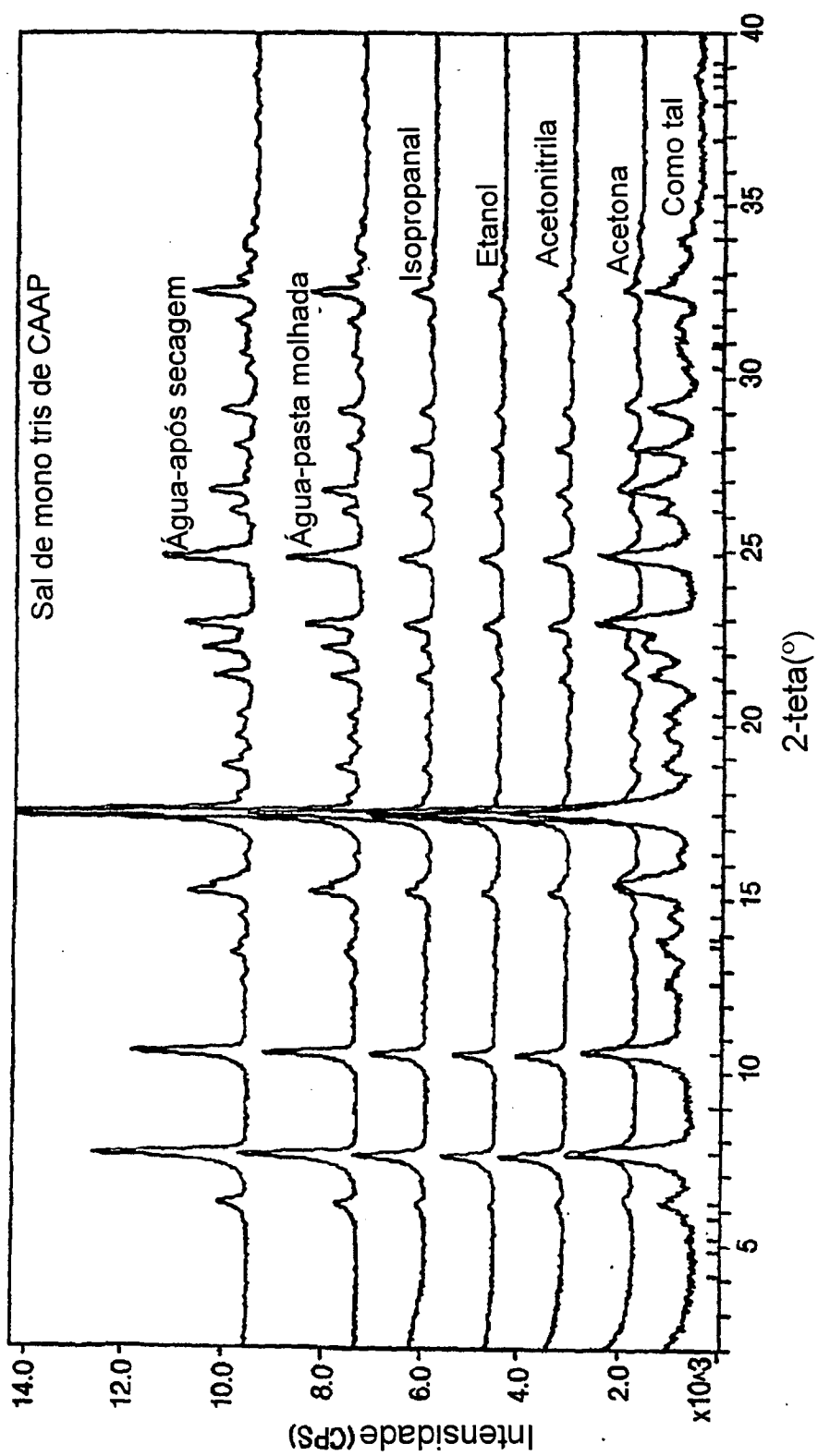


FIG. 2

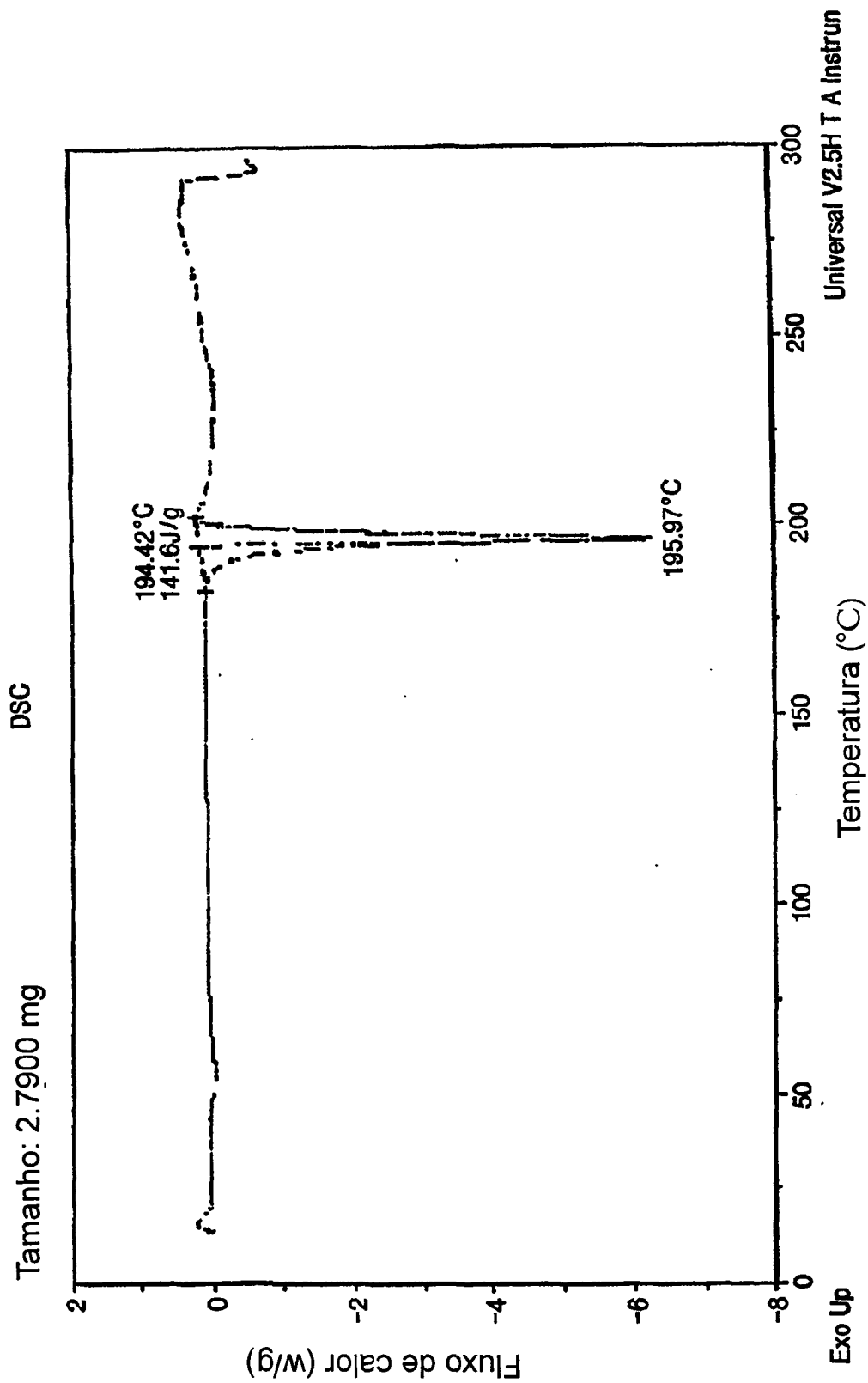


FIG. 3

Solubilidade em água de sal de mono
TRIS de CA4P a 25°C

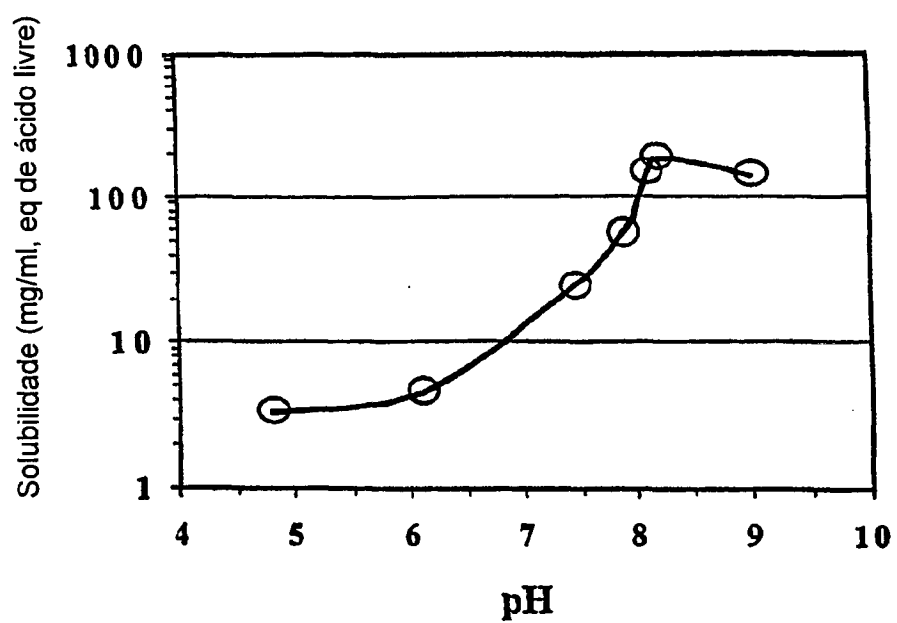


FIG. 4

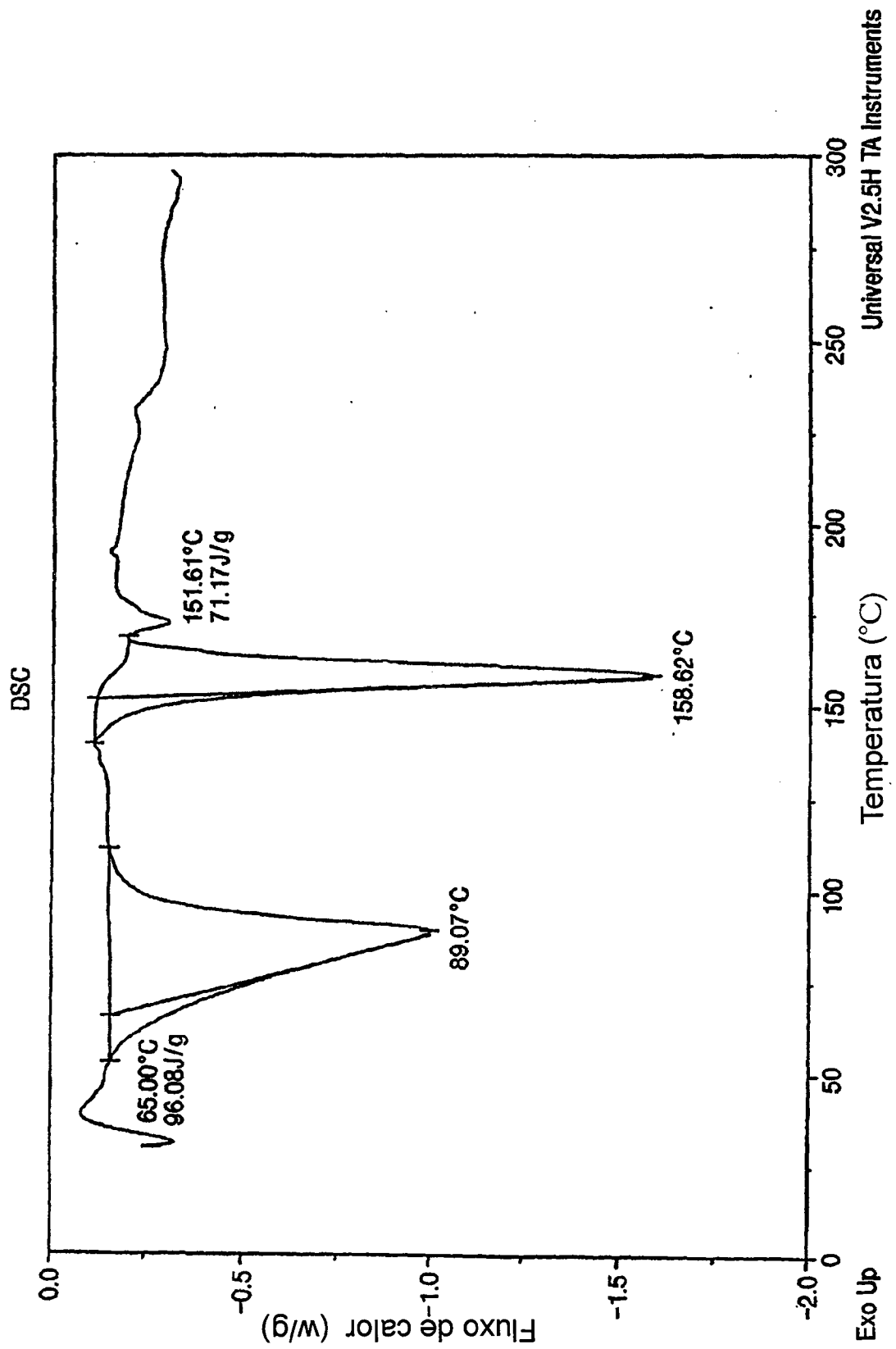


FIG. 5

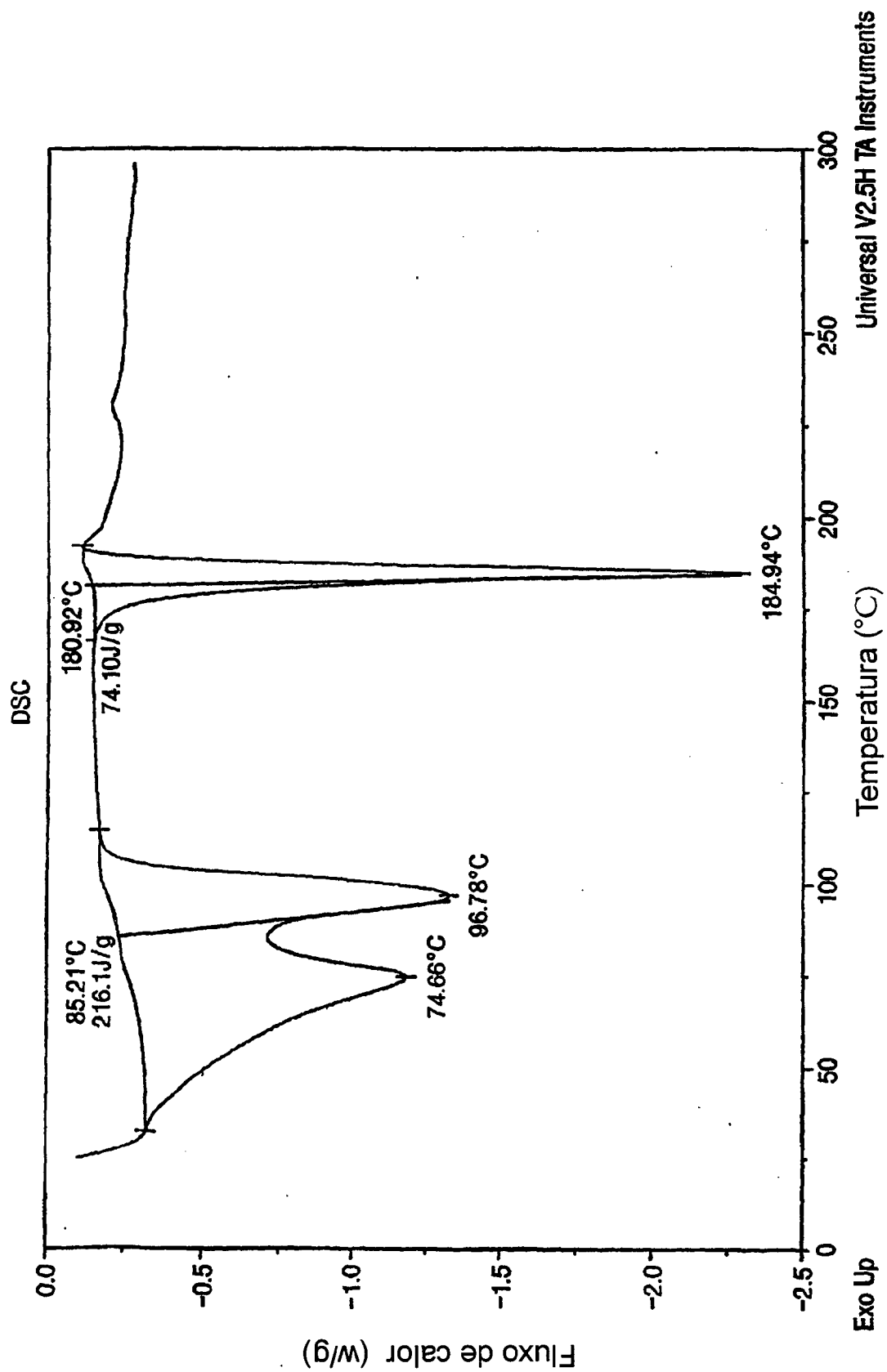


FIG. 6

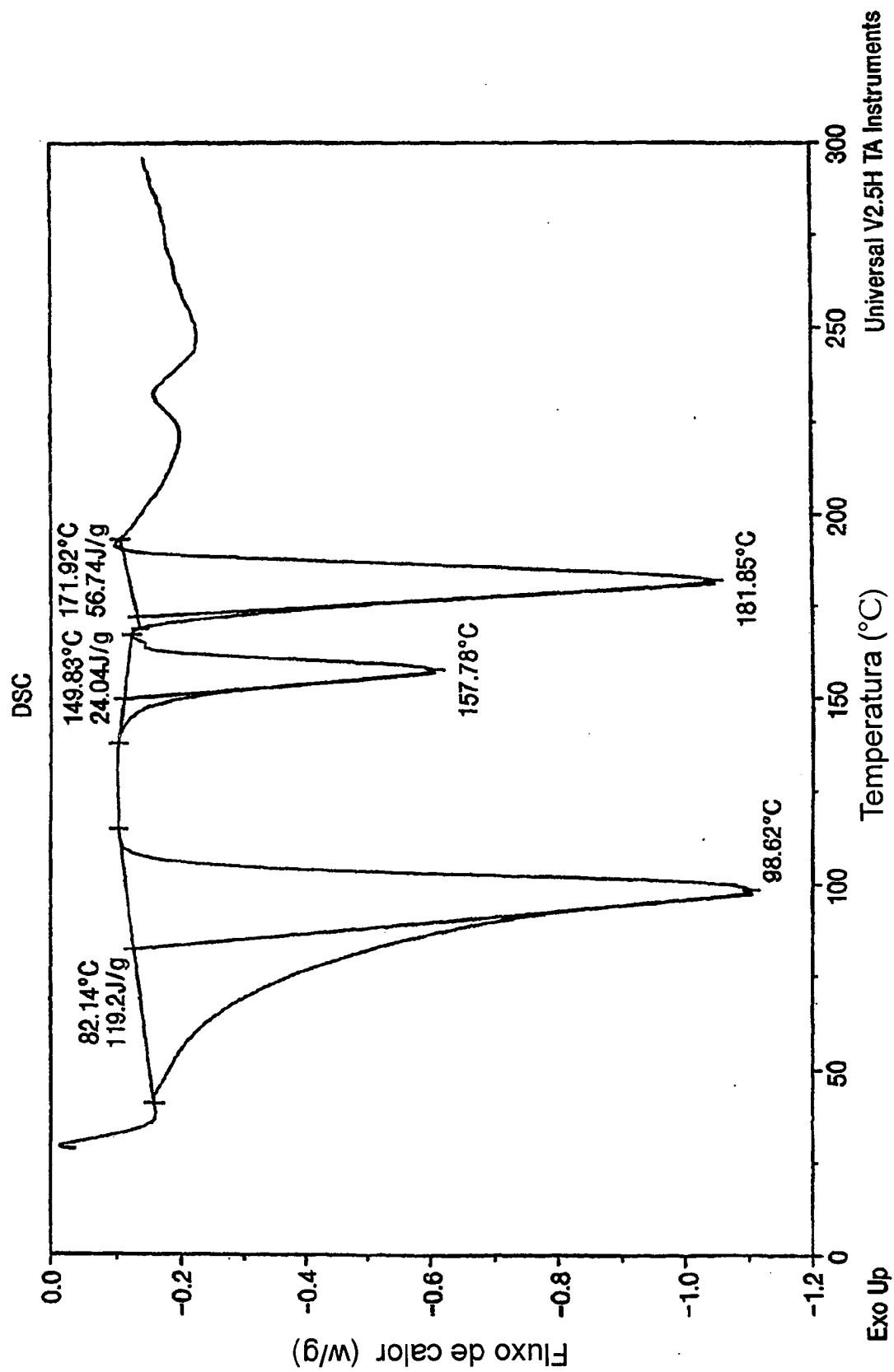


FIG. 7

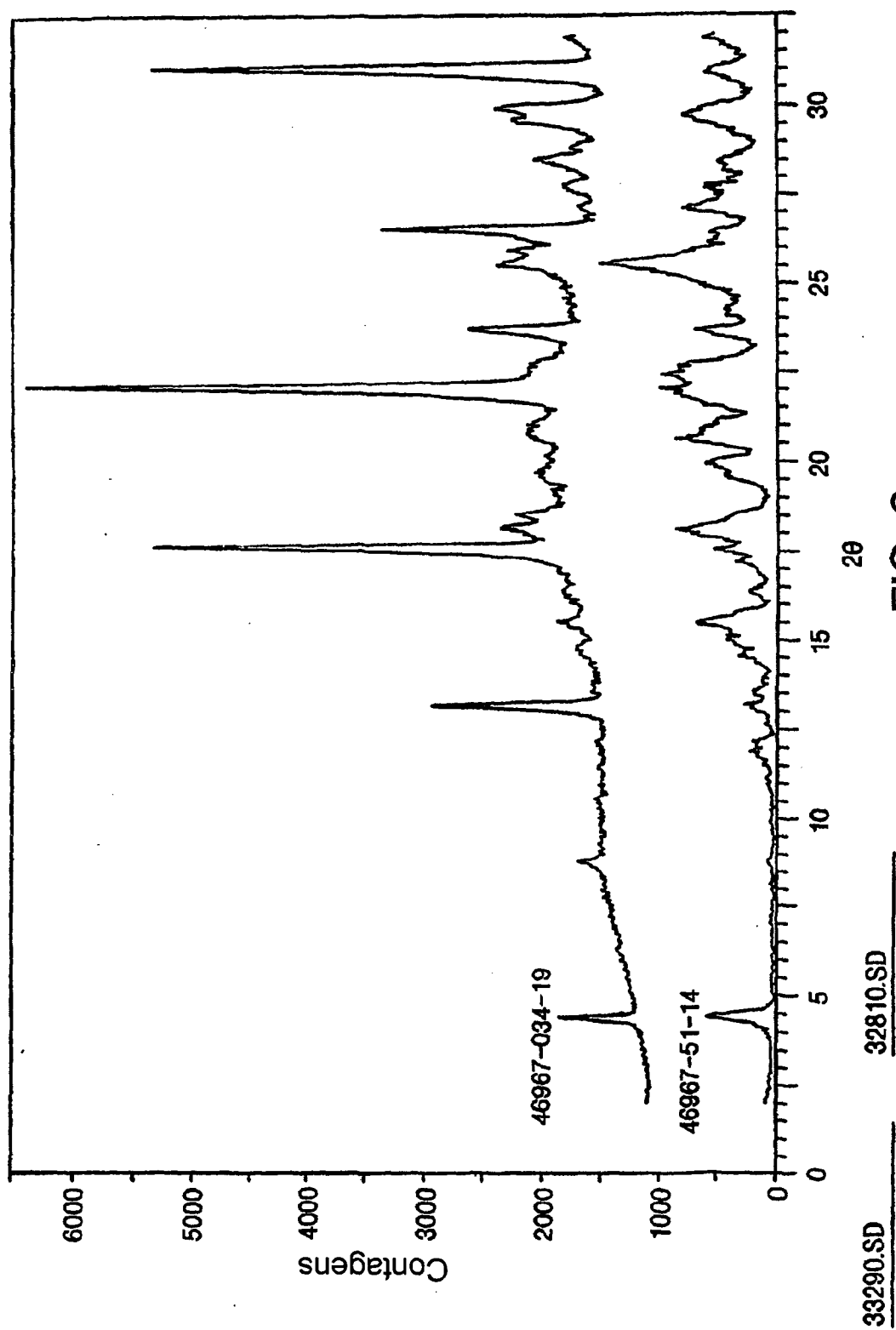
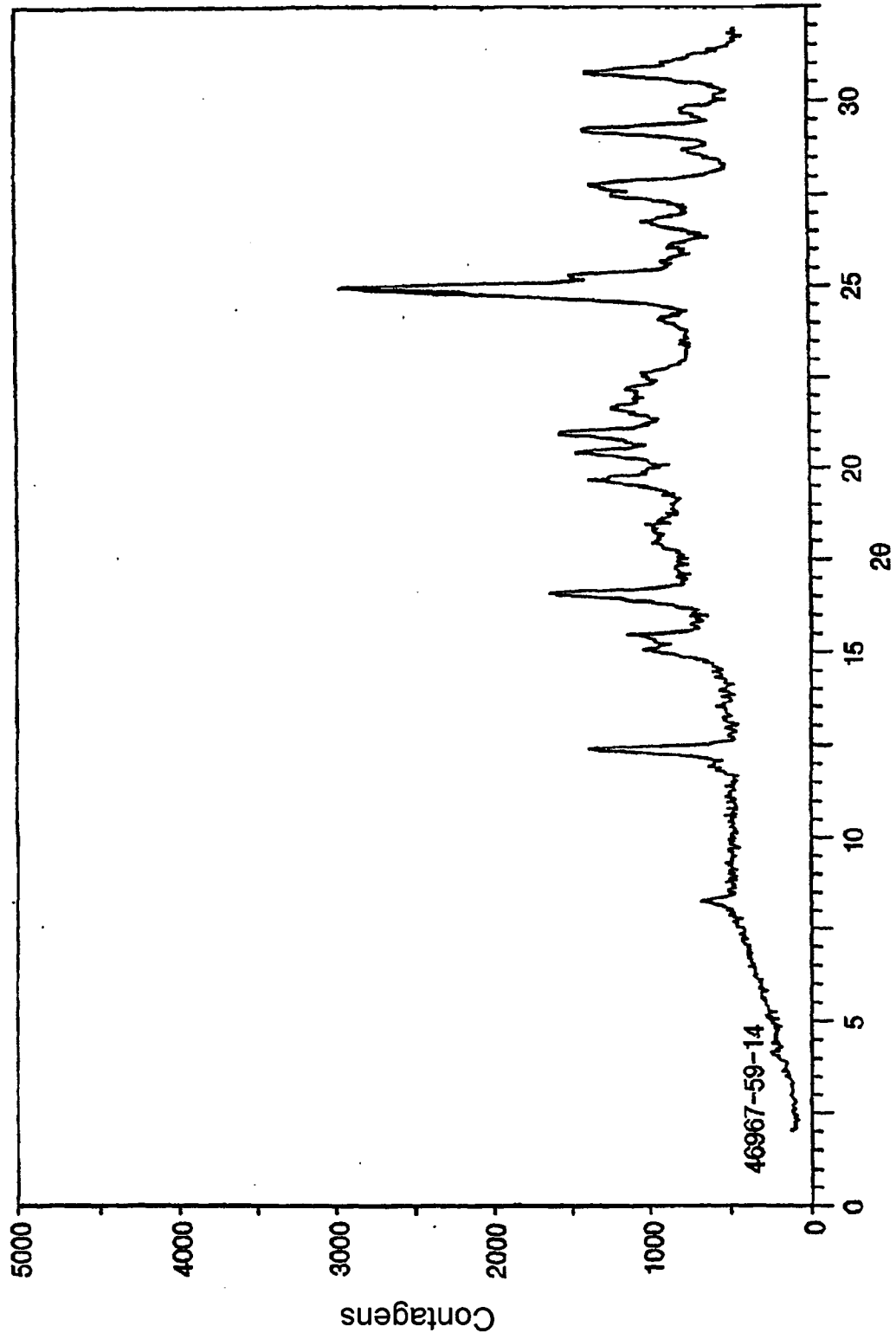


FIG. 8



33571.SD

33476.SD

FIG. 9

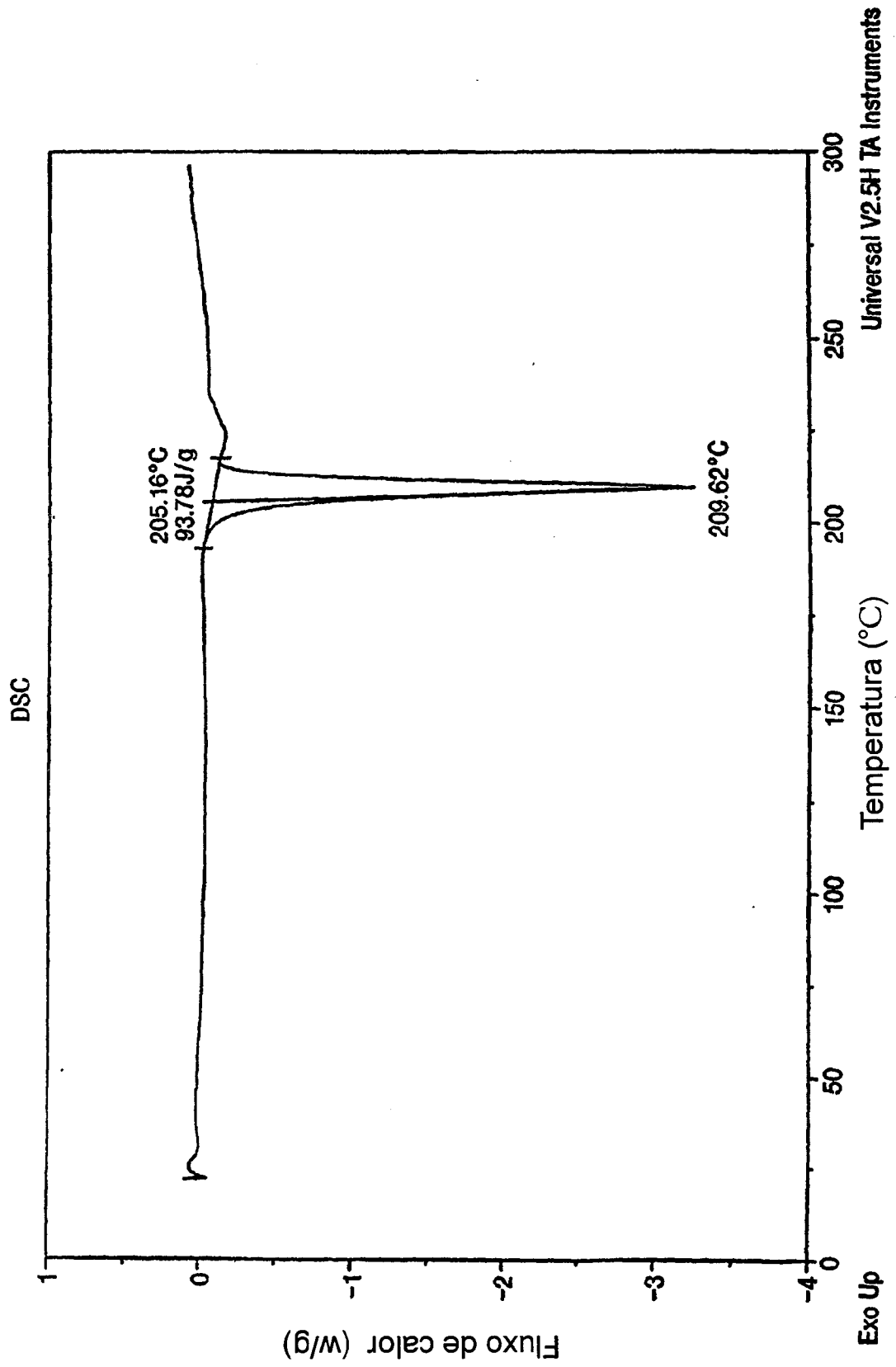


FIG. 10

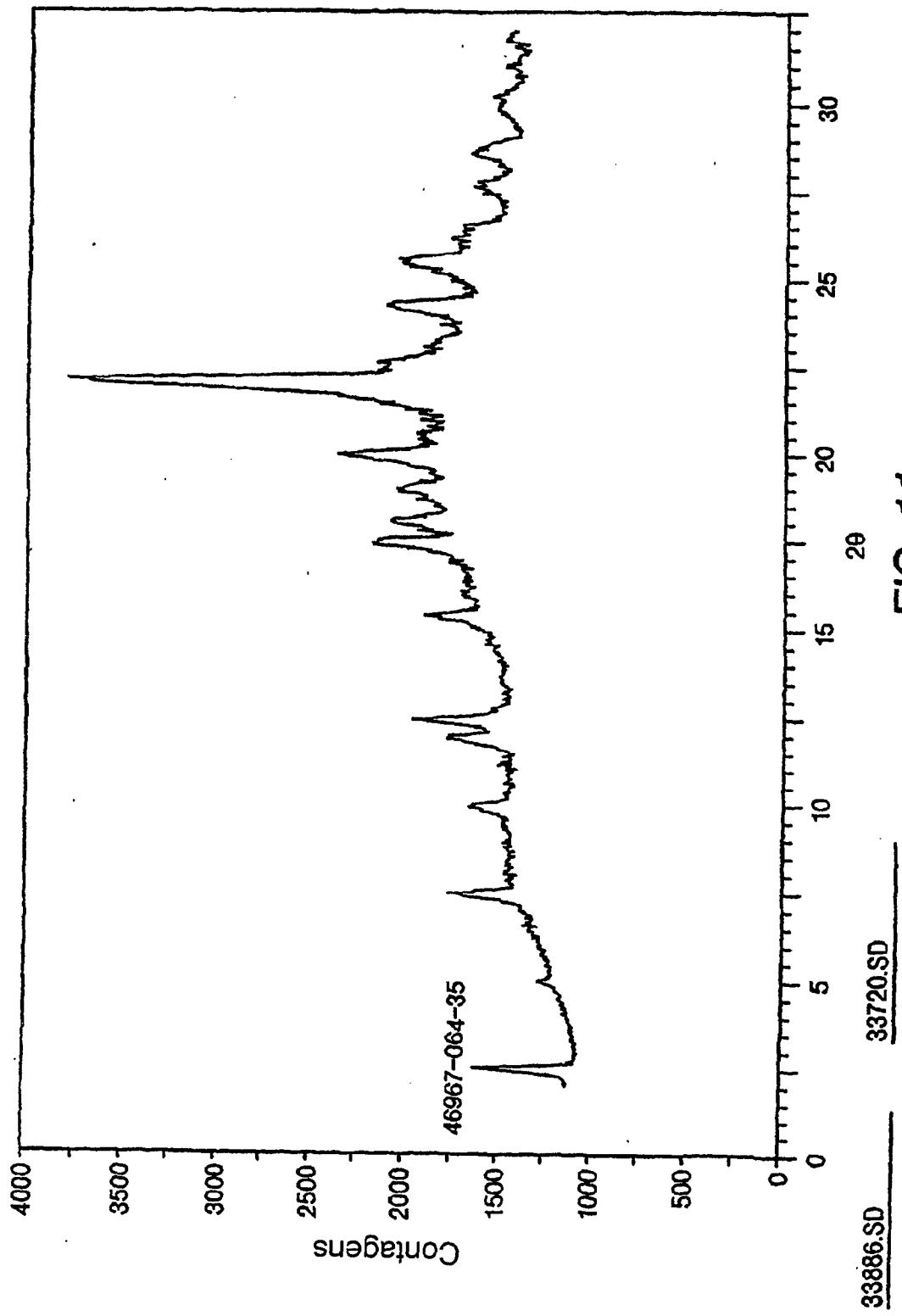


FIG. 11

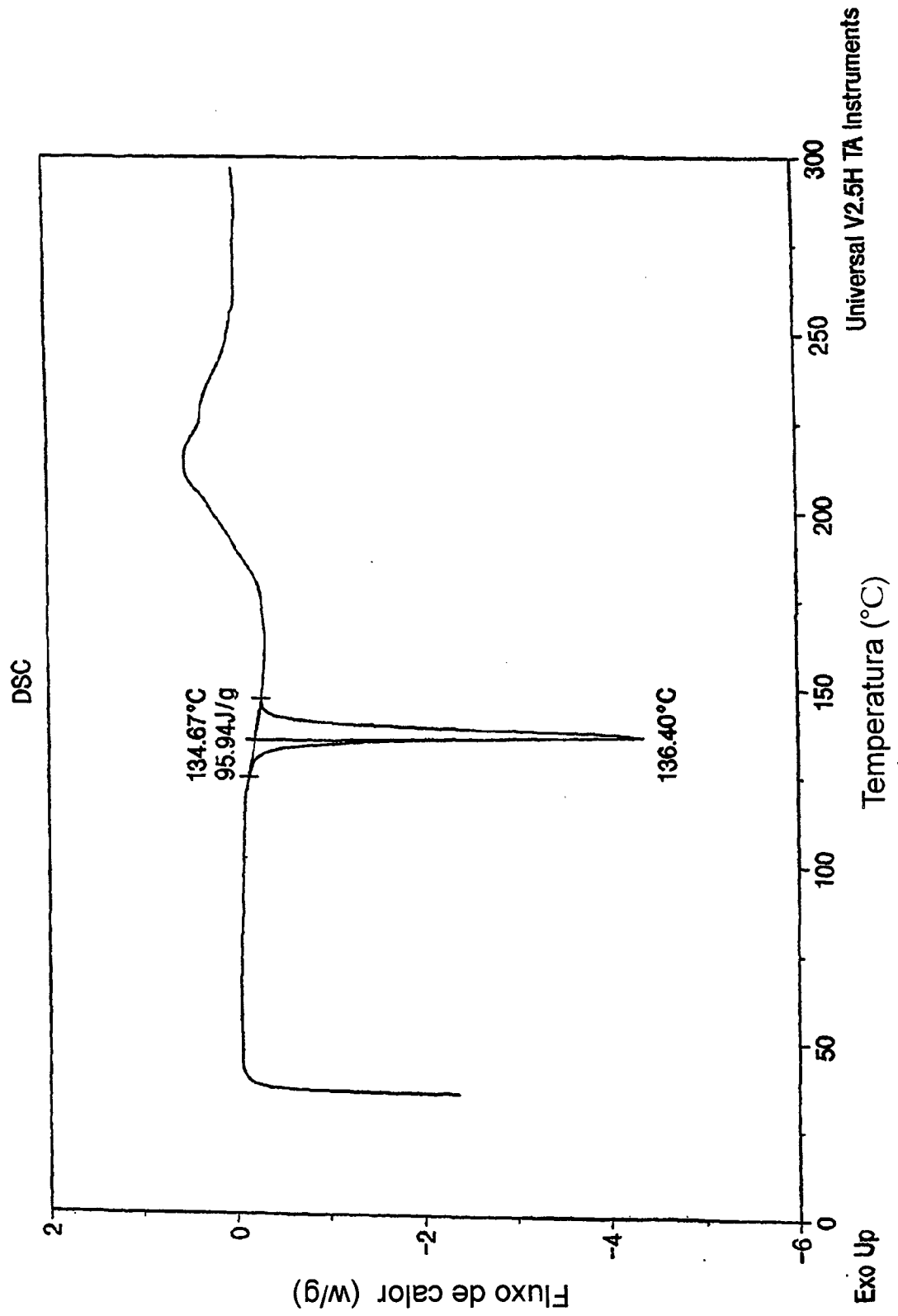


FIG. 12

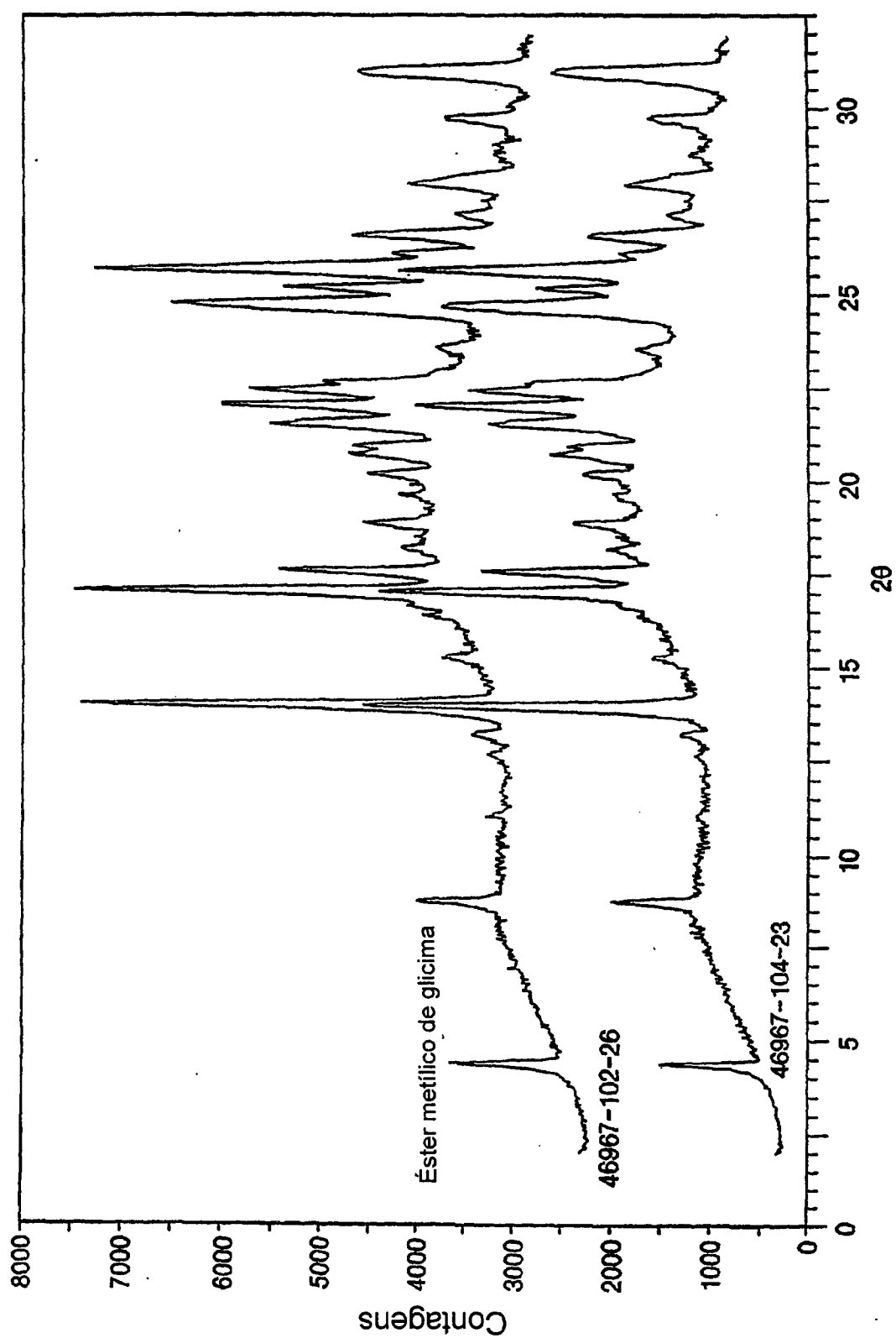


FIG. 13

35176.SD

35083.SD