

(11) Número de Publicação: **PT 2427467 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07F 9/6561** (2015.01) **A61K 31/665**  
(2015.01)  
**A61P 35/00** (2015.01)

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

(22) Data de pedido: <b>2010.05.07</b>	(73) Titular(es): <b>REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA</b> <b>1000 WESTGATE DRIVE, SUITE 160 ST. PAUL,</b> <b>MINNESOTA 55114-8658</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2009.05.07 US 176249 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.03.14</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.08.05</b> <b>227/2015</b>	(72) Inventor(es): <b>GEORG, INGRID GUNDA</b> <b>US</b> <b>SATISH PRAKASH PATIL</b> <b>US</b> <b>ASHOK K. SALUJA</b> <b>US</b> <b>ROHIT CHUGH</b> <b>US</b> <b>SELWYN M. VICKERS</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA</b> <b>RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **PROFÁRMACOS DE TRIPTÓLIDO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSTOS DE FÓRMULA (I): OU UM SAL DOS MESMOS. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM UM COMPOSTO DE FÓRMULA I, PROCESSOS PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FÓRMULA I, INTERMEDIÁRIOS ÚTEIS PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FÓRMULA I E MÉTODOS TERAPÊUTICOS UTILIZANDO OS COMPOSTOS DE FÓRMULA I.

## **RESUMO**

### **PROFÁRMACOS DE TRIPTÓLIDO**

A invenção proporciona compostos de fórmula (I): ou um sal dos mesmos. A invenção também proporciona composições farmacêuticas que compreendem um composto de fórmula I, processos para a preparação de compostos de fórmula I, intermediários úteis para a preparação de compostos de fórmula I e métodos terapêuticos utilizando os compostos de fórmula I.

## DESCRIÇÃO

### PROFÁRMACOS DE TRIPTÓLIDO

#### Antecedentes da Invenção

O cancro pancreático é uma doença particularmente agressiva e devastadora com uma taxa de sobrevivência de cinco anos de menos de 5%. Não existe nenhum tratamento farmacológico atualmente disponível que possa prolongar eficazmente a sobrevivência dos pacientes. Em 2006, mais de 35.000 novos casos de cancro pancreático foram relatados com um número quase igual sucumbindo à doença. A resistência à apoptose foi investigada como um fator chave na prevenção da resposta em pacientes a terapêuticas para tratar o cancro pancreático e outros cancros.

O triptólido é um composto de ocorrência natural obtido a partir da planta *Tripterygium wilfordii*. O triptólido é conhecido como sendo útil no tratamento de doenças autoimunes, rejeição de transplantes (imunossupressão), e possui efeitos anti-cancro e anti-fertilidade bem como outros efeitos biológicos (Qui e Kao, 2003, Drugs R.D. 4, 1-18). O triptólido tem fortes efeitos antitumorais contra os tumores de xenoenxertos (por exemplo, Yang et al. Mol. Cancer Ther, 2003, 2, 65-72). O triptólido é um agente anti-apoptótico com múltiplos alvos celulares que se encontram implicados no crescimento e metástase do cancro. O triptólido inibe a ativação de NF- $\kappa$ B, induz a clivagem de bid, bloqueia a indução do gene de sobrevivência p21 WAF1/<sup>Cip1</sup> (Wang et al. Journal of Molecular Medicine, 2006, 84, 405-415) e inibe a função do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1) desta forma suprimindo a expressão do gene endógeno Hsp70 (Westerheide et al. 2006, Journal of Biological Chemistry, 281, 9616-9622). O triptólido também funciona como um potente inibidor da angiogénese tumoral (He et al. 2010, Int. Journal of Cancer, 126, 266-278).

Existem vários mecanismos em células vivas que protegem contra condições adversas, incluindo células cancerosas. A síntese de uma família de proteínas referidas como proteínas de choque térmico (HSPs) é um tal mecanismo protetor. HSPs principais incluem HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e HSPs menores. As HSPs podem estar presentes na maioria dos compartimentos intracelulares, com HSP70 encontrando-se primariamente situada no citosol.

A expressão desregulada de HSP70 é conhecida como estando associada com várias doenças incluindo cânceros. HSP70 é abundantemente expressa em tumores malignos de várias origens (Por exemplo: Hantschel *et al.* 2000, *Cell Stress Chaperones*, 5, 438-442), que tornam as células tumorais resistentes a terapêutica e mau prognóstico para o paciente (Fuqua *et al.* 1994, *Breast Cancer Res, Tratamento* 32, 67-71). A proteína de choque térmico 70 (Hsp70) é conhecida como sendo regulada positivamente e sobreexpressa em células cancerosas pancreáticas em comparação com células normais. Além disso, HSP70 tem um efeito protetor nas células cancerosas inibindo a apoptose das células. A inibição de HSP70 em células cancerosas pancreáticas foi mostrada como aumentando a morte celular apoptótica destas células (Veja-se por exemplo Aghdassi *et al.*, *Cancer Research*, 67(2) p.616-625 (2007)). O triptólido foi mostrado como inibindo o crescimento e as metástases de tumor pancreático em ratinhos. Foi também mostrado que quando o triptólido é utilizado em combinação com radiação por ionização o seu efeito terapêutico é potenciado (Wang *et al.* *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 2006, 47, resumo n.º 4.720 e Wang *et al.* *Clin. Cancer Res.* 2007, 13, 4891-4899). Acredita-se que o efeito anti-câncer associado com o triptólido ocorre como resultado da redução dos níveis da proteína HSP70 expressa em quantidades significativas por parte de células cancerosas pancreáticas em comparação com células pancreáticas normais. Consequentemente, terapêuticas com triptólido têm sido de interesse no campo médico pelo seu tratamento potencial

de cancros que sobreexpressam HSP70, incluindo cancro pancreático. Veja-se por exemplo, Phillips *et al.*, Cancer Research, 67(19), p.9407-16 (2007). O documento EP 1552829 A1 proporciona derivados de triptólido hidrossolúveis tendo uma atividade imunossupressora elevada, métodos para a preparação de derivados de triptólido e a sua utilização no tratamento de doenças correlacionadas com a imunossupressão. O documento WO 2008/014602 A1 divulga que determinados quinolin-8-il oximetilfosfatos são profármacos para 8-hidroxiquinolinas úteis como inibidores de CLK1.

Existem, no entanto, determinadas desvantagens associadas com a administração de triptólido e foram exploradas diferentes soluções para abordar estes problemas. Um problema associado com o triptólido nativo é que é insolúvel em solução aquosa. Outro problema associado com o triptólido natural é a pobre biodisponibilidade e efeitos secundários tóxicos. São conhecidos triptólido, derivados de triptólido e determinados profármacos tendo solubilidade melhorada e toxicidade reduzida. Por exemplo, Dai *et al.* documento de patente U.S. N.º 6.548.537 descreve profármacos de triptólido tendo solubilidade aumentada e toxicidade reduzida.

A fração fosfonooximetilo *per se* é conhecida na técnica para fins de formação de compostos de profármaco de determinados compostos farmacêuticos. Por exemplo, Krise *et al.*, J. Med. Chem., 42, pp.3094-3100 (1999) descreve a preparação de profármacos de N-fosfonooximetilo de determinados compostos para melhorar a solubilidade em água.

Não obstante, os profármacos devem possuir uma série de propriedades de forma a serem úteis em termos práticos. Por exemplo, profármacos desejáveis devem ser estáveis para formulação e administração. Adicionalmente, uma vez administrado e presente no sistema do recetor, o profármaco deve ser ativado exitosamente. Além disso, tanto o profármaco como o composto ativado devem ser compatíveis com fluidos biológicos, tais como plasma e homogeneizados teciduais. Em

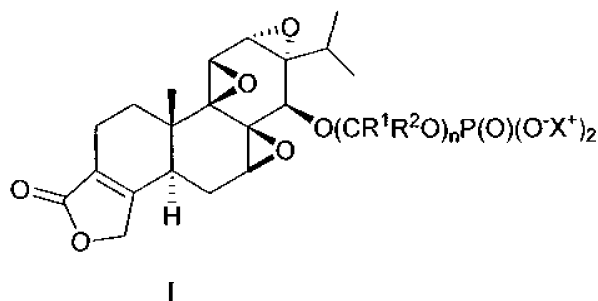
última análise, o composto ativado inicialmente administrado em forma de profármaco deve ter o seu efeito terapêutico ou farmacêutico desejado. Estes e outros fatores podem ser difíceis de alcançar simultaneamente, ou equilibrar coletivamente, com determinados tipos de compostos. Dentro do contexto de compostos de triptólido e profármaco de triptólido tem sido difícil alcançar uma solubilidade aquosa melhorada, biodisponibilidade eficaz para formas farmacêuticas orais, libertação *in vivo* mais rápida de triptólido e toxicidade relativamente reduzida ou menor em combinação com uma inibição significativa do crescimento de células cancerosas. Por exemplo, veja-se Chassaing *et al.*, Highly Water-Soluble Prodrugs of Anthelmintic Benzimidazole Carbamates: Synthesis, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, J. Med. Chem., 51(5), pp. 1111-1114 (2008).

São conhecidas formas de profármacos de succinato de triptólido, mas foram associadas com determinadas desvantagens. Veja-se, por exemplo, Harrousseau *et al.*, Haematologica 2008, 93(s1), 14 Resumo 0038 e Kitzen *et al.* European Journal of Cancer 2009, 45, 1764-1772. Foi observada conversão incompleta e variável do profármaco de succinato de triptólido.

Como tal, existe uma necessidade nos campos médico e farmacêutico de terapêuticas melhoradas para tratar cancros incluindo cancros de tumores sólidos agressivos, tais como cancro da próstata. Existe também uma necessidade adicional de administração melhorada ou parâmetros farmacocinéticos melhorados ou toxicidade reduzida de tais terapêuticas. Existe também uma necessidade de formas de profármaco de triptólido que tenham solubilidade melhorada ou que tenham libertação mais rápida do triptólido do composto ativo ou que tenham uma libertação mais terapeuticamente eficaz do composto ativo triptólido ou de formas de profármaco de triptólido com biodisponibilidade melhorada.

Sumário da Invenção

Consequentemente, a invenção proporciona um composto da invenção que é um composto de fórmula I:



em que:

cada  $R^1$  é independentemente H,  $(C_1-C_6)$ alquilo, aril $(C_1-C_6)$ alquilo-  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo ou arilo; e cada  $R^2$  é independentemente H,  $(C_1-C_6)$  alquilo, aril $(C_1-C_6)$ alquilo-  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo ou arilo; ou  $R^1$  e  $R^2$  em conjunto com o átomo ao qual se encontram ligados formam um  $(C_3-C_7)$ cicloalquilo; em que qualquer alquilo ou cicloalquilo de  $R^1$  ou  $R^2$  pode ser opcionalmente substituído com um ou mais (por exemplo 1, 2, 3, 4 ou 5) grupos selecionados a partir de halo,  $(C_1-C_6)$ alcoxi e  $NR^aR^b$  e em que qualquer arilo de  $R^1$  ou  $R^2$  pode ser opcionalmente substituído com um ou mais (por exemplo 1, 2, 3, 4 ou 5) grupos selecionados a partir de halo,  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_1-C_6)$  alcoxi,  $NR^aR^b$ , nitro e ciano;  $R^a$  e  $R^b$  são cada um independentemente selecionados a partir de H,  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo e arilo; ou  $R^a$  and  $R^b$  em conjunto com o azoto ao qual se encontram ligados formam um pirrolidino, piperidino, piperazino, azetidino, morfolino, ou tiomorfolino; n é 1, 2 ou 3; e cada X é H;

ou um sal do mesmo.

A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em combinação com um portador farmaceuticamente aceitável.

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização em terapêutica médica.

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização num método para tratar o cancro (por exemplo tumores de cancro pancreático, carcinoma dos ductos biliares, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro da mama, mieloma, cancro gástrico, cancro do fígado, glioblastoma, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, cancro pulmonar, cancro da próstata, cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células grandes, cancro renal, cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do colo do útero ou linfoma) num mamífero (por exemplo, um ser humano), compreendendo administrar um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ao mamífero (por exemplo, um ser humano).

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização no tratamento profilático ou terapêutico do cancro (por exemplo, tumores de cancro pancreático, carcinoma dos ductos biliares, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro da mama, mieloma, cancro gástrico, cancro do fígado, glioblastoma, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, cancro pulmonar, cancro da próstata, cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células grandes, cancro renal, cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do colo do útero ou linfoma).

A invenção também proporciona a utilização de um composto de fórmula I ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para o fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro (por exemplo, tumores de cancro pancreático, carcinoma dos ductos biliares, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro da mama, mieloma, cancro gástrico, cancro do fígado, glioblastoma, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, cancro pulmonar, cancro da próstata, cancro pulmonar de células



pequenas, cancro pulmonar de células grandes, cancro renal, cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do colo do útero ou linfoma) num mamífero (por exemplo, um ser humano).

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização num método para inibir o crescimento de células cancerosas num cancro expressando HSP70 (por exemplo, cancro pancreático, neuroblastoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro gástrico, cancro hepático ou glioblastoma) num mamífero (por exemplo, um ser humano) compreendendo administrar uma quantidade eficaz inibitória de um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ao mamífero (por exemplo, um ser humano).

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização na inibição profilática ou terapêutica do crescimento de células cancerosas num cancro expressando HSP70 (por exemplo, cancro pancreático, neuroblastoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro gástrico, cancro hepático ou glioblastoma).

A invenção também proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para o fabrico de um medicamento para a inibição do crescimento de células cancerosas expressando HPS70 (por exemplo, cancro pancreático, neuroblastoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro gástrico, cancro hepático ou glioblastoma) num mamífero (por exemplo um ser humano).

A invenção também proporciona processos inovadores e intermediários inovadores divulgados no presente documento que são úteis para preparar compostos de fórmula I ou sais dos mesmos, por exemplo, os descritos nos Esquemas 1-2.

#### Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 ilustra um diagrama de reação química para preparar o composto 1.

A Figura 2 ilustra um diagrama de reação química mostrando triptólido sendo derivado para o composto 1 e a subsequente

clivagem enzimática - degradação química do composto 1 para libertar triptólido.

A Figura 3 ilustra a conversão enzimática *in vitro* do profármaco de triptólido (composto 1 para triptólido).

A Figura 4 ilustra os efeitos comparativos do triptólido e do profármaco de triptólido (composto 1) na viabilidade de células MiaPaca-2 *in vitro* às 48 horas.

A Figura 5 ilustra os efeitos comparativos do triptólido e do profármaco de triptólido (composto 1) na viabilidade de células Panc-1 *in vitro* às 24 horas e às 48 horas.

A Figura 6 ilustra os efeitos comparativos do triptólido e profármaco de triptólido (composto 1) na viabilidade de células S2VP10 *in vitro* às 24 horas e às 48 horas.

A Figura 7 ilustra o crescimento tumoral num grupo de controlo de ratinhos com cinco fotografias *in situ* e uma fotografia de tumores *ex vivo*.

A Figura 8 ilustra o crescimento tumoral num grupo de triptólido de ratinhos com três fotografias *in situ* e uma fotografia de tumores *ex vivo*.

A Figura 9 ilustra o crescimento tumoral num grupo de profármaco de triptólido (composto 1) de ratinhos com quatro fotografias *in situ* e uma fotografia de tumores *ex vivo*.

A Figura 10 é uma fotografia da coleção de tumores *ex vivo* a partir da experiência *in vivo* mostrando tamanhos comparativos de tumores para o grupo de controlo, grupo de triptólido e grupo de profármaco de triptólido (composto 1).

A Figura 11 ilustra o peso tumoral comparativo (g) para os tumores do grupo de controlo, grupo de triptólido e o grupo de profármaco de triptólido (composto 1) de ratinhos a partir da experiência *in vivo*.

A Figura 12 ilustra o volume tumoral comparativo (cm<sup>3</sup>) para os tumores do grupo de controlo, grupo de triptólido e o grupo de profármaco de triptólido (composto 1) de ratinhos a partir da experiência *in vivo*.

A Figura 13 ilustra a análise de sobrevivência de ratinhos

tratados com o composto 1 e ratinhos de controlo.

A Figura 14 ilustra análise de sobrevivência de ratinhos tratados com o composto 1 e ratinhos de controlo.

A Figura 15 ilustra a carga tumoral (volume e peso) para os ratinhos tratados com o triptólido do composto 1 e veículo.

A Figura 16 ilustra a carga tumoral (volume e peso) para ratinhos tratados com triptólido do composto 1 e veículo.

A Figura 17 ilustra a carga tumoral (volume e peso) para ratinhos tratados com triptólido do composto 1 e veículo.

A Figura 18 ilustra o volume tumoral para ratinhos tratados com composto e veículo.

A Figura 19 ilustra a viabilidade celular (Neuroblastoma N2a e SKNSH) em presença de triptólido.

A Figura 20 ilustra a atividade de Caspase 3 na presença de triptólido.

#### Descrição Detalhada da Invenção

##### Definições

O termo "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo" conforme utilizado no presente documento refere-se a grupos alquilo tendo desde 1 até 6 átomos de carbono que são grupos lineares ou ramificados. Este termo é exemplificado através de grupos tais como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, n-pentilo, neopentilo, e n-hexilo, e semelhantes.

O termo "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alcoxi" conforme utilizado no presente documento refere-se ao grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo- onde (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo é conforme definido no presente documento. Este termo é exemplificado pelos grupos tais como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, pentoxi, 3-pentoxi, ou hexiloxi, e semelhantes.

O termo "(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)cicloalquilo" conforme utilizado no presente documento refere-se a um sistema de anel de hidrocarboneto cíclico saturado ou parcialmente insaturado compreendendo 3 a 7 átomos de carbono. Este termo é exemplificado através de tais grupos como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexeno, ou

cicloheptano, e semelhantes.

O termo "arilo" conforme utilizado no presente documento refere-se a um radical fenilo ou um radical carbocíclico bicíclico orto-fundido tendo cerca de nove a dez átomos de carbono de anel nos quais pelo menos um anel é aromático. Este termo é exemplificado através de tais grupos como fenilo, indanilo, indenilo, naftilo, 1,2-diidronaftilo and 1,2,3,4-tetraidronaftilo.

O termo "arilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo-" conforme utilizado no presente documento refere-se ao grupo arilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo- onde (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo e arilo são conforme definidos no presente documento. Este termo é exemplificado através de tais grupos como benzilo e fenetilo e semelhantes.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "compreender" significa os elementos citados, ou o seu equivalente em estrutura ou função, mais qualquer/quaisquer outro(s) elemento(s) que não é(são) citado(s). Os termos "tendo" e "incluindo" devem também ser considerados como em aberto a menos que o contexto sugira de outra forma. Termos tais como "cerca", "geralmente", "substancialmente", e semelhantes devem ser considerados como modificando um termo ou valor de tal forma que não é um absoluto, mas não figura na técnica anterior. Tais termos serão definidos através das circunstâncias e os termos que estes modificam são entendidos por parte dos peritos na especialidade. Isto inclui no mínimo o grau de erro experimental esperado, erro de técnica, e erro instrumental para uma determinada técnica utilizada para medir um valor.

As frases "quantidade terapeuticamente eficaz" e "quantidade farmacêuticamente eficaz" são utilizadas no presente documento, por exemplo, para significar uma quantidade suficiente para reduzir ou inibir o crescimento de células cancerosas *in vivo* após administração a um mamífero vivo. As frases pretendem referir a quantidade determinada como sendo requerida para produzir o efeito fisiológico pretendido

e associado com o ingrediente ativo dado, conforme medido de acordo com métodos e técnicas farmacocinéticos estabelecidos, para a via de administração dada.

A frase "quantidade eficaz inibitória" conforme utilizada em associação com a quantidade de composto ativo e composição da invenção pretende referir, por exemplo, propriedades antitumorais exibidas conforme demonstrado utilizando técnicas de ensaio de cultura celular padrão.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "profármaco" pretende referir um composto farmacêutico que requer metabolismo adicional (incluindo mas não limitado ao fígado) antes de se tornar biologicamente ativo.

Será apreciado por parte dos peritos na especialidade que compostos da invenção tendo um centro quiral podem existir em, e ser isolados, em formas opticamente ativas e racêmicas. Alguns compostos podem exibir polimorfismo. Deve ser entendido que a presente invenção abrange qualquer forma racêmica, opticamente ativa, polimórfica, ou estereoisomérica, ou misturas das mesmas, de um composto da invenção, que possuem as propriedades úteis descritas no presente documento, sendo bem conhecido na técnica como preparar formas opticamente ativas, por exemplo, através da resolução da forma racêmica por meio de técnicas de recristalização, através de síntese a partir de materiais de partida opticamente ativos, através de síntese quiral, ou através de separação cromatográfica utilizando uma fase estacionária quiral.

Um sal de um composto de fórmula I pode ser útil como um intermediário para isolar ou purificar um composto de fórmula I. Adicionalmente, a administração de um composto de fórmula I como um sal de ácido ou base farmacêuticamente aceitável pode ser adequada. Exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis são sais de adição de ácido orgânicos e sais inorgânicos.

Os termos "catião orgânico ou catião inorgânico" ou "sal catiónico orgânico ou inorgânico" incluem catiões orgânicos ou catiões inorgânicos (por exemplo sais metálicos ou de aminas)

que são bem conhecidos na técnica e incluem frações catiónicas que podem formar uma associação iónica com as frações O no composto e não afetando significativamente adversamente as propriedades desejadas do profármaco para fins da invenção. O termo "catiões orgânicos ou catiões inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis" ou "sal orgânico ou inorgânico farmaceuticamente aceitável" inclui os "catiões orgânicos ou inorgânicos" que são farmaceuticamente aceitáveis para utilização num mamífero e são bem conhecidos na técnica.

Catiões orgânicos ou catiões inorgânicos incluem mas não estão limitados a catiões lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio, bário, zinco, alumínio e amina. Catiões de amina incluem mas não estão limitados a catiões derivados a partir de amoníaco, trietilamina, trometamina (TRIS), trietanolamina, etilenodiamina, glucamina, N-metilglucamina, glicina, lisina, ornitina, arginina, etanolamina, colina e semelhantes. Numa forma de realização, os catiões de amina são catiões em que  $X^+$  é da fórmula  $YH^+$  em que Y é amoníaco, trietilamina, trometamina (TRIS), trietanolamina, etilenodiamina, glucamina, N-metilglucamina, glicina, lisina, ornitina, arginina, etanolamina, colina e semelhantes.

Numa forma de realização sais catiónicos orgânicos ou inorgânicos adequados que podem ser utilizados incluem frações catiónicas que podem formar uma associação iónica com as frações O do composto e não afetando significativamente de forma adversa as propriedades desejadas do profármaco para fins da invenção, por exemplo, solubilidade aumentada, estabilidade, e libertação hidrolítica rápida da forma do composto ativo. Preferentemente, X é selecionado a partir de  $Li^+$ ,  $K^+$ , or  $Na^+$ . Mais preferentemente, X é  $Na^+$  formando como tal o sal dissódico.

Sais farmaceuticamente aceitáveis podem também incluir sais formados com ácidos que formam um anião fisiologicamente aceitável, por exemplo, tosilato, metanossulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato,

$\alpha$ -cetoglutarato e  $\alpha$ -glicerofosfato. Podem também ser formados sais inorgânicos adequados, incluindo sais de cloridrato, sulfato, nitrato, bicarbonato e carbonato. Podem ser obtidos sais, incluindo sais farmacologicamente aceitáveis utilizando procedimentos padrão bem conhecidos na técnica, por exemplo através da reação de um composto suficientemente básico tal como uma amina com um ácido adequado proporcionando um anião fisiologicamente aceitável.

A invenção inclui tanto o ácido livre (por exemplo  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ), como monossais (por exemplo  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{O}-\text{X}^+)$ ) e dissais (por exemplo  $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{X}^+)_2$ ) dos compostos de fórmula I. O ácido e os sais podem ser purificados através de uma variedade de técnicas bem conhecidas na técnica tais como cromatografia, seguida por liofilização ou recristalização.

Será apreciado por parte dos peritos na especialidade que um composto de fórmula I em que  $\text{X}^+$  é um catião orgânico ou um catião inorgânico pode ser convertido num composto de fórmula I compreendendo um ou mais catiões orgânicos ou inorgânicos diferentes. Uma tal conversão pode ser alcançada utilizando uma variedade de técnicas e materiais bem conhecidos incluindo, mas não limitados, a resinas de permuta iônica, cromatografia de permuta iônica e cristalização seletiva.

Um valor específico para  $\text{R}^1$  é H ou  $(\text{C}_1-\text{C}_6)$ alquilo.

Outro valor específico para  $\text{R}^1$  é H.

Um valor específico para  $\text{R}^1$  é  $(\text{C}_1-\text{C}_6)$ alquilo.

Outro valor específico para  $\text{R}^1$  é metilo ou etilo.

Um valor específico para  $\text{R}^2$  é H ou  $(\text{C}_1-\text{C}_6)$ alquilo.

Outro valor específico para  $\text{R}^2$  é H.

Um valor específico para  $\text{X}^+$  é H.

Outro valor específico para  $\text{X}^+$  é lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio, bário, zinco ou alumínio.

Outro grupo específico de compostos de fórmula I são compostos em que  $\text{X}^+$  é da fórmula  $\text{HY}^+$  em que Y é amoníaco, trietilamina, trometamina, trietanolamina, etilenodiamina, glucamina, N-metilglucamina, glicina, lisina, ornitina,

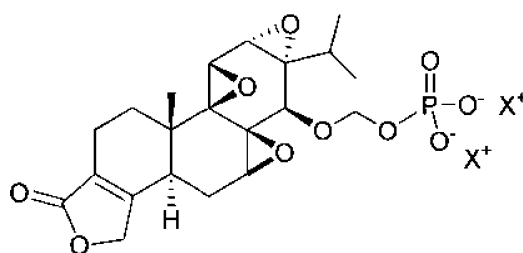
arginina, etanolamina ou colina.

Outro valor específico para  $X^+$  é  $Li^+$ ,  $K^+$  or  $Na^+$ .

Outro valor específico para  $X^+$  é  $Na^+$ .

Um composto específico de fórmula I é sal dissódico de 4-O-fosfonooximetiltriptólido, sal dissódico de 14-O-fosfonooxietiltriptólido ou sal dissódico de 14-O-fosfonooxipropiltriptólido, ou um sal do mesmo.

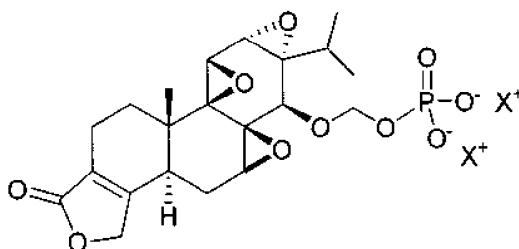
Um grupo específico de compostos de fórmula I são compostos de fórmula Ia:



Ia

em que  $X^+$  é um catião orgânico ou catião inorgânico farmacêuticamente aceitável.

Outro grupo específico de compostos de fórmula I são compostos de fórmula Ia:



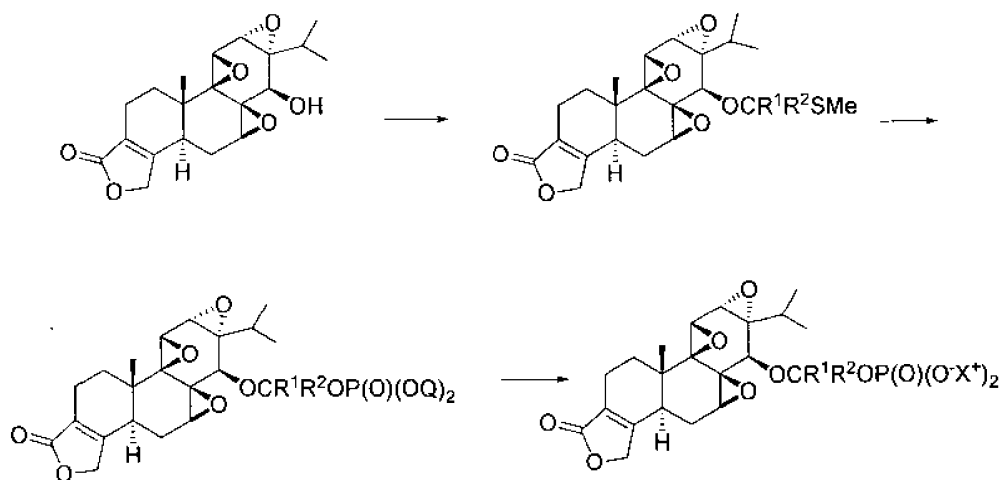
Ia

em que  $X^+$  é um catião orgânico ou sal inorgânico farmacêuticamente aceitável.

Processos que podem ser utilizados para preparar compostos de fórmula I e intermediários úteis para preparar compostos de fórmula I são mostrados no Esquema 1 e Esquema 2.

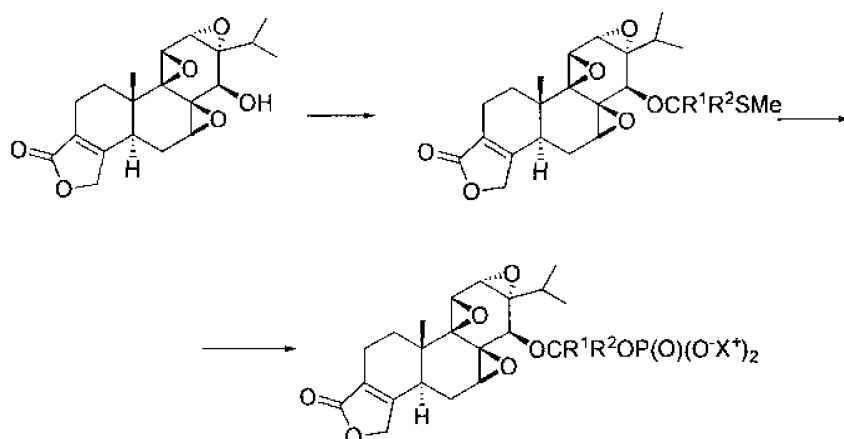


Esquema 1

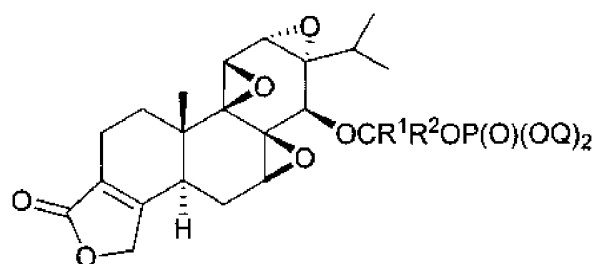


em que Q é um grupo protetor tal como benzilo ou *tert*-butilo.

Esquema 2



Um composto de fórmula I pode ser preparado através da remoção de um ou mais grupos protetores a partir de um composto de fórmula IA:

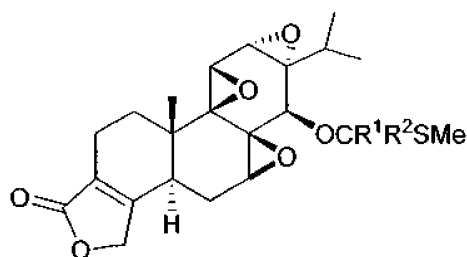


Q é um grupo protetor (por exemplo benzilo ou *tert*-butilo)

**IA**

para proporcionar o correspondente composto de fórmula I. Como tal, o intermediário de fórmula IA é útil para preparar um composto de fórmula I.

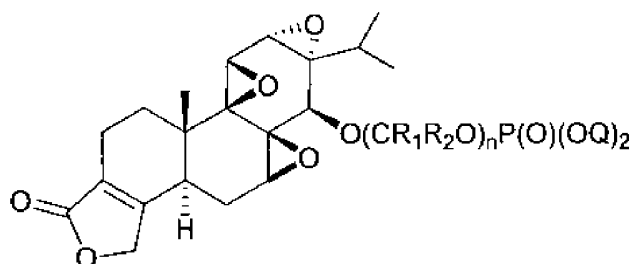
Um composto de fórmula I pode também ser preparado através da conversão do grupo -SMe a partir de um composto de fórmula IB:



**IB**

num grupo -OP(O)(O<sup>-</sup>X<sup>+</sup>)<sub>2</sub> para proporcionar o correspondente composto de fórmula I. Como tal, o intermediário de fórmula IB é útil para preparar um composto de fórmula I.

Um composto de fórmula I pode também ser preparado através da remoção de um ou mais grupos protetores a partir de um composto de fórmula IC:

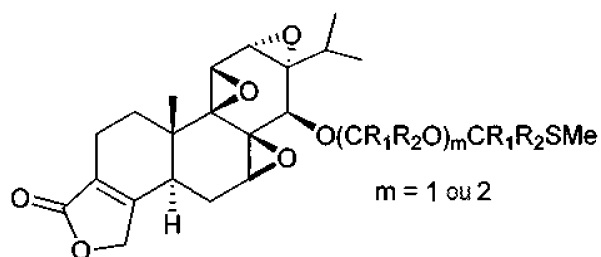


Q é um grupo protetor (por exemplo benzilo ou *tert*-butilo)

**IC**

para proporcionar o correspondente composto de fórmula I. Como tal, o intermediário de fórmula IC é útil para preparar um composto de fórmula I.

Um composto de fórmula I pode também ser preparado através da conversão do grupo -SMe a partir de um composto de fórmula ID:



$m = 1 \text{ ou } 2$

**ID**

num grupo  $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-\text{X}^+)_2$  para proporcionar o correspondente composto de fórmula I. Como tal, o intermediário de fórmula ID é útil para preparar um composto de fórmula I.

Consequentemente, a invenção proporciona um método:

- para preparar um composto de fórmula I compreendendo desproteger um correspondente composto de fórmula IA portando um ou mais grupos protetores para proporcionar o composto de fórmula I.
- para preparar um composto de fórmula I compreendendo converter o grupo -SMe a partir de um composto de fórmula IB num grupo  $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-\text{X}^+)_2$  para proporcionar o composto de fórmula I.
- para preparar um composto de fórmula I compreendendo desproteger um correspondente composto de fórmula IC

portando um ou mais grupos protetores para proporcionar o composto de fórmula I.

d) para preparar um composto de fórmula I compreendendo converter o grupo -SMe a partir de um composto de fórmula ID num grupo  $-OP(O)(O^-X^+)_2$  para proporcionar o composto de fórmula I.

e) para preparar um sal de um composto de fórmula I compreendendo tratar um correspondente composto de fórmula I com um ácido (por exemplo um ácido orgânico ou ácido inorgânico) ou base (por exemplo uma base alcali ou base alcalina) para proporcionar o sal do composto de fórmula I.

f) para converter um composto de fórmula I em que um ou mais  $X^+$  é um sal orgânico ou inorgânico catiónico num composto de fórmula I em que um ou mais  $X^+$  é um sal orgânico ou inorgânico catiónico diferente.

O composto da invenção pode ser formulado em composições farmacêuticas bem como através de combinação juntamente com um portador farmaceuticamente aceitável. Podem ser preparadas composições farmacêuticas de acordo com compostos e técnicas bem conhecidas prontamente disponíveis para os peritos no campo farmacêutico. Para os fins da invenção, o portador farmaceuticamente aceitável pode ser qualquer substância compatível ou inerte convencional e prontamente disponível biologicamente que é quimicamente compatível com o ingrediente farmacêutico ativo e não atenua significativamente o seu efeito terapêutico pretendido após formulação ou administração. Podem ser preparados sais farmaceuticamente aceitáveis utilizando procedimentos e técnicas padrão bem conhecidos na técnica.

A forma sólida de um composto da invenção pode ser uma nanopartícula e como tal formulada como uma nanopartícula. Consequentemente, a invenção proporciona nanopartículas de um composto de fórmula I e composições que compreendem nanopartículas de um composto de fórmula I.

Os compostos de profármaco de triptólido da presente invenção podem ser formulados utilizando uma variedade de

formulações de excipientes e preparados em várias formas farmacêuticas conforme descrito abaixo. As propriedades e atributos químicos associados com os compostos da invenção podem também proporcionar a preparação de uma forma farmacêutica sólida oral da invenção.

O composto da invenção pode ser formulado como composições farmacêuticas e administrado a um recetor numa série de formas adequadas para a via ou sistema de administração particular desejada. As vias de administração podem incluir mas estão limitadas a vias orais, vias parentéricas, vias intravenosas (incluindo vias intravenosas através de injeção por bombeio), vias intramusculares, vias tópicas incluindo gotas oculares, vias subcutâneas e vias mucosas. Os compostos da invenção podem ser administrados sistemicamente, por exemplo por via oral, em combinação com um portador farmacêuticamente aceitável tal como um diluente inerte ou portador comestível assimilável. Como tal a composição farmacêutica compreendendo os compostos da invenção como o ingrediente ativo podem ser preparados numa variedade de formas farmacêuticas. Por exemplo, as composições podem ser encapsuladas em cápsulas duras ou moles (por exemplo, gelatina ou materiais capsulares derivados de vegetais). As composições podem ser prensadas em forma de comprimido ingerível ou transmucoso, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, supositórios e semelhantes. A quantidade de ingrediente ativo pode variar de acordo com a quantidade de dosagem farmacêuticamente eficaz desejada.

Comprimidos, trociscos, pílulas, cápsulas, e semelhantes podem conter ingredientes adicionais tais como aglutinantes (tais como goma de tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina); excipientes tais como fosfato dicálcico; desintegrantes tais como amido de milho, amido de batata, ácido alginico, e semelhantes; lubrificantes (tais como estearato de magnésio) que podem ser utilizados para técnicas de compressão de comprimidos, por exemplo; edulcorantes tais como sacarose, frutose, lactose ou aspartame; e agentes aromatizantes tais

como hortelã-pimenta, gualtéria, cerejeira e semelhantes. Ingredientes adicionais que podem ser incluídos em composições da invenção são manitol, ureia, dextranos e açúcares não redutores de lactose.

Quando a forma farmacêutica é uma cápsula, pode conter um portador líquido incluindo polietilenoglicol, óleo vegetal, etc. Outros materiais que podem ser utilizados com determinadas formas farmacêuticas incluem gelatina, cera, goma-laca, açúcar e semelhantes. Formas de xarope ou elixir podem conter sacarose, frutose como edulcorantes, metil e propilparabenos como conservantes, agentes de coloração e corantes, e agentes aromatizantes.

Quando administradas por via intravenosa ou intraperitoneal através de infusão ou injeção, podem ser preparadas soluções do ingrediente ativo e dos seus sais em, por exemplo, água ou solução salina contendo opcionalmente um tensioativo não tóxico. Podem ser preparadas dispersões em glicerol, polietilenoglicóis líquidos, triacetina, e misturas dos mesmos e em óleos. As condições de armazenamento podem necessitar a inclusão de um conservante de igual forma.

As formas farmacêuticas adequadas para injeção ou infusão podem incluir soluções aquosas ou dispersões estéreis ou pós estéreis compreendendo o ingrediente ativo que são adaptadas para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis ou infusíveis estéreis, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. Em todos os casos, a forma farmacêutica final deve ser estéril, fluida e estável sob as condições de fabrico e armazenamento. O portador ou veículo líquido pode ser um solvente ou um meio de dispersão compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicóis líquidos e semelhantes), óleos vegetais, ésteres glicerílicos não tóxicos, e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através da formação de lipossomas, através da manutenção do tamanho de partícula adequado no caso das

dispersões ou através da utilização de tensioativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser ocasionada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada através da utilização nas composições de agentes atrasando a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Soluções estéreis injetáveis são preparadas através da incorporação do composto ativo na quantidade necessária no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por esterilização através de filtro. No caso de pós estéreis para a preparação das soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são as técnicas de secagem por vácuo e secagem por congelação, que proporcionam um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional presente nas soluções previamente esterilizadas por filtração.

Consequentemente, a invenção inclui a preparação estéril de um composto da invenção. A invenção também inclui preparações não estéreis de um composto da invenção.

Formas farmacêuticas injetáveis ou infusíveis podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis ou pós estéreis compreendendo os compostos ativos da invenção preparados para formulação extemporânea. Portadores líquidos podem incluir solventes ou meios de dispersão líquidos compreendendo água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicóis), e semelhantes. Podem ser adicionados vários agentes para inibir ou prevenir a atividade antimicrobiana, tais como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes.

Compostos e composições da invenção podem ser administrados como uma dose única ou em intervalos de doses

múltiplas. A quantidade de dosagem, forma farmacêutica, via de administração, e os ingredientes de formulação particulares podem variar correspondendo à concentração de plasma desejada e farmacocinéticos envolvidos. Um aspecto significativo da invenção é que os compostos particulares da invenção podem proporcionar uma via de administração de forma farmacêutica oral melhorada e eficaz em virtude das características e propriedades associadas com a estrutura do composto inventivo e localização dos substituintes.

Para administração tópica, será geralmente desejável administrar os compostos da invenção na pele como composições ou formulações, em combinação com um portador dermatologicamente aceitável, que pode ser um sólido ou um líquido.

Portadores sólidos úteis incluem sólidos finamente divididos tais como talco, argila, celulose microcristalina, sílica, alumínio e semelhantes. Portadores líquidos úteis incluem água, álcoois ou glicóis ou misturas de água-álcool/glicol, nas quais os presentes compostos podem ser dissolvidos ou dispersos a níveis eficazes, opcionalmente com o auxílio de tensioativos não tóxicos. Adjuvantes tais como fragrâncias e agentes antimicrobianos adicionais podem ser adicionados para otimizar as propriedades para uma utilização determinada. As composições líquidas resultantes podem ser aplicadas a partir de compressas absorventes, utilizadas para impregnar ligaduras e outros curativos, ou pulverizadas na área afetada utilizando pulverizadores de tipo bomba ou aerossol.

Espessantes tais como polímeros sintéticos, ácidos gordos, sais e ésteres de ácidos gordos, álcoois gordos, celulosas modificadas ou materiais minerais modificados podem também ser empregues com portadores líquidos para formar pastas, géis, pomadas, sabões, e semelhantes extensíveis, para aplicação diretamente à pele do utilizador.

Exemplos de composições dermatologicamente úteis que podem ser utilizadas para administrar os compostos de fórmula



I à pele são conhecidos na técnica. Por exemplo, veja-se Jacquet *et al.* (documento de Patente U.S. N.º 4.608.392), Geria (documento de Patente U.S. N.º 4.992.478), Smith *et al.* (documento de Patente U.S. N.º 4.559.157) e Wortzman (documento de Patente U.S. N.º 4.820.508).

Podem ser determinadas dosagens úteis dos compostos de fórmula I através da comparação da sua atividade *in vitro*, e atividade *in vivo* em modelos animais. São conhecidos na técnica métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em ratinhos, e outros animais, a seres humanos; por exemplo, veja-se o documento de patente U.S. N.º 4.938.949.

A quantidade do composto, ou um sal ou derivado ativo do mesmo, necessária para utilização no tratamento variará não só com o sal particular selecionado mas também com a via de administração, a natureza da condição a ser tratada, e a idade e condição do paciente e será em último caso ao critério do profissional médico ou clínico assistente.

Em geral, no entanto, uma dose adequada encontrar-se-á no intervalo de desde cerca de 3 até cerca de 100 µg/kg de peso corporal por dia (por exemplo desde cerca de 6 até cerca de 96 µg/kg de peso corporal por dia ou desde cerca de 6 até cerca de 48 µg/kg de peso corporal por dia, ou desde cerca de 6 até cerca de 24 µg/kg de peso corporal por dia, ou desde cerca de 12 até cerca de 24 µg/kg de peso corporal por dia).

O composto encontra-se convenientemente formulado em forma farmacêutica unitária; por exemplo, contendo desde cerca de 80 µg até cerca de 8000 µg, convenientemente desde cerca de 480 µg até cerca de 7680 µg, convenientemente desde cerca de 480 µg até cerca de 3840 µg, e convenientemente desde cerca de 960 µg até cerca de 1920 µg. Numa forma de realização, a invenção proporciona uma composição compreendendo um composto da invenção formulado numa tal forma farmacêutica unitária.

A dose desejada pode ser convenientemente apresentada numa dose única ou como doses divididas administradas em intervalos adequados, por exemplo, como duas, três, quatro ou

mais sub-doses por dia. A sub-dose em si pode ser adicionalmente dividida, por exemplo, num número de administrações discretas livremente espaçadas; tais como inalações múltiplas a partir de um insuflador ou através da aplicação de uma pluralidade de gotas no olho.

Os compostos da invenção podem também ser administrados em combinação com outros agentes terapêuticos, por exemplo, outros agentes que são úteis para o tratamento do cancro (por exemplo cancro pancreático, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, leucemia, leucemia mieloide aguda e crónica, neuroblastoma, carcinoma da tiroide, osteossarcoma, cancro da mama, cancro da próstata, cancro esofágico, cancro da bexiga, carcinoma gástrico, cancro urotelial, glioblastoma multiforme, cancro do cólon, cancro do colo do útero, fibrossarcoma, carcinoma de células escamosas, mieloma múltiplo, colangiocarcinoma, cancro pulmonar de células não pequenas) como um sensibilizador de radiação para células cancerosas, doenças inflamatórias, doenças reumáticas, doenças autoimunes, doença poliquística renal, nefrite, sobrevivência de transplante de enxertos (rim, coração), hipertensão pulmonar, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar, neuroproteção, isquemia cerebral/lesão por reperfusão, Parkinsonismo e úlceras da córnea. Exemplos de tais agentes incluem 5-fluorouracilo, TRAIL (ligando indutor da apoptose relacionado com TNF), anticorpos ativadores de DR-4/5, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina (doxorubicina), oncovina (vincristina), paclitaxel, doxetaxel, cisplatina, carboplatina, CPT-11, bortezimib e prednisona-prednisolona. Consequentemente, numa forma de realização a invenção também proporciona uma composição compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou pelo menos um outro agente terapêutico, e um diluente ou portador farmaceuticamente aceitável. A invenção também proporciona um *kit* compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou pelo menos um outro agente terapêutico, material de embalagem, e instruções para administrar o composto de fórmula I ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e o outro agente ou agentes terapêutico(s) a um animal (por exemplo mamífero) para tratar o cancro (por exemplo cancro pancreático, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, leucemia, leucemia mieloide aguda e crónica, neuroblastoma, carcinoma da tiroide, osteossarcoma, cancro da mama, cancro da próstata, cancro esofágico, cancro da bexiga, carcinoma gástrico, cancro urotelial, glioblastoma multifforme, cancro do cólon, cancro do colo do útero, fibrossarcoma, carcinoma de células escamosas, mieloma múltiplo, colangiocarcinoma, cancro de pulmão de células não pequenas), uma doença inflamatória, uma doença reumática, uma doença autoimune, uma doença renal poliquística, nefrite, sobrevivência de transplante de enxertos (rim, coração), hipertensão pulmonar, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar, neuroproteção, isquemia cerebral/lesão por reperfusão, Parkinsonismo, úlceras da córnea ou colite. Noutra forma de realização a invenção também proporciona um *kit* compreendendo um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou pelo menos um outro agente terapêutico, material de embalagem, e instruções para administrar o composto de fórmula I ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e o outro agente ou agentes terapêutico(s) a um animal (por exemplo mamífero) para sensibilizar células cancerosas, revestir *stents* (eluição do fármaco), reparação da coluna espinal, ou para utilização em contraceção masculina e feminina em animais. Os seguintes documentos referem-se a triptólido em combinação com outros agentes terapêuticos (1. Chen, Y. W. *et al.*, *Anticancer Drugs*, 2010, 21(5), 502-13. 2. Xu B. *et al.*, *Cancer Lett.*, 2010, 291(2), 200-208. 3. Borja-Cacho, D. *et al.*, *J. Gastrointest. Surg.*, 2010, 14(2), 252-60. Westfall S. D. *et al.*, *A quimioterapia*, 2008, 54(1), 67-76. 4. Tang X. Y. *et al.*,

Postgrad. Med. J., 2007, 83(979), 338-43. 5. Panichakul T. et al., Anticancer Res. 2006, 26(1A), 259-65. 6. Pediatr. Blood Cancer, 2008, 51(6):754-97. Matsui et al. Oncogene, 2008, 27, 4603-4614. 7. Chang et al., The Journal of Biological Chemistry, 2001 276 2221-2227. 8. Westfall et al., Chemotherapy, 2008, 54(1), 67-76. 9. Carter et al., Blood, 2008, Vol. 111, N° 7, pp. 3742-3750. 10. Yang, Int. J. Mol. Med. 2008, 22(4), 489-96. 11. Fidler et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2003, 2, 855).

Um aspeto importante da invenção é que os compostos da invenção proporcionam combinações desejáveis de propriedades farmacocinéticas, propriedades físicas e vantagens terapêuticas em comparação com outras formas de profármaco de triptólido. Os compostos de profármaco de triptólido da invenção exibem combinação desejável de atributos incluindo estabilidade química, estabilidade potenciada, e libertação metabólica rápida do triptólido ativo a partir da forma de profármaco. Coletivamente, estas propriedades proporcionam efeitos terapêuticos anti-cancro melhorados. Tais efeitos incluem a inibição eficaz de células cancerosas pancreáticas através da inibição dos efeitos protetores proporcionados por parte de HSP70 no interior das células e resistência à apoptose e tratamentos.

A via química da clivagem metabólica e enzimática do profármaco de triptólido do Exemplo 1 é mostrada na Figura 2. O triptólido do composto nativo de partida (forma de não profármaco) tem características de solubilidade em água pobres. O composto preparado do Exemplo 1 exibe um elevado nível de solubilidade. Quando sujeito a clivagem e metabolismo enzimáticos, o composto do Exemplo 1 liberta finalmente a forma ativa do composto de triptólido.

Os compostos e composições da invenção podem ser empregues como um método de tratamento de cancros de tumor sólido num mamífero com necessidade de tal tratamento compreendendo administrar uma quantidade farmacologicamente eficaz de um

composto conforme descrito acima como o ingrediente ativo. Conforme utilizado no contexto de métodos de tratamento, O termo "mamífero" inclui seres humanos.

O composto e composição da invenção podem ser eficazes para inibir o crescimento de células cancerosas *in vitro* e *in vivo* de cancros expressando HSP70. Exemplos de cancros expressando HSP70 incluem cancro pancreático, cancro da mama, cancro pulmonar, cancro neuronal, leucemia, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro gástrico, cancro do fígado e glioblastoma.

Consequentemente, numa forma de realização, a invenção inclui a inibição de uma população de células cancerosas exibindo sobreexpressão da proteína de choque térmico HSP70 através da administração de um composto de fórmula I. É de importância específica para a invenção o efeito de inibição celular eficaz sobre células de cancro pancreático expressando HSP70, tais como células Mia-Paca, Panc-1 e S2VP10. Consequentemente, noutra forma de realização a invenção proporciona um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização num método de tratamento de um cancro S2 (por exemplo um cancro S2VP10 ou S2013) num mamífero (por exemplo um ser humano) compreendendo administrar um composto de fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, a um mamífero (por exemplo um ser humano).

Tanto em sistemas mamíferos *in vitro* e vivos, a enzima fosfatase alcalina converte o composto do Exemplo 1 na forma de triptólido ativo conforme demonstrado nos exemplos do presente documento. A semivida de hidrólise enzimática ( $t^{1/2}$ ) para o composto do Exemplo 1 indica uma taxa de conversão relativamente rápida e, consequentemente, libertação mais rápida da forma terapeuticamente ativa do composto.

O triptólido é utilizado para tratar uma variedade de doenças tais como doenças inflamatórias. O triptólido também foi implicado como um agente terapêutico para tratar uma

variedade de doenças. Estas doenças incluem cancro (por exemplo cancro pancreático, carcinoma dos ductos biliares, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro da mama, mieloma, cancro gástrico, cancro do fígado, glioblastoma, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, cancro pulmonar, cancro da próstata, cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células grandes, cancro renal, cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do colo do útero, tumores de linfoma), doenças autoimunes, rejeição de transplante, doença poliquística renal, doenças inflamatórias, asma, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico e nefrite. O triptólido foi também discutido no revestimento de *stents* (eluição do fármaco), reparação da coluna espinal, colite, e contraceção em animais machos e fêmeas. Consequentemente, a invenção inclui mas não está limitada à utilização dos compostos de fórmula I para tratar doenças incluindo cancro (por exemplo cancro pancreático, carcinoma dos ductos biliares, neuroblastoma, cancro do cólon, cancro da mama, mieloma, cancro gástrico, cancro do fígado, glioblastoma, cancro ovárico, cancro colorrectal, linfoma não Hodgkin, cancro pulmonar, cancro da próstata, cancro pulmonar de células pequenas, cancro pulmonar de células grandes, cancro renal, cancro esofágico, cancro do estômago, cancro do colo do útero, tumores de linfoma), doenças autoimunes, rejeição de transplante, doença poliquística renal, doenças inflamatórias, asma, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico e nefrite. Os compostos de fórmula I podem também ser utilizados para revestir *stents* (eluição do fármaco), reparação da coluna espinal, colite, e contraceção em animais machos e fêmeas.

Os seguintes documentos encontram-se orientados ao triptólido e cancro (1. AML: Carter *et al.*, Blood, 2008, 111(7), 3742-3750. 2. Carcinoma anaplásico da tiroide: Mol Pharmacol., 2009, 75(4), 812-9. 3. Cancro da bexiga: Yang *et al.* Mol. Cancer Ther., 2003, 2(1), 65-72. 4. Melanoma B16: Yang *et al.* Mol.

Cancer Ther. 2003, 2(1), 65-72. 5. Cancro da mama: Liang *et al.*, Cancer Letters, 270(2), 2008, 337-341. Liu *et al.*, Phytomedicine, 2009, 16(11), 1006-1013. 6. Cancro do colo do útero: Wang *et al.*, J. Mol. Med., 2006, 84(5), 405-15. 7. Colangiocarcinoma: Tengchaisri *et al.*, Cancer Letters, 1998, 133(2), 169-175. 8. CML: Lou *et al.*, Leukemia and Lymphoma, 2004, 45, 373-376. 9. Cólon: Tang *et al.*, Postgraduate Medical Journal 2007, 83, 338-343. 10. Cancro do esófago: Boult *et al.*, B. J. Cancer, 2008, 89, 1985-92. 11. Fibrossarcoma: Kiviharju *et al.*, Clinical Cancer Research, 2002, 8, 2666-2674. 12. Miyata *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 336(4), 1081-6. 13. Cancro gástrico: Jiang., Oncogene, 2001, 20(55), 8009-18. 14. Yang *et al.* Mol. Cancer Ther. 2003, 2(1), 65-72. 15. Glioblastoma Multiforme: Lin *et al.*, J. Int. Med. Res., 2007, 35(4), 490-6. 16. Kapoor, Int. J. Mol. Med., 2008, 22(4), 489-96. 17. Células Epiteliais Prostáticas Humanas: Kiviharju *et al.*, 2002., Clinical Cancer Research, 8, 2666-2674. 18. Leucemias incluindo AML: Carter *et al.*, Blood, 2006, 108(2), 630-7. 19. Mieloma múltiplo: Yinjun *et al.*, Leuk. Res. 2005 29(1), 99-105. 20. Neuroblastoma: Antonoff *et al.*, Surgery, 2009, 146(2), 282-90. 21. Linfoma não Hodgkin: Zhang *et al.*, Acta Pharmacologica Sinica, 2006, 27, 1438-1446. 22. Cancro pulmonar de células não pequenas: Chang *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 276, 2221-2227. 23. Osteossarcoma: Wang *et al.*, Pediatr. Blood Cancer. 2008, 51(6), 754-9. 24. Cancro ovárico: Westfall *et al.*, Chemotherapy, 2008, 54(1), 67-76. 25. Cancro pancreático: Wang *et al.*, J. Mol. Med. 2006, 84(5), 405-15., Zhou *et al.*, World J., Gastroenterol, 2008, 14(10), 1504-1509., Wang *et al.* Clinical Cancer Research 2007, 13, 4891., Phillips, Saluja *et al.*, Cancer Res., 2007, 67(19), 9407-16. Carcinoma de células escamosas; Miyata *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 336(4), 1081-6. 26. Carcinoma da tiroide: Zhu *et al.*, Oncol Rep., 2009, 22(6), 1397-401. 27.

Cancro do colo do útero: Miyata *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 336(4), 1081-6. 28. Cancro urotelial: Matsui *et al.*, Oncogene, (2008) 27, 4603-4614).

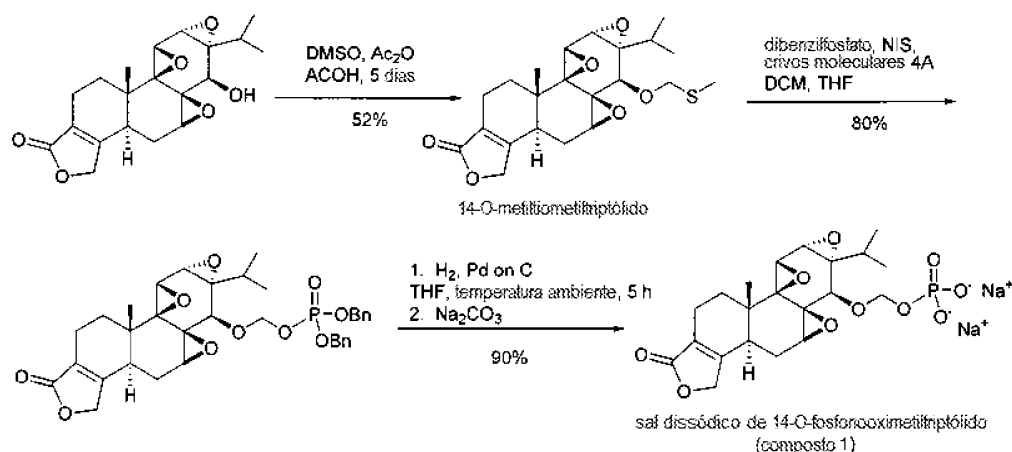
Os seguintes documentos encontram-se orientados ao triptólido e doenças para além do cancro (1. Doenças múltiplas: D Qui *et al.*, Drug R & D, 2003, 4, 1-16.

2. Transplante de órgãos: Chen, Leukemia and Lymphoma, 2001, 42, 253-256.

3. Transplante renal: Zhang *et al.*, Journal of Ethnopharmacology, 2009, 125(1), 41-46. 4. Sobrevivência de transplante de enxertos (pele): Yang *et al.* Int. J. Immunopharmac., 1992, 14, 963-969. 5. Doença de enxerto contra hospedeiro: Chen *et al.*, Transplantation, 2000, 70, 1442-1447. 6. Doenças inflamatórias e autoimunes: P.E. Lipsky *et al.*, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1997, 5, 713-723. 7. Encefalomielite autoimune: Kizelsztejn *et al.* Journal of Neuroimmunology, 2009, 217, 28-37. 8. Isquemia cerebral/lesão por reperfusão: Wei *et al.*, Neural Regeneration Research, 2007, 2(3), 156-61. 9. Colite: Wei *et al.*, Clin. Immunol. 2008, 129, 211-218. 10. Contraceção em machos e fêmeas: Hikim *et al.*, Journal of Andrology, 2000, 21, 431-437., Huynh *et al.*, Journal of Andrology, 2000, 21, 689-699., Wang *et al.*, Asian Journal of Andrology, 1999, 1, 121-125., Lue *et al.*, Journal of Andrology, 1998, 19, 479-486. 11. Úlcera da córnea: Lu *et al.* Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2006, 47, 3796-3800. 12. Inflamação pulmonar: Krishna, *et al.*, 2001, Am. J. Pathol., 2001, 158(3), 997-1004. 13. Nefrite: Tao *et al.*, Arthritis Rheum. 2008, 58(6), 1774-83. 14. Parkinsonismo e neuroproteção: Zhou *et al.*, Neurobiology of Disease, 2005, 18, 441-449. 15. Doença poliquística renal (PKD): Leuenroth *et al.*, PNAS, 2007, 104, 4389-4394. 16. Reparação da coluna espinal: Su *et al.*, Glia 2010, 58, 901-915. 17. Revestimento de stents: Q. Luo 2005, pedido de Patente 20050043788).

A invenção será em seguida ilustrada através dos seguintes Exemplos não limitantes.





Exemplo 1: Síntese de sal dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido (composto 1).

A uma solução de éster dibenzílico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido (50 mg, 0,08 mmol) em tetrahidrofurano (5 ml) foi adicionado paládio sobre carbono (10%, 10 mg). A mistura foi agitada à temperatura ambiente sob hidrogénio (1 atm) durante um período de 3 horas. O catalisador foi removido por meio de filtração através de CELITE™, e o filtrado foi tratado com uma solução de hidrato de carbonato de sódio (8,9 mg em 3 ml de água, 0,076 mmol). O tetrahidrofurano foi evaporado sob pressão reduzida e a solução de água residual foi extraída com éter (3x3 ml). A camada aquosa foi evaporada até à secura e o sólido resultante foi seco durante a noite *in vacuo*, lavado com éter e novamente seco *in vacuo* para proporcionar sal dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido (35 mg, rendimento de 90%) como um pó branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 0,81 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,00 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,03 (s, 3H), 1,35 (m, 1H), 1,50 (m, 1H), 2,00 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 14,7 e J<sub>2</sub> = 13,4 Hz), 2,08-2,61 (m, 4H), 2,85 (m, 1H), 3,63 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 3,81 (d, 1H, J = 3,1 Hz), 3,86 (s, 1H), 4,12 (d, 1H, J = 3,1 Hz), 4,92 (m, 2H), 5,07 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 12,9, 16,0, 16,3, 16,5, 22,3, 25,5, 28,9, 35,2, 39,8, 55,4, 56,1, 61,0, 61,5, 65,1, 65,5, 71,9, 77,6, 91,7, 123,8, 164,2, 177,3 ppm; HRMS calculado para (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>P) m/z necessária [M+1]<sup>+</sup> 469,1264, m/z encontrada 469,1267.

Preparação de éter dibenzílico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido

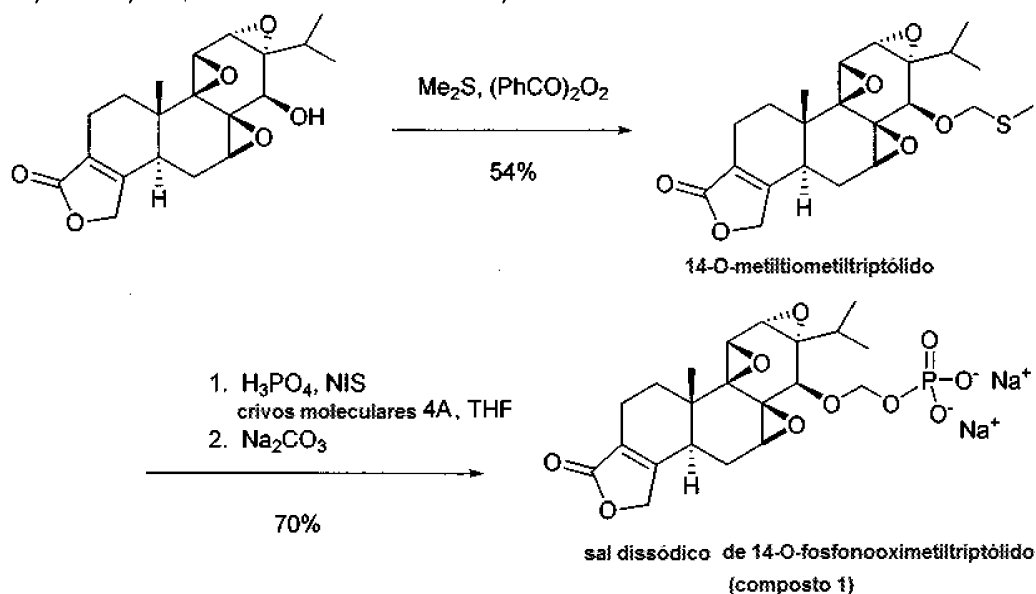
Etapa 1:

Uma solução de triptólido (100 mg, 0,29 mmol) em ácido acético (5 ml, 87,5 mmol) e anidrido acético (1 ml, 10,5 mmol) em DMSO (1,5 ml, 21,4 mmol) foi preparada e agitada à temperatura ambiente durante um período de 5 dias para proporcionar o intermediário 14-O-metiltiometiltriptólido. A mistura de reação foi então vertida em água (100 ml) e neutralizada com NaHCO<sub>3</sub> sólido, adicionado em porções. A mistura foi extraída com acetato de etilo (50 ml x 3), e o extrato orgânico combinado foi seco sobre sulfato de sódio anidro e concentrado para fornecer o produto como um óleo. Cromatografia de gel de sílica *flash* (3:2 hexano/acetato de etilo) proporcionou 14-O-metiltiometiltriptólido a 52% (60 mg) como uma espuma branca. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,82 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,00 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,09 (s, 3H), 1,20 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,93 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 14,7 e J<sub>2</sub> = 13,4 Hz), 2,19 (s, 3H), 2,10-2,42 (m, 4H), 2,68 (m, 1H), 3,24 (d, 1H, J = 5,5 Hz), 3,51 (d, 1H, J = 3,1 Hz), 3,67 (s, 1H), 3,79 (d, 1H, J = 3,1 Hz), 4,68 (m, 2H), 4,93 (d, 1H, J = 11,8 Hz), 5,07 (d, 1H, J = 11,8 Hz) ppm; <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13,6, 14,8, 16,8, 17,0, 17,1, 23,4, 26,3, 29,5, 35,8, 40,4, 54,5, 55,0, 58,0, 61,5, 63,9, 64,4, 69,9, 75,8, 76,7, 125,5, 160,2, 173,2 ppm; HRMS calculado para (C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>SN<sub>a</sub>) m/z necessária [M+Na]<sup>+</sup> 443,1505, m/z encontrada 443,1507.

Etapa 2:

Uma solução de 14-O-metiltiometiltriptólido (50 mg, 0,12 mmol) em cloreto de metileno seco (2 ml) sob uma atmosfera de N<sub>2</sub> foi combinada com crivos moleculares 4A ativados em pó (50 mg), seguido pela adição de uma mistura de fosfato dibenzílico (40 mg, 0,14 mmol) e N-iodosuccinimida (32 mg, 0,14 mmol) em tetrahidrofurano (2 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante um período de 5 h, filtrada, e diluída com cloreto de metileno (20 ml). A solução resultante

foi lavada com uma solução de tiosulfato de sódio (2 ml, solução a 1M), uma solução saturada de bicarbonato de sódio, salmoura, seca sobre sulfato de sódio, filtrada, e concentrada *in vacuo*. O resíduo oleoso foi purificado através de cromatografia *flash* em gel de sílica (1:2 hexano/acetato de etilo) para dar éster dibenzílico del4-O-fosfonooximetiltriptólido (62 mg, rendimento de 80%) como uma espuma branca.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,72 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,89 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 1,05 (s, 3H), 1,27 (m, 1H), 1,48 (m, 1H), 1,82 (dd, 1H,  $J = 14,7$  e  $J_2 = 13,4$  Hz), 2,03-2,35 (m, 4H), 2,64 (m, 1H), 3,14 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz), 3,46 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,65 (s, 1H), 3,76 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 4,65 (m, 2H), 5,02 (m, 4H), 5,27 (m, 1H), 5,47 (m, 1H), 7,34 (m, 10H) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13,6, 16,8, 17,0, 23,3, 26,2, 29,62, 29,67, 35,7, 40,3, 54,7, 55,2, 59,3, 61,1, 63,6, 64,0, 69,36, 69,39, 69,42, 69,45, 69,9, 78,2, 92,9, 93,0, 125,5, 127,9, 128,0, 128,6, 135,5, 135,6, 160,1, 173,2 ppm; HRMS calculado para  $(\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{O}_{10}\text{PNa})$  m/z requerida  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  673,2179, m/z encontrada 673,2176.



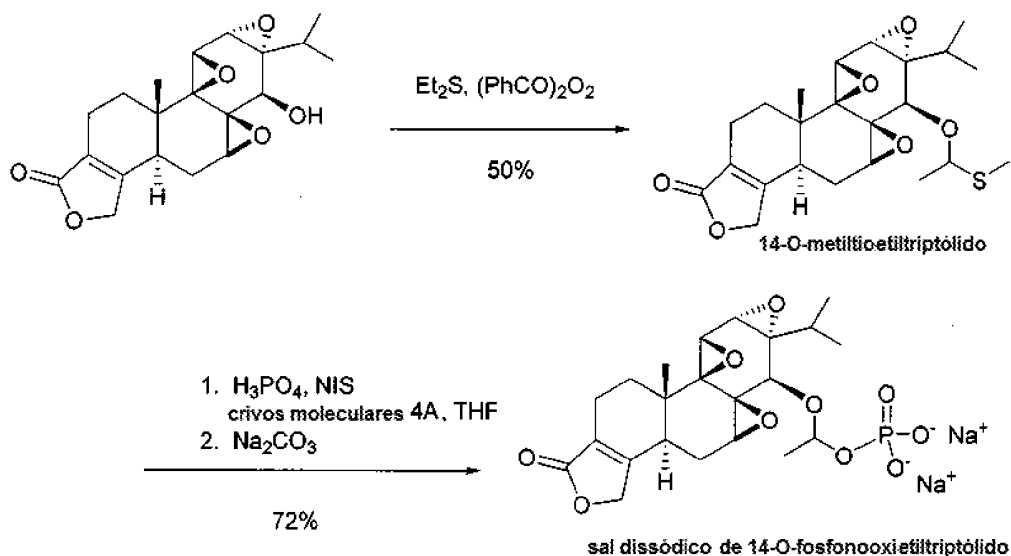
Exemplo 2: Síntese de sal dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido (composto 1).

A uma solução contendo 14-O-metiltiometiltriptólido (50

mg, 0,12 mmol), ácido fosfórico (82 mg, 0,84 mmol), e crivos moleculares (4 A, 0,45 g) em THF (10 ml) a 0 °C foi adicionada N-iodosuccinimida (41 mg, 0,18 mmol), e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura de reação foi filtrada através de Celite, e os sólidos foram lavados com THF. O filtrado foi tratado com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a 1M até ser incolor e o filtrado foi tratado com uma solução de carbonato de sódio (13 mg em 3 ml de água, 0,12 mmol). O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e a solução de água residual foi extraída com éter (3x3 ml). A camada aquosa foi evaporada até à secura e o resíduo resultante foi purificado através de cromatografia (C18), eluindo com um gradiente de metanol a 0-100% em água para dar sal dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido (43 mg, rendimento de 70%) como um pó incolor.

Preparação de 14-O-metiltiometiltriptólido.

A uma solução de triptólido (100 mg, 0,28 mmol) e sulfureto de metilo (0,16 ml, 2,24 mmol) em acetonitrilo (10 ml) a 0 °C foi adicionado peróxido de benzoílo (0,27 g, 1,12 mmol) em quatro porções iguais durante 20 min, e a mistura foi então agitada a 0 °C durante 1 h e posteriormente à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura foi diluída com acetato de etilo e lavada com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% e posteriormente salmoura. A fase orgânica foi seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtrada, e evaporada. O resíduo foi purificado através de cromatografia *flash* em gel de sílica (1:1 hexano/acetato de etilo) para fornecer 14-O-metiltiometiltriptólido (63 mg, rendimento de 54 %) como um pó incolor.



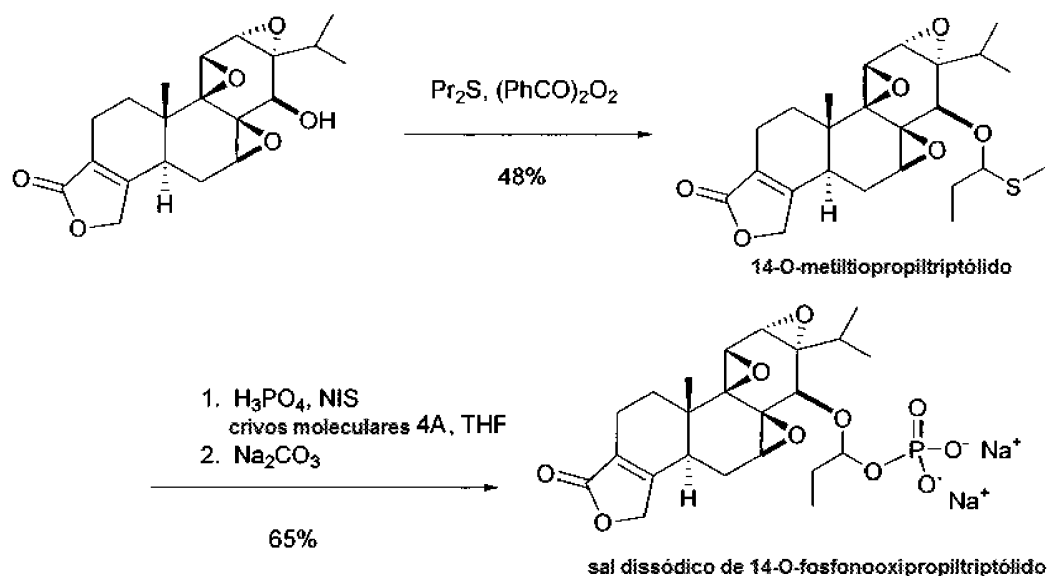
Exemplo 3: Síntese de sal dissódico de 14-O-fosfonooxietiltriptólido.

A uma solução contendo 14-O-metiltioetiltriptólido (52 mg, 0,12 mmol), ácido fosfórico (82 mg, 0,84 mmol), e crivos moleculares (4 A, 0,45 g) em THF (10 ml) a 0 °C foi adicionada N-iodosuccinimida (41 mg, 0,18 mmol), e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura de reação foi filtrada através de Celite, e os sólidos foram lavados com THF. O filtrado foi tratado com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a 1 M até ser incolor e o filtrado foi tratado com uma solução de carbonato de sódio (13 mg em 3 ml de água, 0,12 mmol). O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e a solução de água residual foi extraída com éter (3x3 ml). A camada aquosa foi evaporada até à secura e o resíduo resultante foi purificado através de cromatografia (C18), eluindo com um gradiente de metanol a 0-100% em água para dar sal dissódico de 14-O-fosfonooxietiltriptólido (46 mg, rendimento de 72%) como um pó incolor.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0,68 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,70 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 1,03 (s, 3H), 1,21 (m, 1H), 1,57 (d, 3H,  $J = 5,3$  Hz), 1,58 (m, 1H), 1,94 (dd, 1H,  $J_1 = 14,7$  e  $J_2 = 13,4$  Hz), 2,08-2,61 (m, 4H), 2,62 (m, 1H), 3,27 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz), 3,45 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,72 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,79 (s, 1H), 4,63 (m, 2H), 6,43 (q, 1H,

$J = 5,3$  Hz) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  13,5, 16,9, 17,0, 17,1, 21,4, 23,5, 26,8, 29,5, 35,9, 40,3, 54,0, 55,1, 59,4, 61,2, 63,6, 64,2, 69,8, 75,8, 76,5, 91,6, 125,6, 164,2, 177,2 ppm; HRMS calculado para ( $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{P}$ )  $m/z$  requerida  $[\text{M}+1]^+$  483,1137,  $m/z$  encontrada 483,1134.

Preparação de 14-O-metiltioetiltriptólido.

A uma solução de triptólido (100 mg, 0,28 mmol) e sulfureto de etilo (0,24 ml, 2,24 mmol) em acetonitrilo (10 ml) a 0 °C foi adicionado peróxido de benzoílo (0,27 g, 1.12 mmol) em quatro porções iguais durante 20 min, e a mistura foi então agitada a 0 °C durante 1 h e posteriormente à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura foi diluída com acetato de etilo e lavada com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% e posteriormente salmoura. A fase orgânica foi seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e evaporada. O resíduo oleoso foi purificado através de cromatografia *flash* em gel de sílica (1:1 hexano/acetato de etilo) para dar 14-O-metiltioetiltriptólido (60 mg, rendimento de 50 %) como um pó incolor.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,68 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,70 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 1,04 (s, 3H), 1,20 (m, 1H), 1,57 (d, 3H,  $J = 5,3$  Hz), 1,59 (m, 1H), 1,88 (dd, 1H,  $J_1 = 14,7$  e  $J_2 = 13,4$  Hz), 2,19 (s, 3H), 2,06–2,27 (m, 4H), 2,62 (m, 1H), 3,24 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz), 3,42 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,70 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,73 (s, 1H), 4,61 (m, 2H), 5,02 (q, 1H,  $J = 5,3$  Hz) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13,6, 14,8, 16,9, 17,0, 17,1, 21,0, 23,5, 26,4, 29,6, 35,8, 40,5, 54,0, 55,2, 59,4, 61,3, 63,7, 64,2, 69,9, 75,8, 76,7, 125,6, 160,2, 173,2 ppm; HRMS calculado para ( $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{SNa}$ )  $m/z$  requerida  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  457,1763,  $m/z$  encontrada 457,1765.



Exemplo 4: Síntese de sal dissódico de 14-O-fosfonooxipropiltriptólido.

A uma solução contendo 14-O-metiltiopropiltriptólido (54 mg, 0,12 mmol), ácido fosfórico (82 mg, 0,84 mmol), e crivos moleculares (4 A, 0,45 g) em THF (10 ml) a 0 °C foi adicionada N-iodosuccinimida (41 mg, 0,18 mmol), e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura de reação foi filtrada através de Celite, e os sólidos foram lavados com THF. O filtrado foi tratado com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a 1M até ser incolor e o filtrado foi tratado com uma solução de carbonato de sódio (13 mg em 3 ml de água, 0,12 mmol). O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e a solução de água residual foi extraída com éter (3x3 ml). A camada aquosa foi evaporada até à secura e o resíduo resultante foi purificado através de cromatografia (C18), eluindo com um gradiente de metanol a 0-100% em água para proporcionar sal dissódico de 14-O-fosfonooxipropiltriptólido (43 mg, rendimento de 65%) como um pó incolor.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0,66 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,68 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,99 (t, 3H,  $J = 5,3$  Hz), 1,03 (s, 3H), 1,20 (m, 1H), 1,53 (m, 1H), 1,90 (dd, 1H,  $J_1 = 14,7$  e  $J_2 = 13,4$  Hz), 2,04-2,66 (m, 4H), 2,65 (m, 3H), 3,27 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz), 3,49 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,71 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,78 (s, 1H), 4,69 (m, 2H), 6,31 (q,

$^1\text{H}$ ,  $J = 5,3$  Hz) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,55, 13,5, 16,2, 16,9, 17,2, 20,8, 23,2, 26,1, 28,4, 34,7, 38,5, 54,1, 55,0, 59,0, 61,3, 62,5, 63,9, 68,5, 75,4, 76,4, 91,9, 125,7, 160,1, 174,5 ppm; HRMS calculado para ( $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_{10}\text{P}$ )  $m/z$  requerida  $[\text{M}+1]^+$  497,1294,  $m/z$  encontrada 497,1292

Preparação de 14-O-metiltiopropiltriptólido.

A uma solução de triptólido (100 mg, 0,28 mmol) e sulfureto de propilo (0,32 ml, 2,24 mmol) em acetonitrilo (10 ml) a 0 °C foi adicionado peróxido de benzoílo (0,27 g, 1.12 mmol) em quatro porções iguais durante 20 min, e a mistura foi agitada a 0 °C durante 1 h e posteriormente à temperatura ambiente durante 1 h. A mistura foi diluída com acetato de etilo e lavada com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% e posteriormente salmoura. A fase orgânica foi seca sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtrada, e evaporada. O resíduo foi purificado através de cromatografia *flash* em gel de sílica (1:1 hexano/acetato de etilo) para dar 14-O-metiltioetiltriptólido (60 mg, rendimento de 48 %) como um pó incolor.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,65 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,67 (d, 3H,  $J = 6,8$  Hz), 0,99 (t, 3H,  $J = 5,3$  Hz), 1,01 (s, 3H), 1,20 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,88 (dd, 1H,  $J_1 = 14,7$  e  $J_2 = 13,4$  Hz), 2,18 (s, 3H), 2,01-2,26 (m, 4H), 2,62 (m, 3H), 3,24 (d, 1H,  $J = 5,5$  Hz), 3,42 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,70 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 3,73 (s, 1H), 4,61 (m, 2H), 5,03 (q, 1H,  $J = 5,3$  Hz) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,68, 13,5, 14,6, 16,2, 17,0, 17,2, 21,4, 23,2, 26,1, 28,9, 34,7, 39,5, 54,1, 55,6, 59,0, 61,3, 63,5, 64,0, 69,5, 75,1, 76,4, 125,1, 160,9, 173,5 ppm; HRMS calculado para ( $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{SNa}$ )  $m/z$  requerida  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  471,1920,  $m/z$  encontrada 471,1918.

#### Exemplo 5: Propriedades químicas dos compostos de fórmula I.

Foram avaliadas as propriedades químicas dos compostos da invenção. Foi medida a solubilidade aquosa e a estabilidade química do composto. Utilizando uma solução do composto do Exemplo 1 em pH ajustado a 7,4, foi determinada a solubilidade à temperatura ambiente como sendo 61,4 mg/ml. A estabilidade dos compostos da invenção foi avaliada em soluções de tampão



Tris (pH 7,4) e tampão de Borato (pH 7,4) à temperatura ambiente. Após um período de 1 (um) mês, não foi observada qualquer degradação do composto do Exemplo 1. Os resultados encontram-se resumidos no seguinte quadro.

Quadro 1. Propriedades Físico-Químicas de Compostos de Fórmula

I				
Composto	Solubilidade (mg/ml) tampão Tris, temp. ambiente	Estabilidade Química ( $t^{1/2}$ ) tampão Tris, temp. ambiente	Estabilidade Química ( $t^{1/2}$ ), tampão de borato, temp. ambiente	Hidrólise Enzimática ( $t^{1/2}$ ), Fosfatase Alcalina, 37 °C
Composto do Exemplo 1/2	61,4	*	*	2 min.
Composto do Exemplo 3	>50	*	*	9 min.
Composto do Exemplo 4	>50	*	*	17 min.
* Não foi observada qualquer degradação após um mês.				

Exemplo 6: Conversão enzimática *in vitro* do composto 1

O composto 1 é convertido na forma de triptólido ativo através da ação da enzima fosfatase alcalina. Foi realizada uma experiência *in vitro* para estudar a bioconversão do composto de profármaco de triptólido da invenção. A bioconversão *in vitro* foi simulada utilizando fosfatase alcalina (a partir de mucosa intestinal de bovino, Type VII-S disponível da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) em tampão de glicina (pH 9,8).

As fosfatases alcalinas são um grupo de enzimas encontradas primariamente no fígado (isoenzima ALP-1) e osso (isoenzima ALP-2), com pequenas quantidades sendo produzidas por parte do revestimento celular do intestino delgado

(isoenzima ALP-3), placenta e rins. As fosfatases alcalinas separam o fósforo para criar um pH alcalino. Outras enzimas para além da fosfatase alcalina podem contribuir igualmente à hidrólise *in vivo*.

A partir da Figura 3, pode ser observado que as quantidades decrescentes da forma de profármaco de triptólido coincidiram com as quantidades proporcionalmente crescentes de triptólido libertado de forma ativa. Além disso, foi observado que a conversão ocorreu sobre um período de tempo relativamente curto, com a maioria da conversão tendo lugar sobre o período de tempo inicial de 10 minutos.

A constante de degradação de primeira ordem foi calculada ajustando a concentração restante frente ao tempo de incubação. A semivida de degradação ( $t^{1/2}$ ) do composto 1 foi determinada como sendo 2 minutos.

Exemplo 7: Estudo de viabilidade celular *in vitro* comparativo.

Foi levada a cabo uma experiência para avaliar a viabilidade celular *in vitro* comparativa utilizando triptólido, o profármaco de triptólido (composto 1), e controlo (sem triptólido ou a forma de profármaco). A viabilidade celular foi determinada utilizando o *kit* Dojindo Cell Counting Kit-8 (disponível da Dojindo Laboratories, Rockville, Maryland). Células cancerosas pancreáticas foram semeadas numa placa de 96 poços a  $2 \times 10^3$  células por poço e deixadas aderir durante a noite. As células foram então tratadas com o profármaco de triptólido (composto 1) da invenção e triptólido nativo a várias concentrações durante períodos de 24 horas e 48 horas. Foi adicionado substrato de tetrazólio (10  $\mu$ l) a cada poço da placa. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, após o qual foi medida a absorvância a 460 nm. Cada experiência foi realizada por triplicado e repetida três vezes independentes.

O efeito do composto 1 e triptólido na viabilidade de células cancerosas pancreáticas foi observado após incubação em meio contendo o triptólido do profármaco a concentrações

variando desde 50 até 200 nmol/l a 24 horas e 48 horas. Os dados foram recolhidos e convertidos nos gráficos da Figura 4 (Viabilidade Celular Mia-Paca a 48 horas), Figura 5 (Viabilidade Celular Panc-1 a 24 e 48 horas) e Figura 6 (Viabilidade Celular S2VP10 a 24 e 48 horas).

Como pode ser observado a partir de cada um dos dados e figuras acima, a presença do profármaco de triptólido e fosfatase alcalina e triptólido de forma nativa reduziram significativamente a viabilidade celular pancreática *in vitro* de uma forma dependente de tempo e dose.

Exemplo 8: Estudo *in vivo* comparativo de composto 1 em ratinhos.

Foram obtidos trinta ratinhos nus da estirpe atímica nu/nu a partir do National Cancer Institute (NCI) (Rockville, Maryland) e mantidos numa instalação RAR. Os ratinhos foram anestesiados de acordo com as recomendações da instalação RAR utilizando quetamina a 75-200 mg/kg e xilazina a 4-8 mg/kg. Foi feita uma pequena incisão de 3 mm no lado esquerdo da parede abdominal e o baço foi puxado para fora com fórceps o suficiente para expor e ter acesso ao pâncreas. Foi preparado meio celular MiaPaca-2 e mantido em gelo até à administração aos ratinhos. Em cada um dos ratinhos, foram injetadas 1 milhão de células MiaPaca-2 suspensas em MATRIGEL™ (disponível da Becton-Dickinson Corporation, Franklin Lakes, Nova Jérsei) na cauda do pâncreas (identificada através da sua união anatómica com o baço) utilizando uma seringa Hamilton. Após a administração das células, a seringa foi mantida fixa durante 5-10 segundos adicionais para deixar assentar o MATRIGEL™. O baço foi recolocado novamente na cavidade abdominal, e a parede abdominal foi fechada através de sutura com *vicryl* de forma contínua. A pele foi aposta e fechada utilizando agrafos cirúrgicos. Os ratinhos foram então transferidos para um tapete térmico até à sua recuperação completa anteriormente a serem devolvidos à jaula. Foi administrada medicação pós-operatória (buprenorfina a 0,1 mg/kg) por via intraperitoneal imediatamente após a recuperação completa da anestesia para

prevenir depressão respiratória e posteriormente administrada cada 12 horas durante 2 dias. Os agraços cirúrgicos foram removidos dos ratinhos após 7 dias da cirurgia.

Os ratinhos foram então randomizados em 3 grupos, cada grupo tendo 10 ratinhos. Os grupos foram conforme segue: grupo de controlo, grupo de triptólido e o grupo de profármaco de triptólido (composto 1). O grupo de controlo consistiu em ratinhos aos quais foi injetado por via intraperitoneal veículo DMSO. Aos sujeitos do grupo de triptólido foi injetado triptólido a 0,2 mg/mg dissolvido em DMSO e diluído com solução salina de tampão fosfato até um volume de 100 µl, as injeções intraperitoneais sendo diariamente durante um período de 60 dias. Aos sujeitos do composto 1 foi injetado por via intraperitoneal diariamente o composto a 0,28 mg/kg dissolvido em solução salina de tampão fosfato diluído até um volume de 100 µl.

Os ratinhos foram sacrificados sob anestesia ao fim dos tratamentos de 60 dias. Foram recolhidas amostras (sangue, pulmão, baço, fígado, rins e tecido tumoral), e foram medidos o volume e a peso tumoral e comparados entre os diferentes grupos. Foram realizadas observações sobre o crescimento loco-regional e o crescimento do cancro.

A Figura 8 (fotografias do grupo de controlo), Figura 9 (fotografias do grupo de triptólido) e Figura 10 (fotografias do grupo de profármaco de triptólido do Exemplo 1), são uma coleção de fotografias mostrando o crescimento tumoral final de cada um dos grupos de ratinhos da experiência *in vivo*. A Figura 11 é uma fotografia da coleção de tumores excisados tomados a partir de ratinhos de cada um dos grupos e alinhado lado a lado numa fila correspondente a cada grupo.

Os tumores excisados a partir do grupo de controlo não tratado foram consideravelmente maiores aos 60 dias que aqueles excisados a partir dos outros dois grupos, mostrando crescimento agressivo continuado das células tumorais pancreáticas. Em contraste, o grupo de composto do Exemplo 1

exibiu inibição considerável do crescimento tumoral pancreático em comparação com o grupo de controlo não tratado, e inibição celular tumoral eficaz substancial em comparação com o triptólido de forma nativa. Com referência agora à Figura 11 e Figura 12, que mostram peso tumoral e volume tumoral comparativos entre os três grupos respetivamente, os tumores do grupo de controlo foram consideravelmente maiores tanto em termos de peso (g) como de volume (cm<sup>3</sup>) em comparação com os dados dos tumores dos grupos de triptólido e profármaco de triptólido (composto 1).

Consequentemente, quando administrado a um mamífero vivo *in vivo*, o composto de profármaco de triptólido da invenção pode inibir eficazmente o crescimento tumoral e tem eficácia de efeito inibidor comparável com o triptólido na forma de não profármaco nativa. Conforme pode ser observado a partir dos dados e figuras acima, o crescimento tumoral de cancro pancreático nos ratinhos tratados com triptólido nativo e profármaco de triptólido (composto 1) durante 60 dias exibiu volume tumoral significativamente reduzido em comparação com o grupo de controlo não tratado. Além disso, foi significativo que tanto nos sujeitos do grupo de triptólido como de profármaco de triptólido, não houve impacto significativo aparente no peso corporal nem sinais aparentes de toxicidade nos sujeitos. Consequentemente, os compostos da invenção podem proporcionar inibição tumoral e inibir o crescimento de células cancerosas e em particular o crescimento de células cancerosas pancreáticas. Adicionalmente, os compostos da invenção poderiam também proporcionar a base para tratamento eficaz para inibir o cancro pancreático com poucos efeitos secundários tóxicos em mamíferos vivos.

Exemplo 9: Regressão tumoral induzida por composto 1 num modelo de ratinho ortotópico de cancro pancreático (estudo de dosagem de 60 dias).

Células MIA PaCa-2 ( $1 \times 10^6$ ) foram suspensas em matrigel e injetadas na cauda do pâncreas de ratinhos nus fêmea de 4-6

semanas de idade. Dez dias após a implantação celular, foram injetadas aos ratinhos por via intraperitoneal concentrações indicadas de composto 1 (0,1, 0,15, 0,3, 0,6 ou 0,9 mg/kg) ou triptólido QD a 0,2 mg/kg durante 60 d. Aos ratinhos de controle foi injetada solução salina BID. O tratamento foi interrompido após 60 d e os ratinhos foram observados durante outros 28 d anteriormente a serem sacrificados. Foram recolhidas amostras de tumor, se alguma, a partir destes ratinhos, e foram medidos o volume e a peso tumoral. Se a carga tumoral excedeu as diretrizes de cuidado animal da Universidade de Minnesota, os ratinhos foram sacrificados em pontos de tempo anteriores e os seus tumores foram recolhidos. A Figura 13 ilustra a sobrevivência potenciada de ratinhos tratados com o composto 1 e triptólido frente a veículo. A Figura 14 ilustra a sobrevivência potenciada de ratinhos tratados com o composto 1 frente a veículo. A Figura 15 mostra a carga tumoral diminuída, conforme medido através do volume tumoral ou do peso tumoral, de ratinhos tratados com composto 1 frente a ratinhos de controle.

Exemplo 10: Regressão tumoral induzida pelo composto 1 num modelo de ratinho ortotópico de cancro pancreático (estudo de dosagem de 21 dias).

$1 \times 10^6$  células de S2013, uma linha de células cancerosas pancreáticas altamente metastática, foram suspensas em matrigel e injetadas na cauda do pâncreas de ratinhos nus fêmea de 4-6 semanas de idade. Sete dias após a implantação celular, foram injetados aos ratinhos por via intraperitoneal 0,42 mg/kg de composto 1 durante 21 d. O tratamento foi interrompido após 21 d, e os ratinhos foram sacrificados. Foram recolhidas amostras de tumor, se existia algum, a partir destes ratinhos, e foram medidos o volume e o peso tumoral. Se a carga tumoral excedeu as diretrizes de cuidado animal da Universidade de Minnesota, os ratinhos foram sacrificados e os seus tumores foram recolhidos num ponto de tempo anterior. Aos ratinhos de controle foi injetada solução salina QD. A Figura 16 mostra a

carga tumoral diminuída, conforme medido através do volume tumoral ou do peso tumoral, de ratinhos tratados com composto 1 frente a ratinhos de controlo.

Exemplo 11: Regressão tumoral induzida por composto 1 num modelo de ratinho subcutâneo de colangiocarcinoma.

Células SkChA-1 ( $5 \times 10^5$ ) foram suspensas em matrigel e injetadas por via subcutânea no flanco esquerdo de ratinhos nus fêmea de 4-6 semanas de idade. Sete dias após a implantação celular, foram injetados aos ratinhos por via intraperitoneal 0,3 mg/kg de composto 1 BID durante 25 dias. O tratamento foi interrompido neste ponto, e os ratinhos foram sacrificados. Foram recolhidas amostras de tumor, se existia algum, a partir destes ratinhos, e foram medidos o volume e o peso tumoral. Se a carga tumoral excedeu as diretrizes de cuidado animal da Universidade de Minnesota, os ratinhos foram sacrificados e os seus tumores foram recolhidos num ponto de tempo anterior. Aos ratinhos de controlo foi injetada solução salina BID. A Figura 17 mostra a carga tumoral diminuída, conforme medido através do volume tumoral ou do peso tumoral, de ratinhos tratados com composto 1 frente a ratinhos de controlo.

Exemplo 12: Regressão tumoral induzida por triptólido num modelo de ratinho ortotópico de neuroblastoma.

Células de neuroblastoma N2 ( $1 \times 10^6$ ) foram suspensas em matrigel e injetadas no espaço intraperitoneal esquerdo de ratinhos imunocompetentes A/J de 4-6 semanas de idade. Três dias após a implantação celular, foram injetados aos ratinhos 0,4 mg/kg de triptólido por via intraperitoneal durante 21 dias. O tratamento foi interrompido neste ponto, e os ratinhos foram sacrificados. Foram recolhidas amostras de tumor, se existia algum, a partir destes ratinhos, e foram medidos o volume e o peso tumoral. Se a carga tumoral excedeu as diretrizes de cuidado animal da Universidade de Minnesota, os ratinhos foram sacrificados e os seus tumores foram recolhidos num ponto de tempo anterior. Foi injetado aos ratinhos de controlo DMSO durante 21 dias. A Figura 18 mostra a carga

tumoral diminuída nos ratinhos tratados com triptólido frente aos ratinhos de controlo conforme medido através do volume tumoral e peso tumoral.

Exemplo 13: Morte celular induzida por triptólido e ativação de caspase-3 em células de neuroblastoma

Células de neuroblastoma N2a e SKNSH foram tratadas com triptólido, resultando em morte celular dependente da dose e tempo em N2a, com mais de 50% das células mortas com triptólido a 62,5 nM às 24 horas e aproximadamente 85% das células mortas com triptólido a 250 nM às 48 horas (Figura 19). Para confirmar a hipótese de que o triptólido resulta em morte de células de neuroblastoma através de uma via apoptótica, foi medida a atividade de caspase-3 como um marcador da apoptose. Em ambas linhas celulares, verificaram-se aumentos da atividade de caspase-3 com doses mais elevadas de triptólido e duração mais longa da terapêutica. O tratamento com triptólido foi associado com aumentos dependentes da dose e tempo dos níveis de atividade de caspase-3 (Figura 20). Estes resultados sugerem que a morte celular mediada por triptólido ocorre através da indução da apoptose.

Exemplo 14: Os seguintes quadros ilustram formas farmacêuticas representativas, contendo um composto de fórmula I ("Composto X"), para utilização profilática ou terapêutica em seres humanos.

(i) Comprimido 1	mg/comprimido
Composto X=	0,5
Lactose	77,5
Povidona	15,0
Croscarmellose sódica	12,0
Celulose microcristalina	92,5
Estearato de magnésio	<u>3,0</u>
	185
(ii) Comprimido 2	mg/comprimido
Composto X=	1,0
Celulose microcristalina	410,0
Amido	50,0
Glicolato de amido de sódio	15,0
Estearato de magnésio	<u>5,0</u>



481

iii) Cápsula	mg/cápsula
Composto X=	2,0
Dióxido de silício coloidal	1,5
Lactose	465,5
Amido pregelatinizado	120,0
Estearato de magnésio	3,0
	468

(iv) Injeção 1 (1 mg/ml)	mg/ml
Composto X=	0,5
Fosfato de sódio dibásico	12,0
Fosfato de sódio monobásico	0,7
Cloreto de sódio	4,5
Solução de hidróxido de sódio a 1,0 N (ajuste de pH a 8,2-9)	q.s.
Água para injeção	q.s. para 1 ml

(v) Injeção 1 (1 mg/ml)	mg/ml
Composto X=	1
Fosfato de sódio dibásico	12,0
Fosfato de sódio monobásico	0,7
Cloreto de sódio	4,5
Solução de hidróxido de sódio a 1,0 N (ajuste de pH a 8,2-9,0)	q.s.
Água para injeção	q.s. para 1 ml

(vi) Injeção 2 (10 mg/ml)	mg/ml
Composto X=	2
Fosfato de sódio monobásico	0,3
Fosfato de sódio dibásico	1,1
Polietilenoglicol 400	200,0
Solução de hidróxido de sódio a 1,0 N (ajuste de pH a 8,2-9,0)	q.s.
Água para injeção	q.s. para 1 ml

As formulações acima podem ser obtidas através de procedimentos convencionais bem conhecidos na técnica farmacêutica.

## **DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

### **Documentos de patente referidos na descrição**

- EP 1552829 A1 [0004]
- WO 2008014602 A1 [0004]
- US 6548537 B, Dai [0005]
- US 4608392 A, Jacquet [0073]
- US 4992478 A, Geria [0073]
- US 4559157 A, Smith [0073]
- US 4820508 A, Wortzman [0073]
- US 4938949 A [0074]
- WO 20050043788 A, Q. Luo [0088]

### **Documentos de não patente citados na descrição**

- **QUI; KAO.** *Drugs R.D.*, 2003, vol. 4, 1-18 [0002]
- **YANG et al.** *Mol. Cancer Ther*, 2003, vol. 2, 65-72 [0002]
- **WANG et al.** *Journal of Molecular Medicine*, 2006, vol. 84, 405-415 [0002]
- **WESTERHEIDE et al.** *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, 9616-9622 [0002]
- **HE et al.** *Int. Journal of Cancer*, 2010, vol. 126, 266-278 [0002]
- **HANTSCHEL et al.** *Cell Stress Chaperones*, 2000, vol. 5, 438-442 [0004]
- **FUQUA et al.** *Breast Cancer Res, Treatment*, 1994, vol. 32, 67-71 [0004]
- **AGHDASSI et al.** *Cancer Research*, 2007, vol. 67 (2), 616-625

[0004]

• **WANG et al.** *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 2006, vol. 47

[0004]

• **WANG et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, 4891-4899 [0004]

• **PHILLIPS et al.** *Cancer Research*, 2007, vol. 67 (19), 9407-16

[0004]

• **KRISE et al.** *J. Med. Chem.*, 1999, vol. 42, 3094-3100 [0006]

• **CHASSAING et al.** Highly Water-Soluble Prodrugs of Anthelminthic Benzimidazole Carbamates: Synthesis, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. *J. Med. Chem.*, 2008, vol. 51 (5), 1111-1114 [0007]

• **HARROUSSEAU et al.** *Haematologica*, 2008, vol. 93 (s1), 14

[0008]

• **KITZEN et al.** *European Journal of Cancer*, 2009, vol. 45,

1764-1772 [0008]

• **CHEN, Y. W. et al.** *Anticancer Drugs*, 2010, vol. 21 (5), 502-13

[0079]

• **XU B. et al.** *Cancer Lett.*, 2010, vol. 291 (2), 200-208 [0079]

• **BORJA-CACHO, D. et al.** *J. Gastrointest. Surg.*, 2010, vol. 14 (2), 252-60 [0079]

• **WESTFALL S. D. et al.** *Chemotherapy*, 2008, vol. 54 (1), 67-76

[0079]

• **TANG X. Y. et al.** *Postgrad. Med. J.*, 2007, vol. 83 (979),

338-43 [0079]

• **PANICHAKUL T. et al.** *Anticancer Res.*, 2006, vol. 26 (1A),

259-65 [0079]

• *Pediatr. Blood Cancer*, 2008, vol. 51 (6), 754-97 [0079]

• **MATSUI et al.** *Oncogene*, 2008, vol. 27, 4603-4614 [0079] [0087]

• **CHANG et al.** *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, 2221-2227 [0079]

• **WESTFALL et al.** *Chemotherapy*, 2008, vol. 54 (1), 67-76 [0079]

[0087]

• **CARTER et al.** *Blood*, 2008, vol. 111 (7), 3742-3750 [0079]

[0087]

• **YANG.** *Int. J. Mol. Med.*, 2008, vol. 22 (4), 489-96 [0079]

- **FIDLER et al.** *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, vol. 2, 855 [0079]
- Anaplastic thyroid carcinoma. *Mol Pharmacol.*, 2009, vol. 75 (4), 812-9 [0087]
- **YANG et al.** *Mol. Cancer Ther.*, 2003, vol. 2 (1), 65-72 [0087]
- **LIANG et al.** *Cancer Letters*, 2008, vol. 270 (2), 337-341 [0087]
- **LIU et al.** *Phytomedicine*, 2009, vol. 16 (11), 1006-1013 [0087]
- **WANG et al.** *J. Mol. Med.*, 2006, vol. 84 (5), 405-15 [0087]
- **TENGCHAI SRI et al.** *Cancer Letters*, 1998, vol. 133 (2), 169-175 [0087]
- **LOU et al.** *Leukemia and Lymphoma*, 2004, vol. 45, 373-376 [0087]
- **TANG et al.** *Postgraduate Medical Journal*, 2007, vol. 83, 338-343 [0087]
- **BOULT et al.** *B. J. Cancer*, 2008, vol. 89, 1985-92 [0087]
- **KIVIHARJU et al.** *Clinical Cancer Research*, 2002, vol. 8, 2666-2674 [0087]
- **MIYATA et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 336 (4), 1081-6 [0087]
- **JIANG.** *Oncogene*, 2001, vol. 20 (55), 8009-18 [0087]
- **LIN et al.** *J. Int. Med. Res.*, 2007, vol. 35 (4), 490-6 [0087]
- **KAPOOR.** *Int. J. Mol. Med.*, 2008, vol. 22 (4), 489-96 [0087]
- **CARTER et al.** *Blood*, 2006, vol. 108 (2), 630-7 [0087]
- **ULTIPLE MYELOMA: YINJUN et al.** *Leuk. Res.*, 2005, vol. 29 (1), 99-105 [0087]
- **ANTONOFF et al.** *Surgery*, 2009, vol. 146 (2), 282-90 [0087]
- **ZHANG et al.** *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, vol. 27, 1438-1446 [0087]
- **CHANG et al.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, 2221-2227 [0087]
- **WANG et al.** *Pediatr. Blood Cancer.*, 2008, vol. 51 (6), 754-9 [0087]
- **ZHOU et al.** *World J., Gastroenterol*, 2008, vol. 14 (10), 1504-1509 [0087]

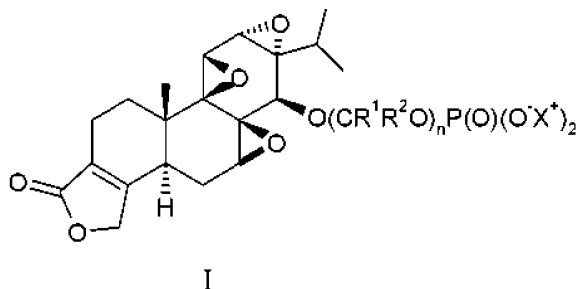
- **WANG et al.** *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13, 4891 [0087]
- **PHILLIPS, SALUJA et al.** *Cancer Res.*, 2007, vol. 67 (19), 9407-16 [0087]
- **ZHU et al.** *Oncol Rep.*, 2009, vol. 22 (6), 1397-401 [0087]
- **D QUI et al.** *Drug R & D*, 2003, vol. 4, 1-16 [0088]
- **CHEN.** *Leukemia amd Lymphoma*, 2001, vol. 42, 253-256 [0088]
- **ZHANG et al.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, vol. 125 (1), 41-46 [0088]
- **YANG et al.** *Int. J. Immunophamac.*, vol. 14, 963-969 [0088]
- **CHEN et al.** *Transplantation*, 2000, vol. 70, 1442-1447 [0088]
- **P.E. LIPSKY et al.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 1997, vol. 5, 713-723 [0088]
- **KIZELSZTEIN et al.** *Journal of Neuroimmunology*, 2009, vol. 217, 28-37 [0088]
- **WEI et al.** *Neural Regeneration Research*, 2007, vol. 2 (3), 156-61 [0088]
- **WEI et al.** *Clin. Immunol.*, 2008, vol. 129, 211-218 [0088]
- **HIKIM et al.** *Journal of Andrology*, 2000, vol. 21, 431-437 [0088]
- **HUYNH et al.** *Journal of Andrology*, 2000, vol. 21, 689-699 [0088]
- **WANG et al.** *Asian Journal of Andrology*, 1999, vol. 1, 121-125 [0088]
- **LUE et al.** *Journal of Andrology*, 1998, vol. 19, 479-486 [0088]
- **LU et al.** *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2006, vol. 47, 3796-3800 [0088]
- **KRISHNA et al.** *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 158 (3), 997-1004 [0088]
- **TAO et al.** *Arthritis Rheum.*, 2008, vol. 58 (6), 1774-83 [0088]
- **ZHOU et al.** *Neurobiology of Disease*, 2005, vol. 18, 441-449 [0088]
- **LEUENROTH et al.** *PNAS*, 2010, vol. 104, 4389-4394 [0088]
- **SU et al.** *Glia*, 2010, vol. 58, 901-915 [0088]

EP 2427467 B1

Lisboa, 3 de Novembro de 2015

## REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de fórmula I:



em que:

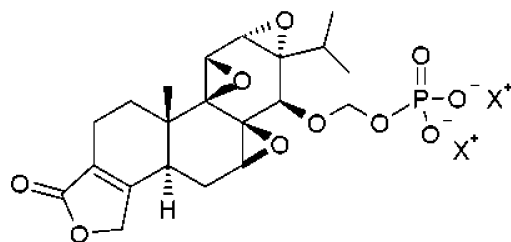
cada  $R^1$  é independentemente H,  $(C_1-C_6)$  alquilo, aril $(C_1-C_6)$ alquilo-,  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo ou arilo; e cada  $R^2$  é independentemente H,  $(C_1-C_6)$  alquilo, aril $(C_1-C_6)$ alquilo-,  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo ou arilo; ou  $R^1$  e  $R^2$  em conjunto com o átomo ao qual se encontram ligados formam um  $(C_3-C_7)$ cicloalquilo; em que qualquer alquilo ou cicloalquilo de  $R^1$  ou  $R^2$  pode ser opcionalmente substituído com um ou mais grupos selecionados a partir de halo,  $(C_1-C_6)$ alcoxi e  $NR^aR^b$  e em que qualquer arilo de  $R^1$  ou  $R^2$  pode ser opcionalmente substituído com um ou mais grupos selecionados a partir de halo,  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_1-C_6)$  alcoxi,  $NR^aR^b$ , nitro e ciano;  $R^a$  e  $R^b$  são cada um independentemente selecionados a partir de H,  $(C_1-C_6)$  alquilo,  $(C_3-C_6)$ cicloalquilo e arilo; ou  $R^a$  e  $R^b$  em conjunto com o azoto ao qual se encontram ligados formam um pirrolidino, piperidino, piperazino, azetidino, morfolino, ou tiomorfolino;

$n$  é 1, 2 ou 3; e

cada X é H;

ou um sal do mesmo.

2. Um composto da reivindicação 1 que é um composto de fórmula Ia:



Ia

em que  $X^+$  é um catião orgânico ou catião inorgânico farmaceuticamente aceitável.

3. O composto da reivindicação 1 em que  $R^1$  é H ou  $(C_1-C_6)$ alquilo.

4. O composto da reivindicação 1 em que  $R^1$  é H.

5. O composto da reivindicação 1 ou qualquer uma das reivindicações 3-4 em que  $R^2$  é H ou  $(C_1-C_6)$ alquilo.

6. O composto da reivindicação 1 ou qualquer uma das reivindicações 3-5 em que cada  $X^+$  é H.

7. O composto de qualquer uma das reivindicações 1-5 em que cada  $X^+$  é lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio, bário, zinco ou alumínio.

8. O composto de qualquer uma das reivindicações 1-5 em que cada  $X^+$  é da fórmula  $HY^+$  em que Y é amoníaco, trietilamina, trometamina, trietanolamina, etilenodiamina, glucamina, N-metilglucamina, glicina, lisina, ornitina, arginina, etanolamina ou colina.

9. O composto de qualquer uma das reivindicações 1-5 em que cada  $X^+$  é  $Na^+$ .

10. O composto da reivindicação 1 que é o composto sal



dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido, sal dissódico de 14-O-fosfonooxietiltriptólido ou sal dissódico de 14-O-fosfonooxipropiltriptólido.

11. O composto da reivindicação 1 que é o composto sal dissódico de 14-O-fosfonooximetiltriptólido.

12. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula I conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em combinação com um portador farmaceuticamente aceitável.

13. Um composto de fórmula I conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização em terapêutica médica.

14. Um composto de fórmula I conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização no tratamento profilático ou terapêutico do cancro.

15. Um composto de fórmula I conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para utilização na inibição profilática ou terapêutica do crescimento de células cancerosas num cancro expressando HSP70.

Lisboa, 3 de Novembro de 2015

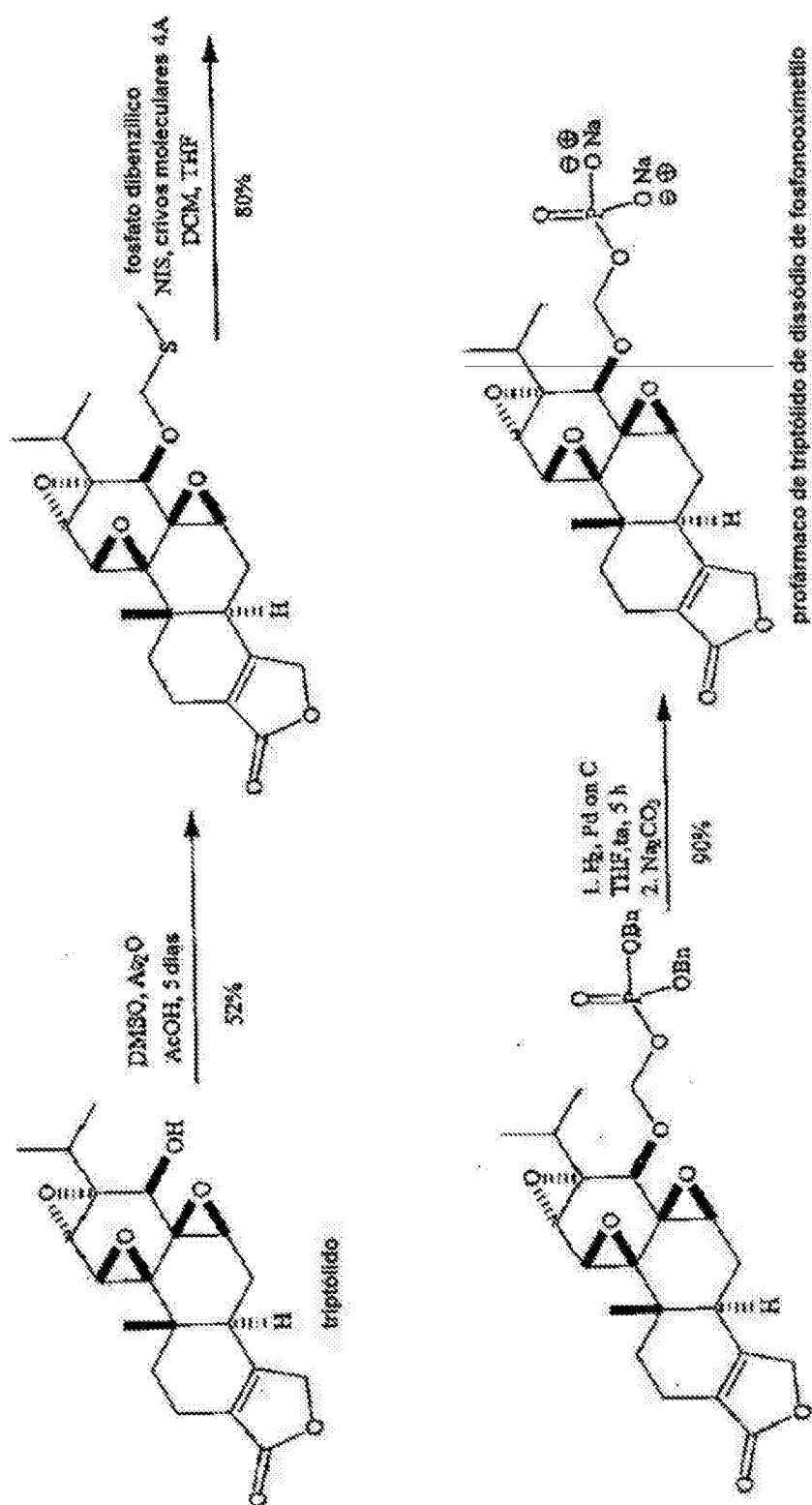
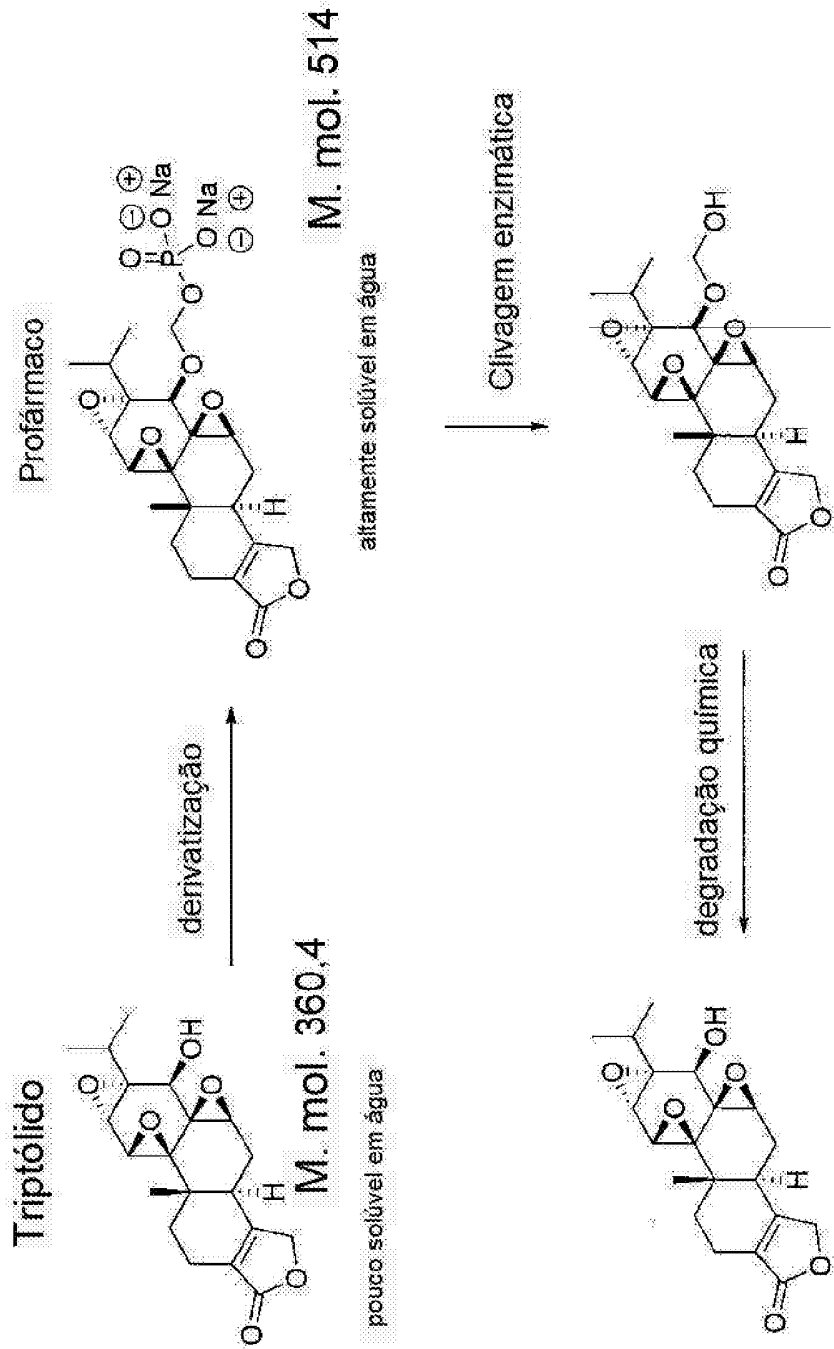


FIG. 1

METABOLISMO E CLIVAGEM ENZIMÁTICA  
DO PROFÁRMACO DE TRIPTÓLIDO (composto 1)



Conversão *in vitro* do Profármaco de Triptólido (composto 1)  
em Triptólido

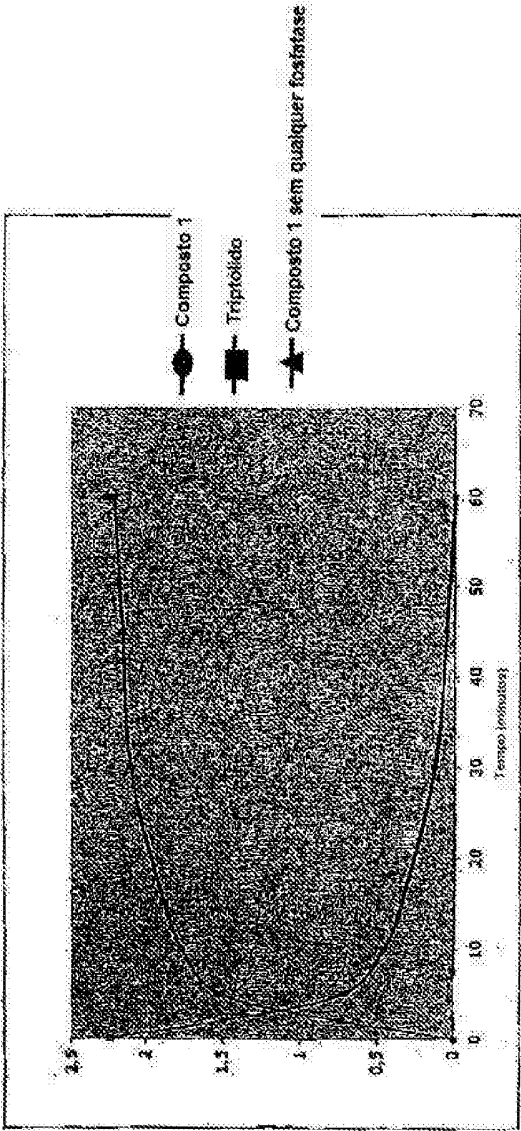


FIG. 3

Efeito sobre a viabilidade após 48h de exposição

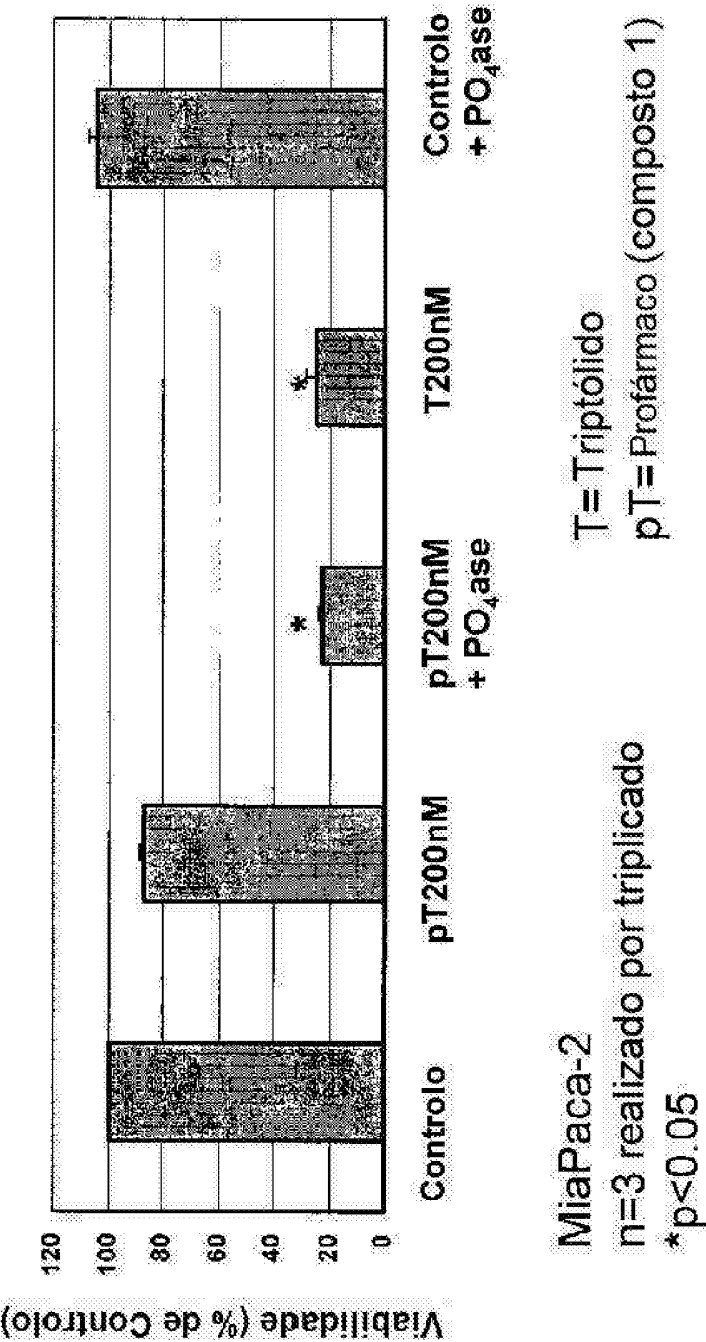
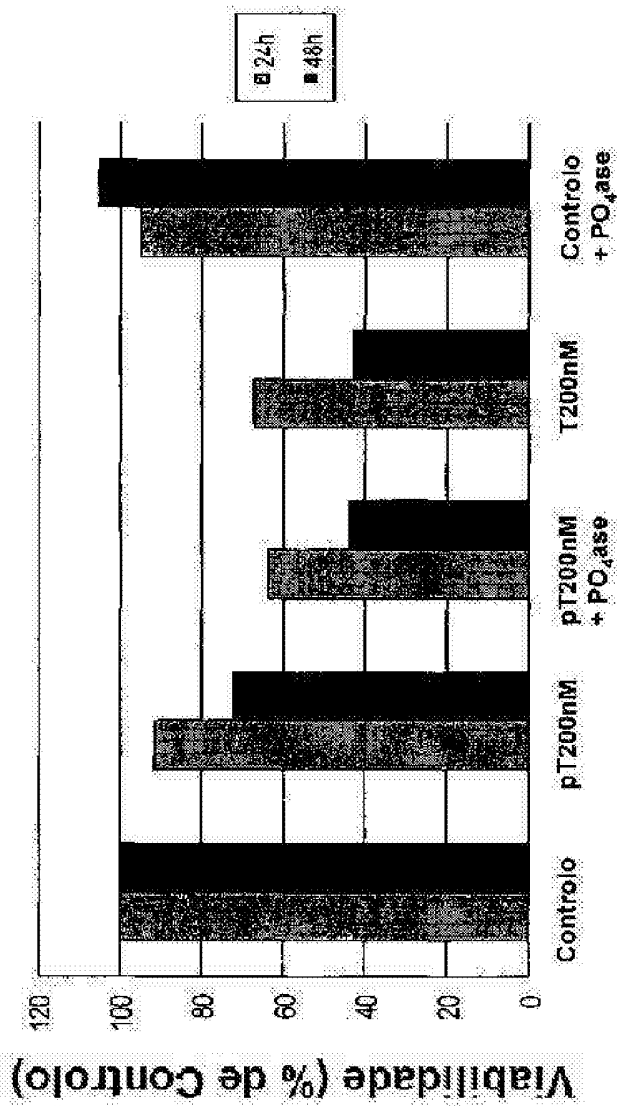


FIG. 4

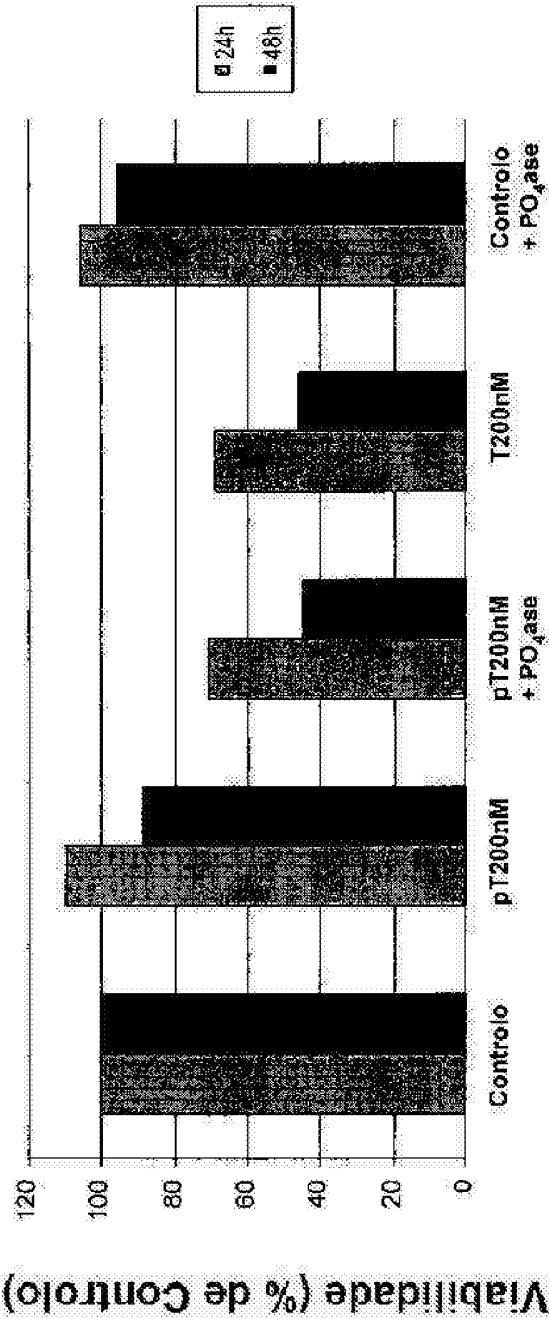
# Efeito sobre a viabilidade (Panc-1)



T= Triptólido  
pT= Triptólido pró-fármaco (composto 1)

FIG. 5

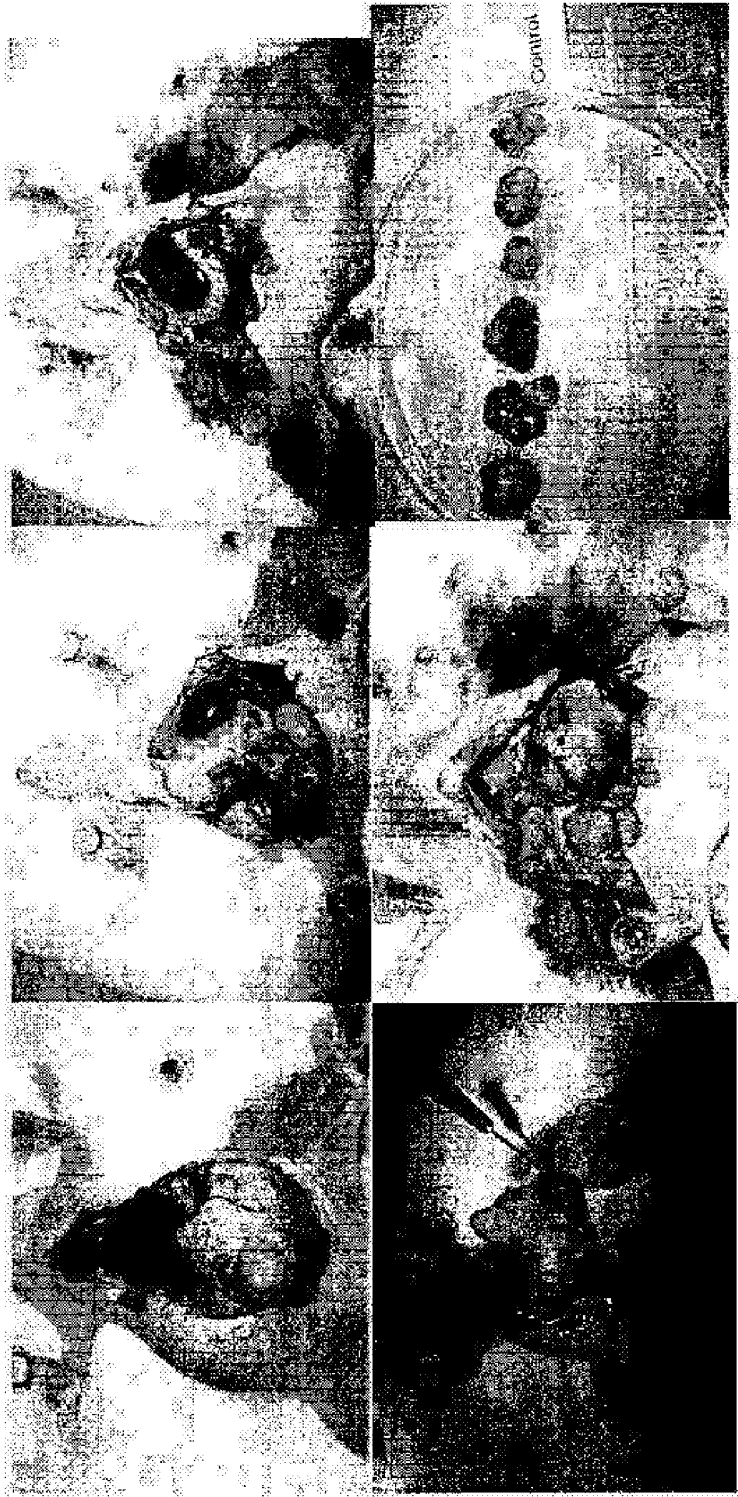
**Efeito sobre a viabilidade  
(S2VP10)**



T= Triptólido  
pT= Triptólido pró-fármaco (composto 1)

**FIG. 6**

**Tumores no Grupo de Controlo**



**FIG. 7**



# Tumores no Grupo de Triptólido

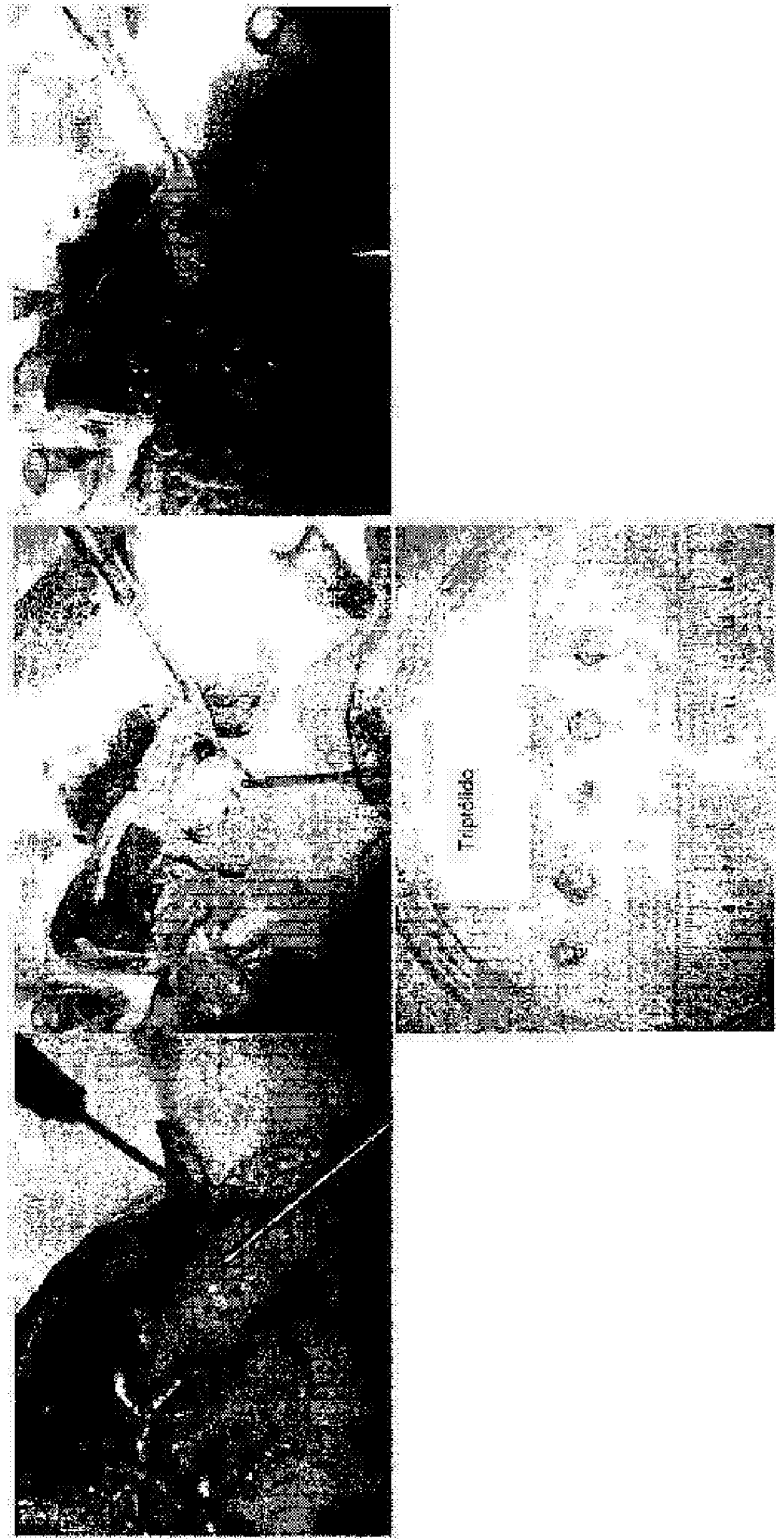
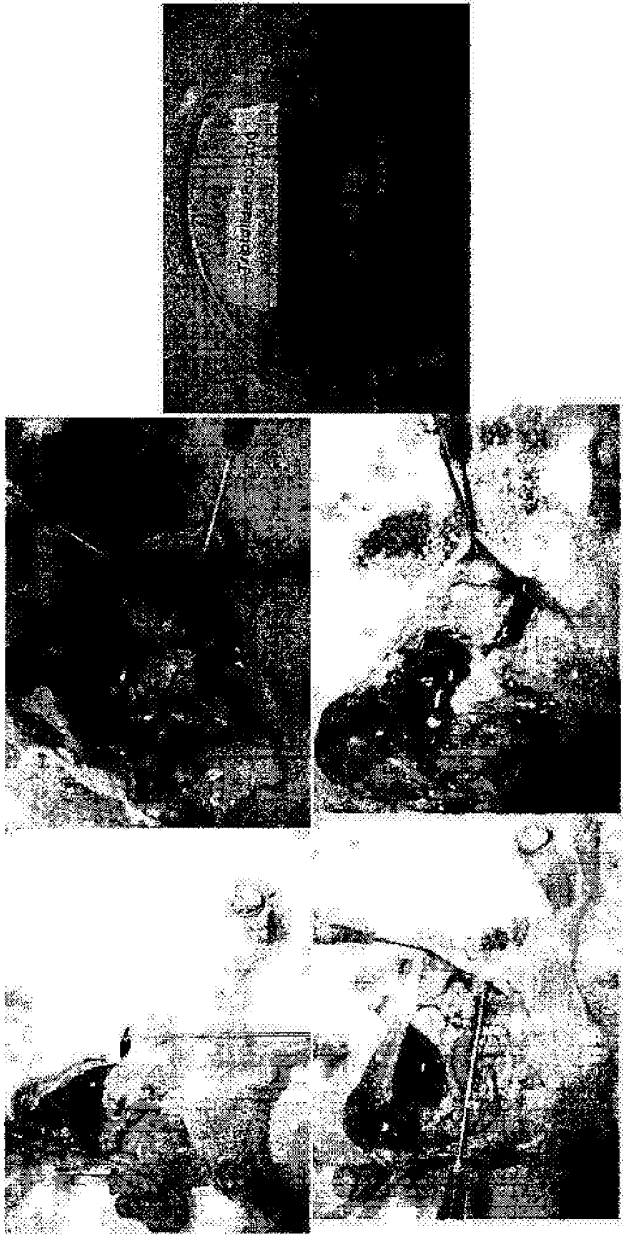
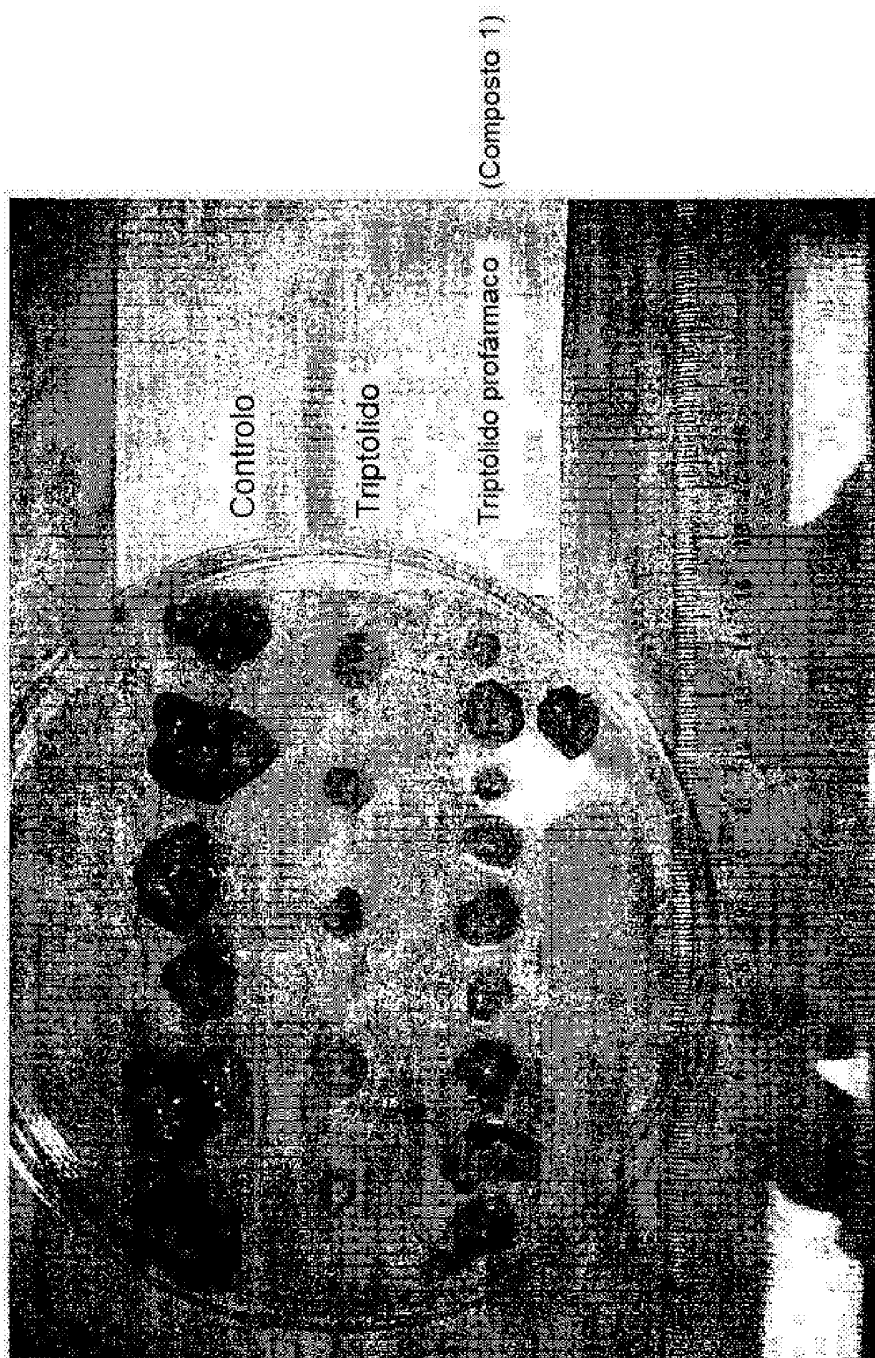


FIG. 8

**Tumores no Grupo de Profármaco**



**FIG. 9**

**FIG. 10**

Experiência *In Vivo*  
Peso Tumoral Comparativo

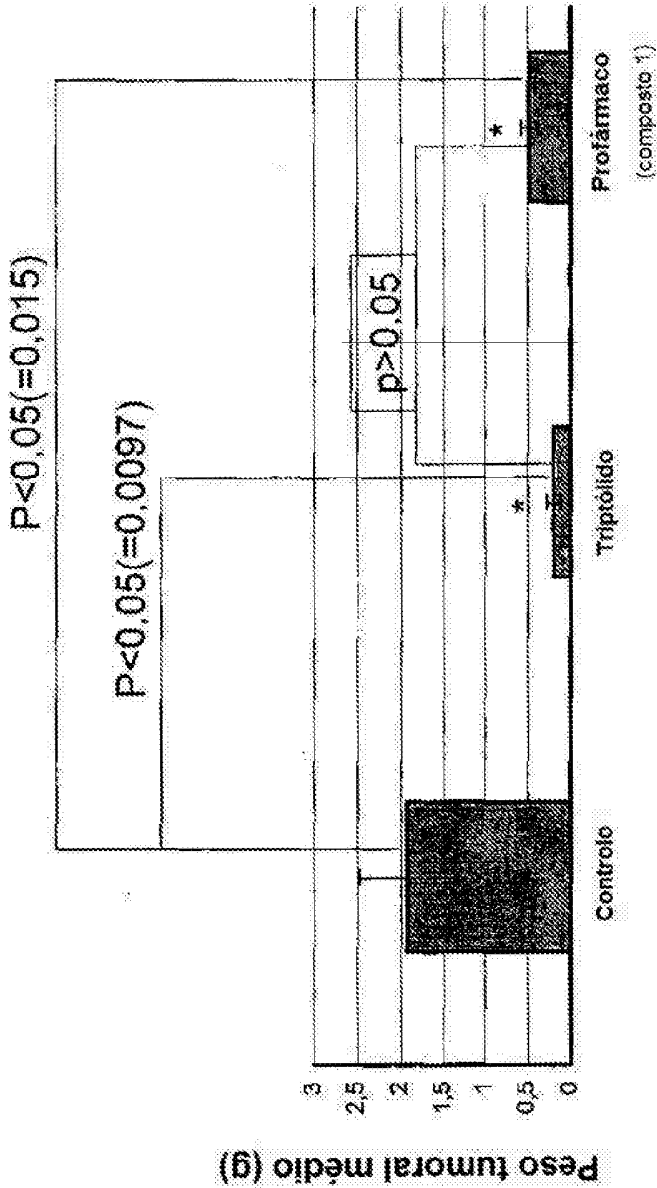


FIG. 11

Experiência *In Vivo*  
Volume Tumoral Comparativo

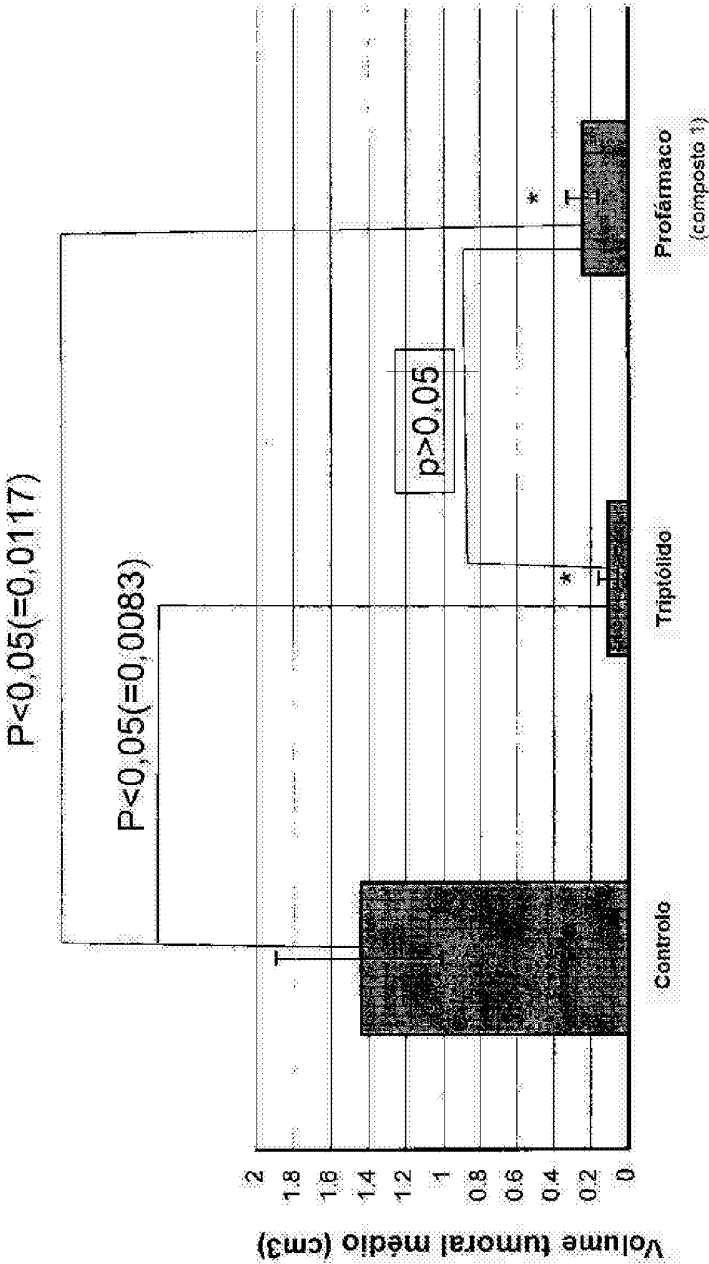
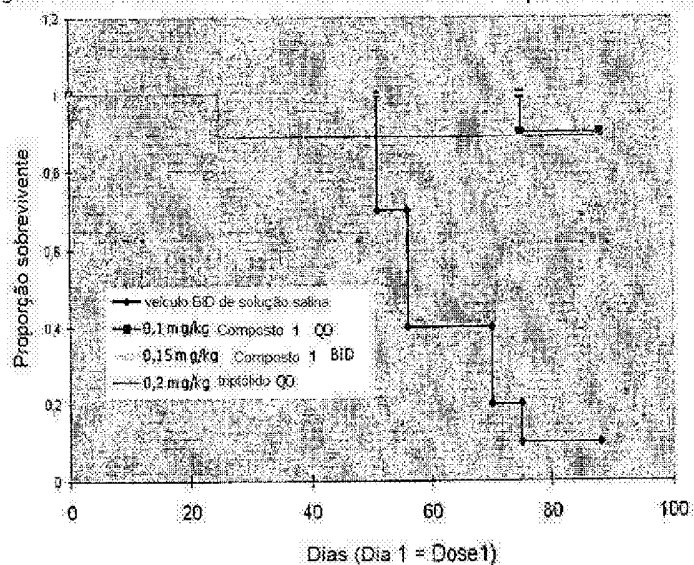


FIG. 12

Figura 13. Análise de sobrevivência de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle.



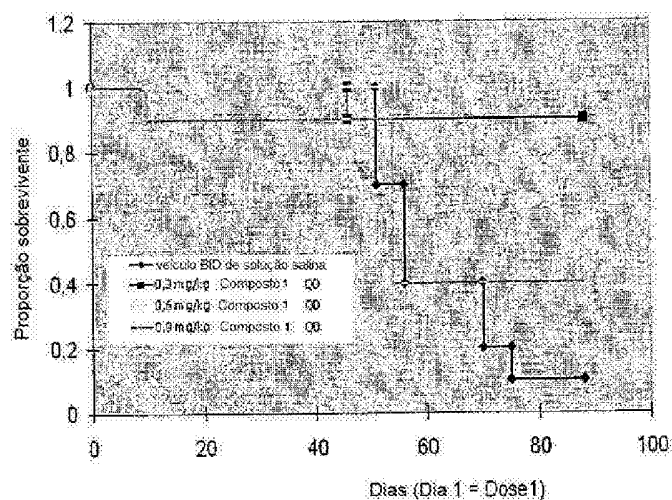
Veículo BID: Todas as mortes foram devido a carga tumoral

0,1mg/kg Composto 1 QD: 1 morte observada é devido a carga tumoral

0,15mg/kg Composto 1 BID: nenhuma morte

0,2mg/kg Composto 1 QD: 1 morte é devido a lesão, não relacionada com a carga tumoral ou o efeito do fármaco.

Figura 14. Análise de sobrevivência de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle



Veículo BID: Todas as mortes foram devido a carga tumoral

0,3mg/kg Composto 1 QD: 1 morte é devido a lesão, não relacionada com a carga tumoral

0,6mg/kg Composto 1 QD: nenhuma morte

0,9mg/kg Composto 1 QD: 1 morte no momento da injeção no dia de estudo 8, causa indefinida. As restantes mortes foram devidas ao efeito do fármaco.

Figura 15. Análise de carga tumoral (volume ou peso) de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle.

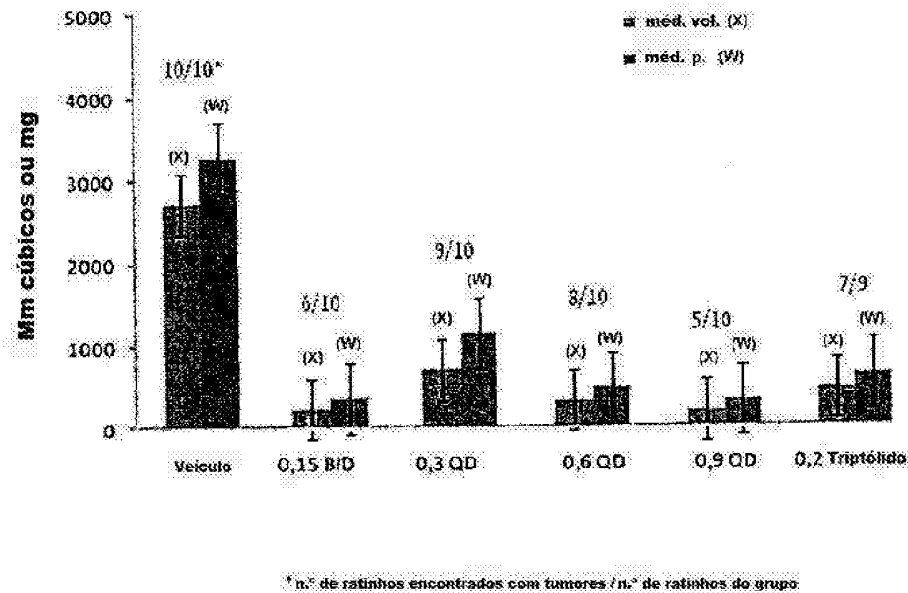




Figura 16. Análise de carga tumoral (volume ou peso) de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle.

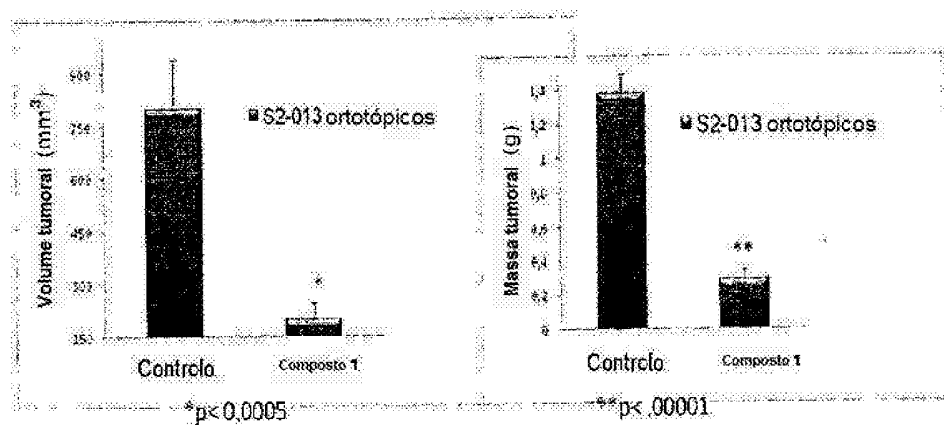


Figura 17. Análise de carga tumoral (volume ou peso) de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle.

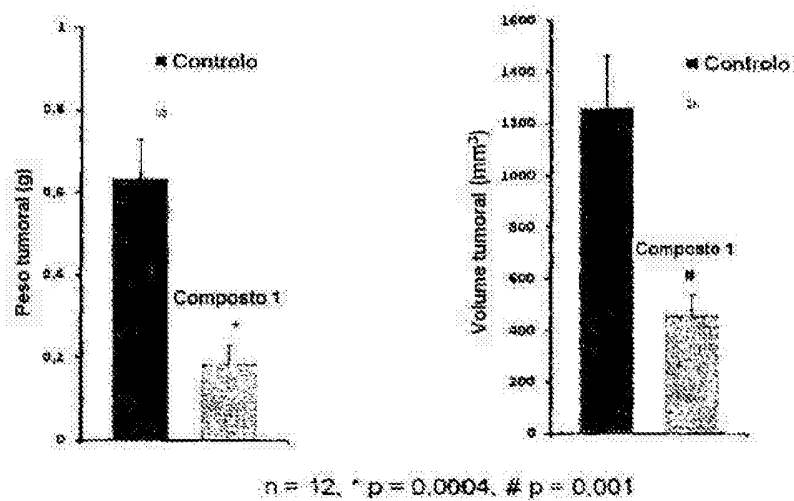
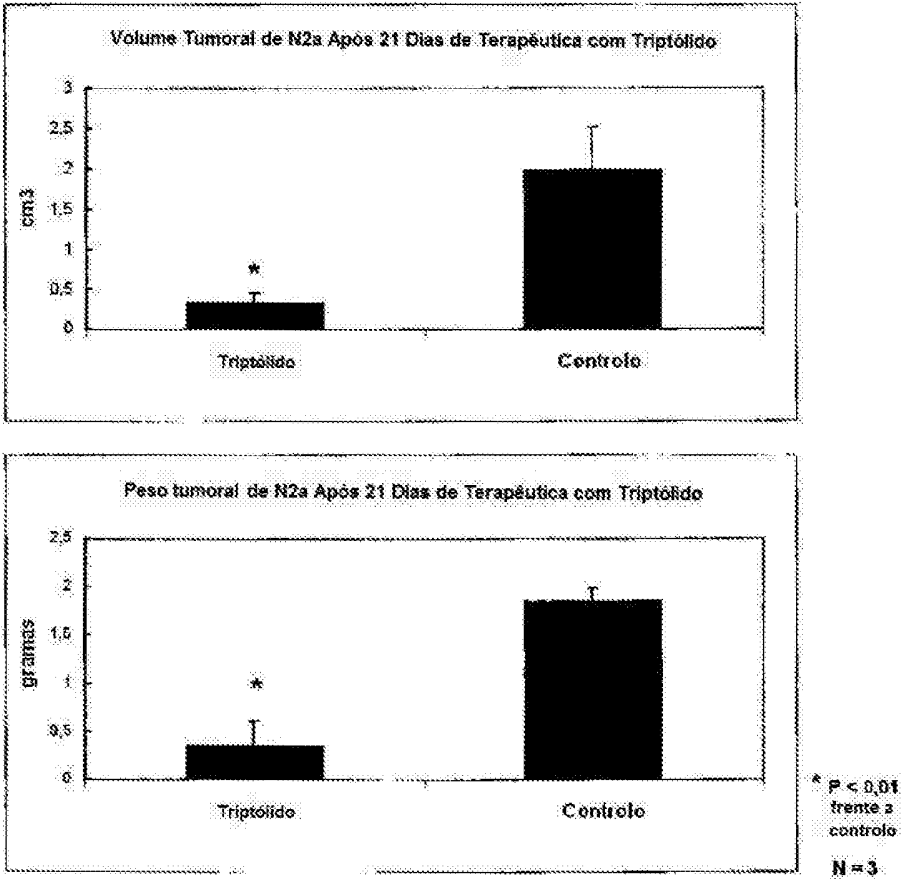
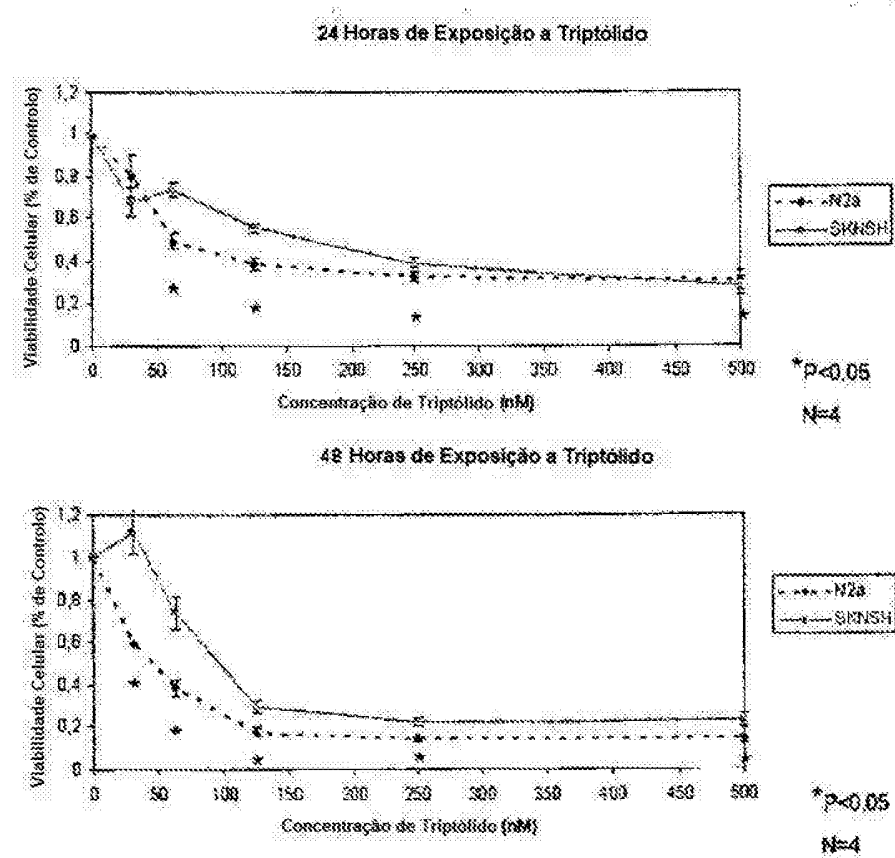


Figura 18. Análise de carga tumoral (volume ou peso) de ratinhos tratados com Composto 1 ou de controle.



A Figura 19 ilustra a viabilidade celular (N2a de neuroblastoma e SKNSH) em presença de triptólido.



A Figura 20 ilustra a atividade de Caspase 3 em presença de triptólido.

