

(11) Número de Publicação: **PT 2240172 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/196** (2014.01) **A61K 31/506** (2014.01)  
**A61K 45/06** (2014.01) **A61P 35/02** (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2008.12.18**

(30) Prioridade(s): **2007.12.21 US 15704**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.10.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.19**  
**102/2014**

(73) Titular(es):

**NOVARTIS AG**  
**LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL** CH

(72) Inventor(es):

**LAWRENCE CARL PANASCI** CA  
**RAQUEL SILVIA ALOYZ** CA

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMINIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **COMBINAÇÃO DE NILOTINIB E CLORAMBUCILO PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE PARA UMA COMBINAÇÃO QUE COMPREENDE (A) UM AGENTE PREJUDICIAL DO DNA; E (B) 4-METIL- 3-[[4-(3-PIRIDINIL)-2-PIRIMIDINIL]-AMINO]-N-[5-(4-METIL-1H-IMIDAZOL- 1-IL)-3-(TRIFLUOROMETIL)-FENIL]-BENZAMIDA ( NILOTINIB ); UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO UMA TAL COMBINAÇÃO E, OPCIONALMENTE, PELO MENOS UM VEÍCULO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL PARA UTILIZAÇÃO SIMULTÂNEA, SEPARADA OU SEQUENCIAL, EM PARTICULAR PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (CLL); A UTILIZAÇÃO DE UMA TAL COMBINAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DA CLL; UMA EMBALAGEM COMERCIAL OU PRODUTO COMPREENDENDO UMA TAL COMBINAÇÃO, CADA UMA; E PARA UM MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM ANIMAL DE SANGUE QUENTE, ESPECIALMENTE UM SER HUMANO.

**RESUMO****"COMBINAÇÃO DE NILOTINIB E CLORAMBUCILO PARA O TRATAMENTO  
DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA"**

A invenção refere-se para uma combinação que compreende (a) um agente prejudicial do DNA; e (b) 4-metil-3-[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)-fenil]-benzamida ("nilotinib"); uma composição farmacêutica compreendendo uma tal combinação e, opcionalmente, pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável para utilização simultânea, separada ou sequencial, em particular para o tratamento da leucemia linfocítica crónica (CLL); a utilização de uma tal combinação para a preparação de um medicamento para o tratamento da CLL; uma embalagem comercial ou produto compreendendo uma tal combinação, cada uma; e para um método de tratamento de um animal de sangue quente, especialmente um ser humano.

**DESCRIÇÃO**

**"COMBINAÇÃO DE NILOTINIB E CLORAMBUCILO PARA O TRATAMENTO  
DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA"**

A invenção refere-se para uma combinação que compreende (a) um agente de danificação de DNA, ou seja, clorambucilo e (b) benzamida ("nilotinib"); uma composição farmacêutica compreendendo uma tal combinação e, opcionalmente, veículo aceitável, pelo menos um veículo farmacuticamente, apropriados para a utilização simultânea, separado ou sequencial, em particular para utilização no tratamento de leucemia linfocítica crónica (CLL); e uma embalagem comercial ou produto compreendendo uma tal combinação, cada um, tal como definido nas reivindicações independentes, que são incorporados aqui por referência.

O agente de danificação do DNA numa combinação de acordo com a invenção é um análogo da mostarda de azoto chamado clorambucilo, mas a divulgação também permite clornafazina, estramustina, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, navemiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo, ciclofosfamida, uramustina e melfalano.

O documento US 2006/0122186 revela uma combinação de imatinib com análogos de mostarda de azoto e seu uso contra a leucemia linfocítica crónica.

A leucemia linfocítica crónica (CLL) é a forma mais frequente de leucemia em adultos, responsável por 25% de todas as leucemias (anualmente aproximadamente 10 000 novos casos de CLL nos Estados Unidos (EUA)). Nos EUA, cerca de 95% dos casos de CLL são leucemia fenótipo de células-B. Cerca de 50% do CLL, os pacientes são assintomáticos no momento do diagnóstico. O estado da doença se correlaciona com o prognóstico; O estágio tem uma sobrevida média >10 anos, enquanto que a fase I-II tem uma sobrevida mediana de 7 anos. O tratamento geralmente é iniciado quando os pacientes são sintomáticos.

Existem dois grupos principais de fármacos utilizados no tratamento de CLL: (1) agentes alquilantes de ligação tais como clorambucilo (CLB) ou ciclofosfamida e (2) análogos de purina tais como fludarabina. Normalmente clorambucilo (CLB) foi o tratamento inicial padrão, mas fludarabina e ciclofosfamida (CTX) já se tornaram o tratamento padrão de primeira linha. Estes agentes conduzem a respostas em 60-75% dos pacientes. Estudos aleatórios recentes demonstraram uma taxa de resposta mais elevada para fludarabina, em comparação com CLB mas não houve diferença na sobrevida. Qualquer agente é aceitável como terapia de primeira linha na leucemia linfocítica crónica. Outros agentes estão disponíveis para a terapia. Eventualmente, todos os pacientes se tornam resistentes aos fármacos. Não existe tratamento capaz de curar esta doença (Kalil, N. and Cheson, B.D. The Oncologist 4:352-369,

1999). O documento PCT/IB 03/05454 revela que o mesilato de imatinib, o ingrediente ativo de Gleevec®, sensibiliza os linfócitos B-CLL para CLB. Enquanto o imatinib em combinação com CLB está atualmente na fase de estudo clínico I-II para o tratamento da CLL, verificou-se agora, surpreendentemente, que o nilotinib possui uma potência maior do que o imatinib na sensibilização dos linfócitos CLL em direção a CLB. Enquanto não estão dispostos a se comprometer com a teoria, descobrimos que tanto nilotinib como imatinib inibem de modo semelhante a reparação de DNA relacionada com Rad51 induzida por CLB, mas somente nilotinib aumenta  $\square$  H2AX induzido por CLB. Análise de ativação da caspase-3, mostrou um aumento das vias de apoptose mediada pela ativação de JNK em células tratadas com CLB em combinação com nilotinib, mas não com imatinib. Além disso, a c-abl de inibição pelo nilotinib conduz a regulação negativa da via NFkB envolvida na manutenção da sobrevivência dos linfócitos B-CLL.

Figura: Efeito sinérgico de nilotinib e imatinib na citotoxicidade CLB em linfócitos de doentes com B-CLL. A avaliação do efeito sinérgico de 1, 5 e 10  $\mu$ M de nilotinib e imatinib na citotoxicidade CLB foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. O  $|valor| < 1$  indica que o CLB mais nilotinib ou imatinib atuam sinergicamente. Quando  $|valor| > 1$ , os fármacos agem antagonicamente. \*:  $p < 0,001$ .

A presente revelação providencia uma combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial que

compreende (a) agente danificador de DNA (de acordo com a invenção, clorambucilo) e (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(tri-fluorometil)-fenil benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. A presente divulgação ou no caso do clorambucilo a presente invenção proporciona ainda a referida combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial. O referido agente danificador de DNA é um análogo da mostarda de azoto.

A presente divulgação proporciona uma combinação que comprehende (a) um análogo de mostarda de azoto selecionado a partir de um grupo consistindo de clorambucilo (nas formas de realização da invenção), clornafazina, estramustina, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, ciclofosfamida, uramustina, melfalano, e mostarda de uracilo e (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)-fenil benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. A presente divulgação (no caso das formas de realização da invenção, com clorambucilo) proporciona ainda a referida combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial.

A presente invenção proporciona uma combinação que comprehende (a) o clorambucilo, (b) 4-metil-3-[[4-(3-

piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. A presente invenção proporciona ainda a referida combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial.

A presente divulgação também fornece uma combinação compreendendo (a) ciclofosfamida, (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. A presente divulgação proporciona ainda a referida combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial.

A presente divulgação também fornece uma combinação compreendendo (a) e fludarabina (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. A presente divulgação proporciona ainda a referida combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial.

A presente divulgação refere que uma combinação

que comprehende um análogo de mostarda de azoto selecionado a partir de CLB, clormafazina, estramustina, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, ou mostarda de uracilo, particularmente CLB e nilotinib, pode produzir um efeito terapêutico que seja maior do que o obtido por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um único análogo de mostarda de azoto, em particular CLB ou apenas nilotinib. Mais especificamente, e de acordo com a invenção, o nilotinib sensibiliza os linfócitos B-CLL para o tratamento com CLB.

A presente divulgação refere-se para uma combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial, tal como uma preparação combinada ou uma combinação farmacêutica fixa, que comprehende (a) um análogo de mostarda de azoto (em formas de realização da invenção clorambucilo) e (b) nilotinib em que os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável, e opcionalmente, pelo menos, um veículo farmaceuticamente aceitável.

O termo "uma preparação combinada", tal como utilizado aqui, define especialmente um "kit de partes" no sentido em que os parceiros da combinação (a) e (b) como definido acima podem ser doseados independentemente um do outro, ou por utilização de diferentes combinações fixas com quantidades distintas dos parceiros da combinação (a) e (b), isto é, simultaneamente ou em diferentes momentos. As

partes do *kit* podem então, por exemplo, ser administradas simultaneamente ou cronologicamente escalonadas, ou seja em diferentes momentos e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do *kit* de partes. Os intervalos de tempo são escolhidos de tal modo que o efeito sobre a doença tratada na utilização combinada das partes seja maior do que o efeito que seria obtido pela utilização de apenas qualquer uma partes da combinação (a) e (b). A razão das quantidades totais das partes da combinação (a) para as partes da combinação (b) a serem administradas na preparação combinada pode ser alterada, por exemplo, a fim de lidar com as necessidades de uma sub-população de doentes a ser tratados ou as necessidades de um único paciente, cujas diferentes necessidades podem ser devidas a idade, sexo, peso corporal dos pacientes etc. Preferencialmente, existe pelo menos um efeito benéfico, por exemplo, um reforço mútuo do efeito das partes da combinação (a) e (b), em particular em formas de realização da invenção um sinergismo, por exemplo, a mais do que um efeito aditivo, efeitos vantajosos adicionais, menos efeitos colaterais, um efeito terapêutico combinado numa dosagem não-eficaz de um ou ambos os parceiros da combinação (a) e (b), e muito preferencialmente um forte sinergismo dos elementos (a) e (b).

O termo "tratamento" compreende a administração dos parceiros da combinação a um animal de sangue quente em necessidade de tal tratamento, com o intuito de curar a doença, ou para efetuar um atraso de progressão de uma doença.

O termo "atraso na progressão", tal como utilizado aqui, significa que a progressão da doença é, pelo menos, retardada ou dificultada por o tratamento e que os pacientes exibem taxas de sobrevida mais elevadas do que os pacientes não serem tratados ou ser tratados com a monoterapia.

O termo "análogo de mostarda de azoto", como normalmente entendido por um perito na arte, refere-se a um agente citotóxico da quimioterapia que não alquila especificamente o DNA. De preferência, o termo "análogo de mostarda de azoto" refere-se a um grupo de compostos, incluindo mas não se limitando a CLB (nas formas de realização da invenção), clornafazina, estramustina, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, navemiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracilo ciclofosfamida, uramustina, e melfalano.

O termo "leucemia linfocítica crónica resistente a clorambucilo", tal como aqui utilizado, define especialmente um leucemia linfocítica crónica em que CLB não é mais eficiente ou mostra uma redução da sua eficácia terapêutica.

O CLB pode ser preparado de acordo com o processo descrito no documento Patente EUA 3 046 301.

O composto 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(tri-fluo-

rometil)fenil]-benzamida é também conhecido sob a denominação internacional "nilotinib". Pode ser preparado e administrado como descrito no documento WO 04/005281.

Nilotinib pode ser empregue na forma do seu monohidrato de mono-cloridrato como descrito no documento WO2007/015870.

A estrutura dos agentes ativos citados pode ser feita a partir da edição atual do compêndio padrão "The Merck Index" ou de bases de dados, por exemplo Patentes Internacionais (por exemplo IMS World Publications). Qualquer perito na arte está totalmente capacitado, com base nestas referências, para fabricar e testar as indicações farmacêuticas e as propriedades em modelos de teste padrão, tanto in vitro e in vivo.

Uma combinação, tal como revelado no presente invento, a saber, uma combinação que compreende (a) CLB análogo de mostarda de azoto e (b) nilotinib em que os ingredientes ativos estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável e opcionalmente pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável, será referido daqui em diante como uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO.

As combinações da invenção apresentam efeitos benéficos no tratamento de CLL. Numa forma de realização preferida da invenção, a doença proliferativa a ser tratada

com uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO é CLL, que é resistente a CLB.

Surpreendentemente, as COMBINAÇÕES DA INVENÇÃO também são melhor toleradas pelos pacientes de CLL do que as combinações correspondentes empregando mesilato de imatinib, em vez de nilotinib ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

Pode ser demonstrado por modelos de teste estabelecidos que uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO resulta em efeitos benéficos aqui descritos antes. A pessoa especialista na pertinente técnica é totalmente capaz de selecionar um modelo de teste relevante para provar tais efeitos benéficos. A atividade farmacológica de uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO pode, por exemplo, ser demonstrada num estudo clínico ou num procedimento de teste como essencialmente descrito a seguir.

Estudos clínicos adequados são em particular, estudos paralelos alietórios, duplo-cego em pacientes com CLL com doença em estágio final. Estes estudos são, em particular, adequados para comparar os efeitos de uma monoterapia utilizando os ingredientes ativos independentes uns dos outros e uma terapia utilizando uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO e para provar, em particular, o sinergismo dos ingredientes ativos das COMBINAÇÕES DA INVENÇÃO. Os parâmetros primários em tais estudos podem ser o estado de desempenho, na qualidade de vida ou tempo de progressão da

doença. Num esboço adequado de estudo, os pacientes, por exemplo, recebem por ciclo de tratamento de 2 semanas, uma dose diária que varia de 50 a 1000 mg do nilotinib e CLB a uma dose de 0,2 a 1 mg/kg/dia.

É um objetivo da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade, que seja terapeuticamente eficaz em conjunto contra CLL compreendendo a COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO. Nesta composição, as partes da combinação (a) e (b) podem ser administradas conjuntamente, uma após outra ou separadamente numa forma de dosagem unitária combinada ou em duas formas de dosagem unitárias separadas. A forma de dosagem unitária pode também ser uma combinação fixa.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser preparadas de um modo conhecido *per se* e são as adequadas para administração entérica, tal como administração oral ou retal, e parentérica a mamíferos (animais de sangue quente), incluindo o homem, o que compreende pelo menos uma parte da combinação farmacologicamente ativa separada ou em combinação com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis, especialmente adequados para aplicação entérica ou parentérica. Numa forma de realização da invenção, um ou mais dos ingredientes ativos são administrados por via oral.

Em particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz de cada uma das partes da combinação da COMBINAÇÃO

DA INVENÇÃO pode ser administrada simultaneamente ou sequencialmente e em qualquer ordem, e os componentes podem ser administrados separadamente ou como uma combinação fixa. Por exemplo, um método para retardar a progressão ou tratamento de CLL de acordo com a presente invenção pode compreender (i) a administração da primeira parte da combinação na forma livre ou de sal farmaceuticamente aceitável e (ii) a administração da segunda parte da combinação na forma livre ou na forma de sal farmaceuticamente aceitável, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem, em quantidades sinergicamente eficazes, por exemplo, em dosagens diárias correspondentes às quantidades aqui descritas. As partes da combinação individuais da COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO podem ser administradas separadamente em tempos diferentes durante o curso da terapia ou concorrentemente em formas de combinação divididas ou individuais. Além disso, o termo administração também abrange a utilização de um pró-fármaco de um elemento da combinação que se converte in vivo no parceiro da combinação como tal. A presente invenção é, por conseguinte, para ser entendida como abrangendo todos esses regimes de tratamento simultâneo ou alternado e o termo "administração" é para ser interpretado em conformidade.

A dosagem eficaz de cada um dos parceiros da combinação empregues na COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO pode variar dependendo do composto ou composição farmacêutica particular utilizada, o modo de administração, da fase de CLL a ser tratada e a gravidade da condição a ser tratada.

Assim, o regime de dosagem da COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO é selecionado de acordo com uma variedade de fatores incluindo a via de administração e a função renal e hepática do paciente. Um médico, clínico ou veterinário de perícia vulgar pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz dos ingredientes ativos individuais necessárias para prevenir, contrariar ou parar o progresso da condição. A precisão óptima na obtenção da concentração dos ingredientes ativos dentro da gama que produz eficácia sem toxicidade requer um regime baseado na cinética da disponibilidade dos ingredientes ativos para os locais alvo. Isto envolve a consideração da distribuição, equilíbrio e eliminação dos ingredientes ativos.

CLB pode ser administrado numa gama de dosagem de 0,1 a 1 mg/kg/dia, de preferência, numa gama de dose de 0,2 a 0,8 mg/kg/dia. Mais preferencialmente, CLB é administrado a uma dose de 0,6 mg/kg/dia. Dependendo da espécie, idade, condição individual, o modo de administração, e do quadro clínico em questão, são administradas doses diárias de cerca de 50 a 1000 mg de nilotinib a animais de sangue quente com cerca de 70 kg de peso corporal.

A descrição refere-se também para um método para administrar, a um indivíduo humano que sofre de CLL, nilotinib ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

Quando os parceiros de combinação empregues na COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO são aplicados na forma como

comercializado como medicamentos simples, a sua dosagem e modo de administração podem tomar lugar de acordo com a informação fornecida no folheto da embalagem comercializada do respetivo fármaco, a fim de resultar no efeito benéfico aqui descrito, se não mencionado aqui de outra forma.

A COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO pode ser uma preparação combinada ou uma composição farmacêutica.

Além disso, a presente descrição refere-se à utilização de uma COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO para o tratamento da CLL e (de acordo com a invenção) para a preparação de um medicamento para o tratamento de CLL.

Além disso, a presente invenção refere-se para a utilização de CLB em combinação com nilotinib para a preparação de um medicamento para o tratamento de CLL.

Além disso, a presente invenção proporciona uma embalagem comercial compreendendo como ingredientes ativos COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO, em conjunto com instruções para uso simultâneo, separado ou sequencial do mesmo no tratamento de CLL.

**Exemplo I: Nilotinib sensibiliza linfócitos CLL para CLB****A-Material e Métodos**

**A-1) Isolamento de CLL.** Os linfócitos e cultura de células de linfócitos são isolados a partir do sangue

periférico de pacientes com CLL por centrifugação da sedimentação em Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suécia) tal como descrito anteriormente (Christodouloupolis G. et al., *Cancer Research*, 1999, 5:2178-84). Aliquotas contendo  $1 \times 10^6$  células/ml são enviados para análise de linfócitos T. A percentagem de contaminação dos linfócitos T é determinada utilizando análise de separação de células ativadas por fluorescência com o anticorpo CD3. A percentagem da contaminação de linfócitos T na população (expressos como a média  $\pm$  SE%) é de  $6,4 \pm 1,8$ .

A linha de células WSU é uma linha de células infóцитos B derivada de um doente com CLL (Mohammad RM, et al., *Leucemia* 1996, 10:130-7).

**A-2) Eficiência da placagem e de dosagem.** Os linfócitos e linfócitos WSU CLL são semeadas em placas de 96 poços em 200  $\mu$ l de suspensões contendo  $1,5 \times 10^6$  linfócitos/ml e  $1,25 \times 10^5$  células/ml, respetivamente, em meio RPMI suplementado com 10% de FBS. Só as respostas dose com eficiência de placagem linear são analisados. Os linfócitos são então incubados a 37 °C, na presença de várias concentrações de nilotinib (0-100  $\mu$ M) apenas, CLB (0-100  $\mu$ M), ou várias concentrações de ambos os fármacos em conjunto.

**A-3) Ensaio citotóxico.** O ensaio MTT é realizado 72 horas após plaqueamento tal como descrito anteriormente (Christodouloupolis G et al., *Cancer Research*, 1998,

58:1789-92) por adição de 20 µl de uma solução de 5mg/ml MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em meio RPMI a cada poço. A  $DL_{50}$  de CLB apenas, nilotinib sozinho ou CLB na presença de nilotinib é definido como sendo a concentração de fármaco necessária para reduzir a leitura de absorbância para 50% do valor de controlo. A percentagem de células sobreviventes após o tratamento relativamente às células tratadas (controlo) é calculada como (células tratadas OD/OD células não tratadas)×100. A sinergia é determinada pela fórmula:  $a/A + b/B = 1$ , onde a é a concentração de CLB necessária para produzir 50% de valores de controlo, em combinação com nilotinib concentração b; A é a concentração de CLB que produz um  $LD_{50}$  sem nilotinib; e B é a concentração do nilotinib que produz um  $LD_{50}$  na ausência de CLB. De acordo com a fórmula, quando  $I < 1$  a interação é sinérgica, quando  $I = 1$ , a interação é aditiva, e quando  $I > 1$  há uma interação antagônica.

**A-4) Análise Estatística às diferenças entre os valores médios é avaliada por t-teste de duas caudas.** Correlação e análise de regressão linear são realizadas utilizando o Statistical Package Tool do EXCEL.

### **Resultados**

Nilotinib possuía maior potência do que o imatinib na sensibilização de linfócitos CLL (16/19

amostras) para clorambucilo.

**Exemplo II**

**Pacientes.** Vinte e um pacientes com diagnóstico de B-CLL acompanhados no *Jewish General Hospital of Montreal* foram incluídos no estudo após consentimento informado. Os doentes ou foram clinicamente não tratado ( $n = 13$ ) ou tratado com CLB ( $n = 8$ ) por vários períodos de tempo.

**Ensaio de citotoxicidade.** Os linfócitos foram isolados a partir de sangue periférico utilizando Ficoll-Hyque (Pharmacia). A contaminação de linfócitos T na população isolada de linfócitos B foi  $2,30 \pm 2,07$  (expressos como a % média  $\pm$  dp e determinada por análise de citometria de fluxo). Os linfócitos CLL ( $3 \times 10^6$  células/ml) foram plaqueadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% FBS e incubadas na presença de várias concentrações (0-100  $\mu$ M) de imatinib (Novartis), nilotinib (Novartis), clorambucilo apenas (Sigma-Aldrich Co), ou em combinação, como indicado. As amostras de controlo foram incubadas com o maior volume de DMSO. O ensaio de MTT foi realizado 72 horas após o tratamento, como anteriormente descrito (Christodoulopoulos et al., *Cancer Res.*, 58: 1789-1792, 199835). A sinergia foi determinada pela fórmula:  $a/A + b/B = I$ , em que  $a$  é a CLB  $IC_{50}$  (concentração que resulta em 50% de controlo) em combinação com imatinib ou nilotinib concentração  $b$ ;  $Uma$  é o de CLB  $IC_{50}$  sem imatinib ou nilotinib; e  $B$  é a imatinib ou nilotinib  $IC_{50}$  na ausência de CLB. De acordo com a

fórmula, em que  $I < 1$ , a interação é sinérgica, quando a  $I = 1$ , a interação é aditiva, e quando  $I > 1$  encontra-se um interacção antagonista.

**A análise estatística.** A análise estatística pela ANOVA e teste t foram feitas com o software SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

### **Resultados**

Ambos os inibidores de c-abl sensibilizados linfócitos B-CLL para clorambucilo

Um total de 21 pacientes com CLL foi registado neste estudo. Treze pacientes estavam clinicamente tratada (pacientes 1 a 13) e oito receberam terapia prévia com clorambucilo (pacientes tratados 14 a 21). A idade mediana foi de 72 anos (variação 45 a 90 anos) e sua contagem de leucócitos mediana foi  $83,7 \times 10^9$  células/litro (faixa  $32,87 \times 10^9$  para  $256,27 \times 10^9$  células/litro).

O ensaio MTT foi utilizado para determinar a citotoxicidade do CLB sozinho, imatinib sozinho, nilotinib sozinhos ou a combinação de CLB com 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  de imatinib ou nilotinib em linfócitos de pacientes com CLL.

Quando usado em 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$ , nilotinib sensibilizadas linfócitos CLL (sinérgicos mais efeito aditivo) a CLB em 84,6%, 100% e 90,5% dos pacientes

testados, respectivamente, enquanto o imatinib sensibilizados apenas 66,7%, 68,4% e 36,8% de estas amostras a CLB em concentrações semelhantes. Curiosamente, a sensibilização dos linfócitos B-CLL com CLB é estatisticamente mais potente, com 5 ou 10  $\mu$ M de nilotinib com imatinib (figura).

Além disso, cinco dos vinte e um pacientes foram selecionados em sua capacidade de sensibilizar os linfócitos B-CLL a CLB. Usando o ensaio de MTT, foi avaliado o efeito do nilotinib e imatinib na CLB citotoxicidade em linfócitos B malignas provenientes destes cinco doentes. O I-R, I  $<1$  ou I  $> 1$ , indica que o CLB e os inibidores de c-abl atuam sinergicamente ou antagonisticamente, respectivamente.

Tabela:

Paciente	CLB IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Nilotinib IC <sub>50</sub>	Imatinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CLB + 5 $\mu$ M nilotinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Sinergia Valor I	CLB + 5 $\mu$ M imatinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Sinergia Valor I
9	11,68	> 100	43,32	8,19	0,70	12,43	1,18
14	8,10	33,16	42,07	<2,5	0,38	6,07	0,87
15	49,69	19,92	37,92	41,06	1,08	66,60	1,47
16	4,54	9,61	14,22	<2,5	0,68	3,51	1,12
18	66,02	28,73	38,35	37,13	0,69	55,56	1,00

Conclusão: agora demonstrar que nilotinib, um inibidor de c-abl mais potente do que o imatinib, tem uma maior eficácia para sinergizar CLB citotoxicidade em linfócitos B-CLL.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Uma combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial que compreende (a) agente danificador de DNA e (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]-amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(tri-flurometil)-fenil] benzamida, na qual os ingredientes ativos (a) e (b) estão presentes em cada caso na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável, e em que o agente danificador de DNA é clorambucilo.

2. A combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o composto (b) é utilizado na forma do seu mono-hidrato de mono-cloridrato.

3. Uma combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, para utilização num método de tratamento de leucemia linfocítica crónica.

4. A combinação de acordo com a reivindicação 3, em que a utilização é num método de tratamento de leucemia linfocítica crónica que é resistente a clorambucilo.

5. Uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, e pelo menos um portador farmaceuticamente aceitável.

6. Um pacote comercial que compreende uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, em conjunto com instruções para uso simultâneo, separado ou sequencial do mesmo no tratamento de leucemia linfocítica crónica.

Lisboa, 20 de maio de 2014

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- US 20060122186 A
- WO 0305454 W
- US 3046301 A
- WO 04005281 A
- WO 2007015670 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- KALIL, N.; CHESON, B.B. *The Oncologist*, 1998, vol. 4, 353-369
- CHRISTODOULOPOLIS G. et al. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 1789-92
- CHRISTODOULOPOLIS G. et al. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 1788-84
- CHRISTODOULOPOLIS G. et al. *Cancer Res*, 05 March 1998, vol. 58, 1789-1792
- MOHAMMAD R.M. et al. *Leukemia*, 1998, vol. 10, 130-7