



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

(21) PI 0808494-7 A2



(22) Data de Depósito: 05/03/2008
(43) Data da Publicação: 22/07/2014
(RPI 2272)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/50

(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA
QUANTIDADE DE TAXANO CONJUGADO EM
CONJUGADO DE ÁCIDO POLIGLUTÂMICO-TANAXOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/03/2007 EP 07 004574.5

(73) Titular(es): Cell Therapeutics Inc.

(72) Inventor(es): Holly Spoonemore, Keith Hovda, Luigi Siviero,
Marc McKennon, Stefano Fazioni, Valeria Livi

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008001746 de
05/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/107174de
12/09/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE TAXANO CONJUGADO EM CONJUGADO DE ÁCIDO POLIGLUTÂMICO-TANAXOS"**.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 Paclitaxel (disponível no mercado como Taxol[®] Injection) é o protótipo de taxanos quimioterapêuticos, que se ligam a β -tubulina, promovem a montagem desta proteína em microtúbulos e as estabiliza, causando eventualmente morte da célula. Paclitaxel poliglumex (PPX, nome químico N-(L-pirolglutamil)-[poli(L-glutamil)]-L-ácido glutâmico parcialmente
10 γ -esterificado com (2'R,3'S)-3'-benzoilamido-1'-[[4,10 β -bis(acetóxi)-2 α -(benzoilóxi)-1,7 β -dihidróxi-9-oxo-5,20-epoxitax-11-en-13 α -il]óxi]-1'-oxo-3'-fenilpropan-2'-ol), daqui por diante referido como PPX, é o éster conjugado de α -poli-L-ácido glutâmico (PGA) e paclitaxel, em que o último é covalentemente ligado ao PGA através da posição 2'-hidróxi.

15 PPX está atualmente sob estudo para uso em câncer de pulmão de célula não-pequena (NSCLC) e câncer ovariano. Paclitaxel é liberado após tomada superior e degradação proteolítica/hidrolítica do conjugado em um tecido de tumor.

A fórmula molecular e peso molecular de PPX são distribuições
20 porque o grau de polimerização de α -poli-L-ácido glutâmico e o número de locais de conjugação com paclitaxel varia de acordo com o processo de fabricação. A massa molecular média de PPX é aproximadamente 40.000 Daltons, determinada por cromatografia de permeação de gel não-aquoso com detecção por difusão de luz de laser de multiângulo. Aproximadamente 35%
25 por peso de paclitaxel está presente na forma ligada no conjugado, cujas quantidades a cerca de uma ligação de paclitaxel éster por 11 unidades de monômero. Métodos para a síntese de PPX são descritos na publicação PCT WO97/33552.

Entre os testes de manufaturamento a serem realizados no PPX,
30 ambos como ingrediente ativo e como produto farmacêutico acabado, ensaios para a quantificação de paclitaxel conjugado e impurezas baseadas em taxano relacionadas são prescritos. Contudo, o ultimo ensaio não pode ser

efetuado em PPX como tal e deesterificação é requerida para liberar paclitaxel. Tetrahedron Letters, (1995), 36(12), 2001-2004 descreve um procedimento para a clivagem hidrolítica de vários ésteres de paclitaxel usando misturas básicas de peróxido de hidrogênio/tetra-hidrofurano, em que o 2'-acetato de peracetilado paclitaxel é hidrolisado mais rápido do que a posição 10-acetila. Quando este método é aplicado a paclitaxel, o produto reportado é 10-deacetilpaclitaxel (10-DAT). Um procedimento conhecido inicialmente empregado para a quantificação de paclitaxel conjugado e impurezas de taxano relacionadas em PPX compreende hidrólise aquosa exaustiva de PPX com bicarbonato de sódio/peróxido com extração concomitante de paclitaxel e impurezas de taxano relacionadas em CHCl_3 e quantificação por HPLC. A adição de CHCl_3 como uma segunda fase permite extração dos taxanos liberados imediatamente após hidrólise, prevenindo muita da formação de 10-DAT. A reação de hidrólise, contudo, causa degradação significativa de paclitaxel, principalmente para 10-deacetil-paclitaxel (10-DAT) e 20% de níveis de 10-DAT foram comuns usando este método, como o sistema bifásico não suprime completamente hidrólise na posição 10. Como um resultado, os picos de ambos paclitaxel e 10-DAT são quantificados juntos e reportados como paclitaxel+10-DAT. Para ser capaz de corrigir a quantidade de paclitaxel+10-DAT obtida a partir do método de hidrólise para paclitaxel total somente, um segundo método usando quantificação de NMR necessita ser realizada para quantificar a quantidade de 10-DAT inerente de conjugado. Desse modo, a formação de produtos de degradação e a mudança do perfila de taxano conjugado é um problema claro deste procedimento. Além disso, as condições cromatográficas não são específicas para a degradação do composto.

Existe, portanto, a necessidade de um método aperfeiçoado para a quantificação de PGA-conjugado paclitaxel e outros conjugados PGA-taxano.

30 Descrição detalhada da invenção

Consequentemente, a presente invenção refere-se a um método para determinação da quantidade de taxano conjugado em conjugados

PGA-taxano que compreende a hidrólise do conjugado em um meio não-aquoso, usando um derivado de hidrazina no lugar do ânion hidroperóxido.

Em mais detalhes, o método da invenção compreende a reação de um conjugado de PGA-taxano com um composto de fórmula (I):



(I)

em que

R^1 e R^2 são independentemente selecionados de C_1 - C_{10} -alquila, C_1 - C_{10} -hidroxialquila, C_3 - C_{10} alquenila, C_3 - C_{10} -hidroxialquenila, C_3 - C_{10} -alquinila, C_3 - C_{10} -hidroxialquinila, arila, heteroarila; ou R^1 e R^2 tomados juntos com o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados formam um anel heterocíclico 3-8 membrado opcionalmente contendo até três heteroátomos selecionados de O, S e N e opcionalmente substituídos com até dois grupos hidróxi;

15 para dar taxanos não-ligados e uma PGA-hidrazida, seguido por determinação do taxano não-ligado.

Para a proposta da presente invenção, um conjugado de PGA-taxano é um α -poli-L-ácido glutâmico (PGA) em que um ou mais grupos γ -carbóxi da subunidade de repetição de ácido glutâmico são esterificados com uma molécula de taxano através do grupo 2'-hidróxi do último. Tipicamente, PGA contém de 60 a 310 unidades de monômero e tem uma massa molecular variando de 8.000 a 40.000 Dalton. Um PGA-hidrazida é uma hidrazida resultante da reação dos grupos de éster que ligam os grupos 2'-hidróxi do taxano para os grupos γ -carbóxi das unidades de repetição de ácido glutâmico de PGA no conjugado de PGA-taxano com a hidrazina de fórmula (I). Na PGA-hidrazida, o nitrogênio do grupo amino primário do composto de fórmula (I) é ligado ao carbonil do grupo γ -carbóxi da unidade de repetição de ácido glutâmico de PGA.

Conforme aqui usado, taxano significa paclitaxel, docetaxel, ou outros taxanos que podem ou serem isolados de fontes naturais tal como a árvore Yew, ou de cultura de célula, ou quimicamente sintetizados, tais como 10-deacetilpaclitaxel, 7-epipaclitaxel, cealomanina, 7-epi-cealomanina, e N-

debenzoil-N-fenilacetilpaclitaxel. O taxano mais preferido é paclitaxel.

Conforme aqui usado, o termo " C_1 - C_{10} -alquila" refere-se a um grupo hidrocarboneto saturado reto ou ramificado contendo de 1 a cerca de 10 átomos de carbono, tal como metila, etila, propila (por exemplo, n-propila e isopropil), butila (por exemplo, n-butila, isobutila, s-butila, t-butil), pentil (por exemplo, n-pentila, isopentila, neopentil), e similares.

Conforme aqui usado, o termo " C_1 - C_{10} -hidroxialquila" refere-se a um grupo C_1 - C_{10} -alquila que pode ser substituído por até três grupos hidroxila.

Conforme aqui usado, o termo " C_3 - C_{10} -alquenila" refere-se a um grupo alquila que contém de 3 a cerca de 10 átomos de carbono e tendo uma ou mais ligações carbono-carbono duplas. Exemplos de grupos alquenila incluem etenila, propenila, butenila, pentenila, hexenila, butadienila, pentadienila, hexadienila, e similares.

Conforme aqui usado, o termo " C_3 - C_{10} -hidroxialquenila", refere-se a um grupo C_3 - C_{10} -alquenila que pode ser substituído com até três grupos hidroxila nos átomos de carbono não-engajados em ligações duplas carbono-carbono.

Conforme aqui usado, " C_3 - C_{10} -alquinila" refere-se a um grupo alquila contendo de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, e tendo uma ou mãos ligações triplas carbono-carbono. Exemplos de grupo alquinila incluem etinila, propinila, butinila, pentinila, e similares.

Conforme aqui usado, o termo " C_3 - C_{10} -hidroxialquinila" refere-se a um grupo C_3 - C_{10} -alquinila que pode ser substituído com até três grupos hidroxila nos átomos de carbono não-engajados em ligações triplas carbono-carbono.

Conforme aqui usado, o termo " C_1 - C_3 -alquila" refere-se a um grupo hidrocarboneto saturado reto ou ramificado contendo de 1 a 3 átomos de carbono.

Conforme aqui usado, o termo " C_1 - C_3 -halogenoalquila" refere-se a um grupo C_1 - C_3 -alquila substituído com até três átomos de halogênios (isto é, F, Cl, Br, I).

Conforme aqui usado, o termo "C₁-C₃-alcóxi" refere-se a grupos O-C₁-C₃-alquila tais como metóxi, etóxi, n-propóxi e isopropóxi.

Conforme aqui usado, o termo "C₁-C₃-tioalcóxi" refere-se a grupos S-C₁-C₃-alquila, isto é, metiltio, etiltio, n-propiltio e isopropiltio.

5 Conforme aqui usado, "arila" refere-se a grupos carbociclila aromáticos incluindo hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos ou policíclicos, tais como fenila, naftila, antracenila, fenantrenila, indanila, indenila, e similares, que podem ser opcionalmente substituídos com halogênio, C₁-C₃-alquila, C₁-C₃-halogenoalquila, C₁-C₃-alcóxi, C₁-C₃-tioalcóxi, ou grupos nitro.

10 Conforme aqui usado, grupos "heteroarila" são grupos heterocarbociclila aromático e incluem hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos e policíclicos contendo pelo menos um membro de anel heteroátomo, tais como enxofre, oxigênio, ou nitrogênio, e que podem ser opcionalmente substituídos com grupos halogênio, C₁-C₃ alquila, C₁-C₃-halogenoalquila, C₁-C₃-alcóxi, C₁-C₃-tioalcóxi, ou nitro. Grupos heteroarila incluem piridila, pirimidini-
15 la, pirazinila, piridazinila, triazinila, furila, quinolila, isoquinolila, tienila, imidazolila, tiazolila, indolila, pirrolila, oxazolila, benzofurila, benzotienila, benzotiazolila, isoxazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolil indazolila, 1,2,4-tiadiazolila, isotiazolila, benzotienila, purinila, carbazolila, benzimidazolila, e similares.

20 Exemplos de compostos de fórmula (I) que podem serem usados vantajosamente para efetuar a invenção incluem N,N-dimetil-hidrazina, fenil-hidrazina, 4-bromofenil-hidrazina, 4-isopropilfenil-hidrazina, 4-metoxifenil-hidrazina, 1-metil-1-fenil-hidrazina, 1-aminopirrolidina, 1-amino-2,6-dimetilpiperidina, 1-amino-cis-2,6-dimetilpiperidina, (S)-(-)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, (R)-(+)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, 4-
25 aminomorfolina, 1-aminopiperidina, 1-amino-4-metilpiperazina, 1-amino-4-(2-hidroxietyl)piperazina, 1-amino-homopiperidina. Reagentes preferidos são N,N-dimetil-hidrazina, fenil-hidrazina, 4-aminomorfolina e 1-aminopiperidina, o mais preferido sendo 4-
30 aminomorfolina.

A reação entre o conjugado de PGA-taxano e (I) é efetuada em um solvente orgânico aprótico, tais como dimetilformamida, dimetilsulfóxido,

N-metilpirrolidinona e similares. De acordo com uma concretização preferida da invenção, uma amostra de PPX ou de um medicamento contendo PPX é dissolvido ou suspenso em dimetilformamida ou dimetilsulfóxido para proporcionar uma concentração de PPX entre 25 e 52 mg/ml, em seguida 4-aminomorfolina ou uma solução de 4-aminomorfolina em ácido trifluoroacético é adicionado. A proporção entre a solução de PPX e 4-aminomorfolina/ácido trifluoroacético está entre 1:0,3 v/v e 1:0,5 v/v. A mistura é agitada a uma temperatura entre cerca de 20°C e cerca de 42°C por um tempo variando de cerca de 2 horas a cerca de 24 horas.

10 A determinação do taxano não-ligado pode ser efetuada por HPLC ou por quaisquer outros métodos conhecidos na técnica para a análise quantitativa de taxanos.

De acordo com uma concretização preferida da invenção, uma amostra de PPX ou de um medicamento contendo PPX é dissolvida em dimetilsulfóxido para proporcionar uma concentração de PPX entre 48 e 52 ng/ml e uma solução de 4-aminomorfolina em ácido trifluoroacético é adicionado em que a proporção de ácido trifluoroacético para 4-aminomorfolina é 0,017:1 v/v. A proporção de solução de PPX para 4-aminomorfolina/ácido trifluoroacético é 1:0.5 v/v. A mistura é agitada e temperatura e tempo de reação são monitorados até que aproximadamente 2% a 7% do taxano conjugado é liberado. Preferivelmente, a temperatura é mantida na faixa de cerca de 38 a 42°C, e o tempo de reação varia de cerca de 1,9 a cerca de 2,1 horas. Dentro destas faixas, o perfil de pureza não muda como uma função de conversão. Após adição de acetonitrila, a solução é ultrafiltrada por centrifugação para remover o polímero não-reagido e, em seguida, injetada diretamente em uma coluna de HPLC para determinar a área de percentagem de paclitaxel e de cada impureza de taxanos. Fatores de resposta de UV reportados no USP ou calculados são aplicados para transformar a % de área de impurezas conhecidas em p/p% relativo para paclitaxel; a quantidade de outras impurezas desconhecidas é ao invés calculada como % área. A pureza de Paclitaxel é calculada por subtração da soma de todas as impurezas de 100%.

As condições de reação moderadas do método da invenção reduzem a quantidade de degradação de paclitaxel de cerca de 20% a menos do que 0,5%, e permitem a quantificação de 10-DAT acima de 0,2%, eliminado, desse modo, a necessidade de quantificação de NMR.

5 A invenção será agora ilustrada em maiores detalhes por meio dos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

Para demonstrar a precisão e sensibilidade do método da invenção, paclitaxel foi perfurado com uma quantidade conhecida (10% p/) de três taxanos quimicamente diferentes e, em seguida, conjugado para α -poli-(L)-ácido glutâmico em quantidade de 37% p/p. Dois dos três taxanos eram impurezas sintéticas (cefalomannina e 7-epi-cefalomannina), o terceiro era uma impureza de degradação (7-epipaclitaxel). Três níveis de perfuração diferentes (1,2%, 9,8%, 28% p/p) foram investigados para cada taxano na faixa
10 dentro do limite de quantificação e o limite de especificação superior. Todas as três impurezas foram recuperadas em quantidade entre 100% e 115%, que era, de fato, para ser aceito para o uso pretendido do método. Um exemplo representativo deste experimento é dado no Exemplo 1. A análise de liberação de rotina de uma batelada de PPX é reportada no Exemplo 2.

20 Exemplo 1

Uma solução de conjugado de paclitaxel/7-epipaclitaxel foi preparada por pesagem precisa de 350 ± 5 mg do conjugado em um frasco de 10 mL e dissolvendo com dimetilsulfóxido. A solução foi diluída a volume com o mesmo solvente. $250 \pm 2,5$ mg de PPX (Pharmaceutical Grade) foram
25 precisamente pesados em um frasco de 5 mL. 0,085 mL da solução de perfuração (correspondendo a um nível de perfuração de 1,2% w/w) foi adicionado no mesmo frasco e diluído a volume com dimetilsulfóxido. A reação de aminólise foi, em seguida, realizada de acordo com o procedimento geral dado no Exemplo 2, e analisada por HPLC. A recuperação de 7-epipaclitaxel
30 foi 110,7%.

Exemplo 2

250 mg de PPX (Active Pharmaceutical Ingredient), precisamen-

te pesado, foram transferidos em um frasco de 5 mL. Após dissolução com dimetilsulfóxido a amostra foi diluída a volume com o mesmo solvente. 1,0 mL desta solução foi transferido em um frasco de fundo cônico de 5 mL. Uma barra de agitação magnética triangular foi colocada em cada frasco, e

5 0,5 mL de uma solução compreendida de ácido trifluoroacético e 4-aminomorfolina em uma proporção de 0,017:1 (0,034 mL de TFA adicionado a 2,0 mL de 4-aminomorfolina) foram adicionados. O frasco foi apertadamente tampado, colocado em banho de água de agitação termostataado a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitado por $2 \pm 0,1$ horas. No final da reação o frasco foi permitido

10 resfriar vagarosamente à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos antes da adição de 0,75 mL de acetonitrila. Após mistura, a amostra foi transferida para filtros de centrífuga (corte de massa molecular= 10,000 daltons) e centrifugada por 1 hora a 3000 x g. 1 mL da amostra foi transferido para um frasco de HPLC, adicionado com 10 μL de ácido acético glacial, e analisado

15 por HPLC para a determinação do teor de taxano usando uma coluna Zorbax 300SB-C8, 4,6 x 100 mm 3,5 μm , Agilent Cat. N°. 861973-906, mantido a 40°C e eluindo com uma mistura de gradiente de água/acetonitrila de 20% de acetonitrila/80% de água para 90% de acetonitrila 10% de água em 60 minutos, com detecção de UV a 227 nm.

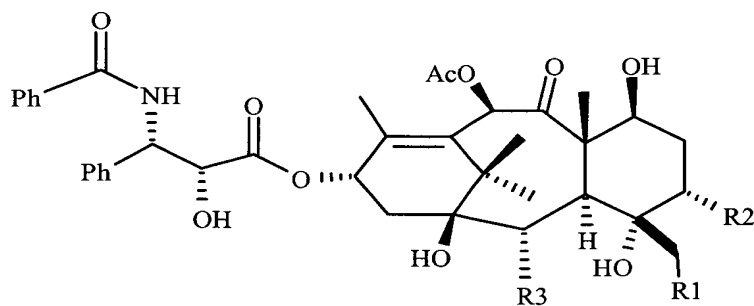
20 Os resultados (média de seis réplicas e expressos como área % corrigida para o Fator de Resposta Relativo) são reportados na Tabela 1.

Tabela 1.

	<i>Taxano</i>	<i>Área% corrigida para RRF</i>
	Baccatin III:	Nível de Reportação Abaixo
25	10-DAT:	0,24%
	Cefalomanina:	0,22%
	OR1:	Nível de Reportação Abaixo
	OR2 + OR3	0,39%
	7-epi-10-Deacetylpaclitaxel:	Nível de Reportação Abaixo
30	Paclitaxel:	98,80%
	7-epi-Paclitaxel:	0,16%
	Desconhecido (RRT 1.13):	Nível de Reportação Abaixo

Desconhecido (RRT 1.28): Nível de Reportação Abaixo

As impurezas indicadas como OR₁, OR₂ e OR₃ são conjugados entre α-poli-(L)-ácido glutâmico e taxanos tendo a seguinte fórmula:



OR1: R1 = OAc, R2 = OH, R3 = OBz

OR2: R1 = OH, R2 = OAc, R3 = OBz

OR3: R1 = OBz, R2 = OAc, R3 = OH

5

Fórmula

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinação da quantidade de taxano conjugado em um conjugado ácido poliglutâmico-taxano em que uma ou mais moléculas de taxano são ligados através da posição 2'-hidróxi ao grupo γ -carbóxi de α -poli-L-ácido glutâmico
- 5 referido método compreendendo as etapas de:
- a) reação do conjugado de ácido poliglutâmico-taxano com um composto de fórmula (I):
- $$R^1R^2N-NH_2$$
- 10 (I)
- em que
- R^1 e R^2 são independentemente C_1 - C_{10} -alquila, C_1 - C_{10} -hidroxialquila, C_3 - C_{10} -alquenila, C_3 - C_{10} -hidroxialquila, C_3 - C_{10} -alquinila, C_3 - C_{10} -hidroxialquinila, arila, heteroarila; ou R^1 e R^2 tomados juntos com o átomo de nitrogênio ao qual
- 15 eles estão ligados de um anel heterocíclico 3-8 membrado opcionalmente contendo até três heteroátomos selecionados de O, S e N e, opcionalmente substituídos com até dois grupos hidróxi;
- Para dar um taxano não-ligado e um poliácido glutâmico hidrazida; e
- 20 b) determinação da quantidade de taxano não-ligado.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade de taxano não-ligado é determinada por HPLC.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o taxano é selecionado de paclitaxel, docetaxel, 10-deacetilpaclitaxel, 7-
- 25 epipaclitaxel, cefalomanina, 7-epi-cefalomanina, e N-debenzoil-N-fenilacetilpaclitaxel.
4. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 3, em que o taxano é paclitaxel.
5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
- 30 4, em que o composto de fórmula (I) é selecionado de N,N-dimetil-hidrazina, fenil-hidrazina, 4-bromofenil-hidrazina, 4-isopropilfenil-hidrazina, 4-metoxifenil-hidrazina, 1-metil-1-fenil-hidrazina, 1-aminopirrolidina,

1-amino-2,6-dimetilpiperidina, 1-amino-cis-2,6-dimetilpiperidina, (S)-(-)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, (R)-(+)-1-amino-2-(metoximetil)pirrolidina, 4-aminomorfolina, 1-aminopiperidina, 1-amino-4-metilpiperazina, 1-amino-4-(2-hidroxietil)piperazina e 1-amino-homopiperidina.

5 6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o composto de fórmula (I) é selecionado de N,N-dimetil-hidrazina, fenil-hidrazina, 4-aminomorfolina e 1-aminopiperidina.

10 7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o composto de fórmula (I) é 4-aminomorfolina.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que a etapa a) é efetuada em dimetilformamida ou dimetilsulfóxido à uma temperatura variando de 20 a 42°C.

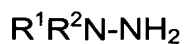
15 9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que a reivindicação a) é efetuada em dimetilsulfóxido à uma temperatura entre 38 e 42°C.

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE TAXANO CONJUGADO EM CONJUGADO DE ÁCIDO POLIGLUTÂMICO-TANAXOS".

5 A presente invenção refere-se a um método para determinação da quantidade de taxano conjugado, em particular, paclitaxel, em um conjugado de PGA-taxano, referido método compreendendo:

a) reagir o conjugado de PGA-taxano com um composto de fórmula (I):



10 (I)

em que

R^1 e R^2 são conforme definidos na descrição;

para dar um taxano não-ligado e um PGA hidrazida, e

b) determinação da quantidade de taxano não-ligado.