



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 122023025347-7 A2

(22) Data do Depósito: 10/06/2016

(43) Data da Publicação Nacional:
02/04/2019

(54) Título: SAL DE MEGLUMINA OU TROMETAMINA DE UM COMPOSTO, FORMAS CRISTALINAS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DOS MESMOS E SEUS USOS

(51) Int. Cl.: C07D 277/34; C07D 277/36; C07D 417/06; A61K 31/425.

(30) Prioridade Unionista: 06/01/2016 US 62/275,655; 12/06/2015 US 62/175,066.

(71) Depositante(es): GB006, INC..

(72) Inventor(es): ANTONIO J.M. BARBOSA.

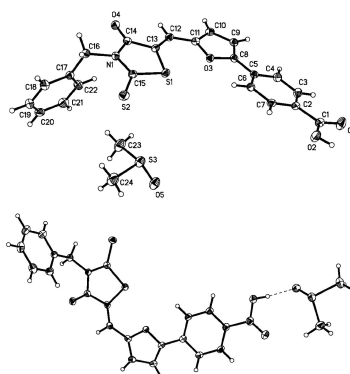
(86) Pedido PCT: PCT US2016037067 de 10/06/2016

(87) Publicação PCT: WO 2016/201356 de 15/12/2016

(85) Data da Fase Nacional: 01/12/2023

(62) Pedido original do dividido: BR112017026406-4 - 10/06/2016

(57) Resumo: SAL DE MEGLUMINA OU TROMETAMINA DE UM COMPOSTO, FORMAS CRISTALINAS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DOS MESMOS E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a novos sais e formas cristalinas de LA1 de leucaderina [ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-Oxo-2-tioxotiazolidin-5-ildeno)metilfuran-2-il)benzoico] de acordo com a fórmula 1. Métodos para a preparação dos sais e formas cristalinas são também descritos, bem como métodos para o tratamento de doenças e condições mediadas por (BETA)2 integrina usando os sais e formas cristalinas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SAL DE MEGLUMINA OU TROMETAMINA DE UM COMPOSTO, FORMAS CRISTALINAS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DOS MESMOS E SEUS USOS"**.

Dividido do BR112017026406-4, depositado em 10.06.2016.

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica a prioridade ao Pedido de Patente Provisória dos Estados Unidos No. 62/175.066, depositado em 12 de junho de 2015, e Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos 62/275.655, depositado em 6 de janeiro de 2016, cujos pedidos são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO SOBRE DIREITOS A INVENÇÕES FEITAS SOB PESQUISA E DESENVOLVIMENTO FEDERALMENTE PATROCINADOS

[0002] A presente invenção foi feita com fundos fornecidos por NIAID Advanced Technology SBIR (NIAID-AT-SBIR [R43/R44]) Grant # 1 R43 AI100499-01A1. O governo dos Estados Unidos tem certos direitos na invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

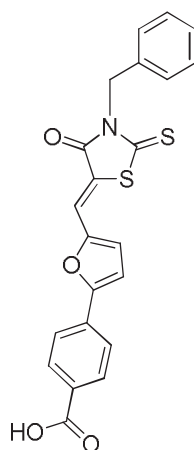
[0003] Ativação, migração e recrutamento de leucócito (isto é, glóbulos brancos) são essenciais para a resposta imune à lesão e infecção, bem como em vários distúrbios inflamatórios e autoimunes. As $\beta 2$ integrinas, uma subfamília de receptores de α/β integrina heterodimérica incluindo integrina altamente expressa CD11b/CD18, são receptores específicos de leucócito que modulam as funções de leucócito incluindo adesão, migração, recrutamento e ativação celular. CD11b/CD18 reconhece o fragmento de complemento iC3b, Fibrinogênio, e ICAM-1 como ligantes, entre vários outros. CD11b/CD18 foi implicado em muitas doenças inflamatórias e autoimunes, tais como lesão de reperfusão-isquemia (incluindo insuficiência renal aguda e aterosclerose), lúpus, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, artrite reuma-

toide, esclerose múltipla, nefrite lúpica, glomerulosclerose segmental focal, lesão renal, dano tecidual, glaucoma, condições oftálmicas, rejeição de aloenxerto (tal como como nefropatia), transplante, doença do enxerto versus hospedeiro, acidente vascular cerebral, espessamento neoíntimo em resposta à lesão vascular, e a resolução de processo inflamatório.

[0004] $\beta 2$ integrinas leucocíticas também contribuem para os processos incluindo crescimento de tumor, recrescimento de tumor, metástases de tumor, infiltração de tumor, potenciação de doenças inflamatórias e autoimunes, produção de espécie de oxigênio reativo, e modulação de diversos genes pró e anti-inflamatórios em células inflamatórias. O bloqueio de $\beta 2$ integrinas, incluindo CD11b/CD18, e seus ligantes mostrou diminuir a gravidade de resposta inflamatória *in vivo* em certos modelos experimentais. Entretanto, tais agentes de bloqueio tiveram pouco sucesso no tratamento de doenças inflamatórias/autoimunes em seres humanos.

[0005] Mais recentemente, novos métodos e composições anti-inflamatórias e métodos foram desenvolvidos usando compostos que ativam as integrinas e reduzem o recrutamento de células imunes inflamatórias em tecidos aumentando a adesão celular dependente de CD11b/CD18 a ligantes imobilizados. Leucaderinas são um grupo de tais agonistas de molécula pequena que alvejam a integrina CD11b/CD18 (Maiguel, *et al.* 2011. *Sci. Signal.* 4:1–14; Park, *et al.* 2007. *J. Biomol. Screen.* 12:406–417; Faridi, *et al.* 2009. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19:6902–6906.). As leucaderinas também reduzem a ativação de leucócito e séries de reação de sinalização pró-inflamatória ou de ativação de leucócito. Entre elas, a leucaderina 1 ("LA1;" ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-oxo-2-tioxothiazolidin-5-ilideno)metil)furan-2-il)benzoico; Fórmula I, abaixo) demonstrou eficácia anti-inflamatória particular. LA1 mostrou reduzir o recrutamento de leucócitos durante a

peritonite em camundongos, reduzir o espessamento neoíntimo na lesão vascular em ratos, e reduzir isquemia renal/lesão de reperfusão em camundongos. LA1 e usos dos mesmos foram descritos na Patente dos Estados Unidos No. 9.023.876 bem como nos Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2011/034753 e PCT/US2013/037548, cujos pedidos são incorporados aqui por referência em sua totalidade.



Fórmula I

[0006] Formulações melhoradas de LA1 são necessárias também aproveitar a utilidade que LA1 exibiu nos estudos delineados acima. Perfis de dissolução melhorados, perfis farmacocinéticos, e/ou perfis de estabilidade fornecidos por novas formulações são esperados realçar a eficácia e possibilitar formas de dosagem vantajosas. A presente invenção fornece novos sais e formas cristalinas que atendem a necessidade de formulações de LA1 melhoradas.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Em um aspecto, a presente invenção fornece sais de LA1 [ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ilideno)metil)furan-2-il)benzoico] e formas cristalinas dos mesmos. As formas cristalinas de sais de LA1 incluem: uma forma cristalina G de um sal de colina de um composto de Fórmula I como descrito aqui; uma forma cristalina O de um sal de colina de um composto de Fórmula I como descrito aqui; uma forma cristalina Q de um sal de colina de um composto de Fórmula I como descrito aqui; uma forma cristalina H de um sal de meglumi-

na de um composto de Fórmula I como descrito aqui; e uma forma cristalina T de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I como descrito aqui. Em aspectos relacionados, a invenção fornece métodos para preparação dos sais e formas cristalinas como descrito aqui, bem como formulações farmacêuticas contendo pelo menos um sal ou forma cristalina como descrito aqui e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0008] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para o tratamento de uma condição mediada por $\beta 2$ integrinas. Os métodos incluem administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal ou forma cristalina, como descrito aqui a um paciente em necessidade da mesma.

[0009] Os sais e formas cristalinas da invenção, bem como outros aspectos, objetivos, e vantagens associados com eles, tornar-se-ão mais evidentes quando lidos com a descrição detalhada e figuras que seguem.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0010] Fig. 1 mostra a estrutura cristalina de raio X para o solvato de DMSO de LA1, Forma B.

[0011] Fig. 2 mostra um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) obtido para ácido livre de LA1, Forma A.

[0012] Fig. 3 mostra dados de análise diferencial termogravimétrica-térmica (TG-DTA) para o ácido livre de LA1.

[0013] Fig. 4 mostra um termograma de calorimetria de varredura diferencial (DSC) registrado para o ácido livre de LA1.

[0014] Fig. 5 mostras os padrões de XRPD obtido para LA1 cristalina desordenada, Forma A (Fig. 5A) e sal de colina de LA1, Forma G (Fig. 5B).

[0015] Fig. 6 mostras os padrões de XRPD para: sal de bicarbonato de LA1 (Fig. 6 A); sal de meglumina de LA1, Forma H (Fig. 6 B);

sais de trometamina de LA1 (Fig. 6 C e Fig. 6 D); e sal de colina de LA1, Forma O (Fig. 6E).

[0016] Fig. 7 mostra um padrão de XRPD obtido para o sal de colina de LA1, Forma R.

[0017] Fig. 8 mostra um padrão de XRPD obtido para o sal de colina de LA1, Forma S.

[0018] Fig. 9 mostras os padrões de XRPD obtido para os sólidos desordenados: sal de LA1 (Fig. 9A); sal de cálcio de LA1 (Fig. 9B); sal de magnésio de LA1 (Fig. 9C); sal de sódio de LA1 (Fig. 9D); sal de potássio de LA1 (Fig. 9E); sal de amônio de LA1 (Fig. 9F); sal de cálcio de LA1 (Fig. 9G); sal de piperazina de LA1 (Fig. 9H).

[0019] Fig. 10 mostra os padrões de XRPD obtido para sais de colina e meglumina preparados em escala pequena: LA1 desordenado, Forma A (Fig. 10A); sal de colina de LA1 de etanol:terc-butil éter de metila (Fig. 10B); sal de colina de LA1 de acetona (Fig. 10 C); sal de colina de LA1, Forma Q, de acetato de etila (Fig. 10D); sal de meglumina de LA1, Forma T, de etanol (Fig. 10E).

[0020] Fig. 11 mostra um padrão de XRPD obtido para o sal de meglumina de LA1, Forma L.

[0021] Fig. 12 mostra um padrão de XRPD obtido para o sal de meglumina de LA1, Forma M.

[0022] Fig. 13 mostra um padrão de XRPD obtido para o sal de meglumina de LA1, Forma N.

[0023] Fig. 14 mostra os padrões de XRPD obtido para sais de colina e meglumina preparados em uma grande escala: sal de colina de LA1 de etanol (Fig. 14A); sal de colina de LA1 de etanol (Fig. 14B); sal de colina de LA1 de acetona (Fig. 14C); sal de meglumina de LA1 de etanol (Fig. 14D); sal de meglumina de LA1 de etanol (Fig. 14E).

[0024] Fig. 15 mostra um padrão de XRPD obtido para sais de meglumina de LA1 em vários solventes.

[0025] Fig. 16 mostra um padrão de XRPD obtido para sais de colina de LA1 em vários solventes.

[0026] Fig. 17 mostra a concentração vs. perfil de tempo de LA1 após administração oral de LA1 micronizada (2 mg/kg) a ratos Sprague Dawley.

[0027] Fig. 18 mostra concentração vs. perfis de tempo de LA1 após administração IP de LA1 (2 mg/kg), e LA1 liberada após administração IP de colina de LA1 (2 mg/kg) e meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratos Sprague Dawley.

[0028] Fig. 19 mostra concentração vs. perfis de tempo de LA1 após administração IV de LA1 (1 mg/kg), e LA1 liberada após administração IV de colina de LA1 (1 mg/kg) e meglumina de LA1 (1 mg/kg) a ratos Sprague Dawley.

[0029] Fig. 20 mostra a concentração vs. perfil de tempo de LA1 micronizada (1 mg/kg) administrada intravenosamente a cachorros beagle.

[0030] Fig. 21 mostra a concentração vs. perfil de tempo de LA1 micronizada (1 mg/kg) administrada oralmente a cachorros beagle.

[0031] Fig. 22 mostra a concentração vs. perfil de tempo de sal de colina de LA1 administrado oralmente (5 mg/kg) e intravenosamente (0.5 mg/kg) a cachorros beagle.

[0032] Fig. 23 mostra a progressão de melanoma em camundongos tratados com veículo, sal de meglumina de LA1, anticorpo de α -PD1, ou sal de meglumina de LA1 + anticorpo de α -PD1.

[0033] Fig. 24 mostra a progressão de melanoma em camundongos tratados com quantidades variáveis de sal de colina de LA1.

[0034] Fig. 25 mostra a progressão de melanoma em camundongos tratados com veículo, sal de colina de LA1 (3 mg/kg, p.o., b.i.d.), anticorpo de α -PD1 (100 μ g/mouse, i.p., a cada quatro dias), ou sal de colina de LA1 + anticorpo de α -PD1.

[0035] Fig. 26 mostra a progressão de melanoma em camundongos tratados com veículo, sal de colina de LA1 (3 mg/kg, p.o., b.i.d.), anticorpo de α -CTLA-4 (100 μ g/camundongo, i.p., a cada quatro dias), ou sal de colina de LA1 + anticorpo de α -CTLA-4.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Geral

[0036] A presente invenção fornece novos sais e formas cristalinas de leucaderina 1 (LA1; ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ildeno)metil)furan-2-il)benzoico). Estas novas formas de LA1 fornecem diversas vantagens, incluindo biodisponibilidade aumentada para formulações farmacêuticas oralmente administradas. Consequentemente, a invenção possibilita métodos melhorados para o tratamento de condições mediadas por β 2 integrina.

II. Definições

[0037] "LA1" refere-se ao composto ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ildeno)metil)furan-2-il)benzoico como mostrado na fórmula I.

[0038] "Sal" refere-se a um sal de adição de base preparado combinando ácido livre de LA1 com uma base farmacêuticamente aceitável.

[0039] "Farmacêuticamente aceitável" é reconhecido na técnica e, como usado aqui para referir-se a uma composição, excipiente, adjuvante, ou outro material e/ou forma de dosagem, refere-se a uma substância que, dentro do escopo médico seguro, é adequado para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outros problemas ou complicações, comensurável com uma relação de risco/benefício razoável. Exemplos de bases farmacêuticamente aceitáveis incluem, porém não são limitados a amônia, L-arginina, hidróxido de cálcio, colina, meglumina, lisina, hidróxido de magnésio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio.

[0040] "Colina" refere-se a 2-hidróxi-*N,N,N*-trimetiletanamônio. Um "sal de colina" é o sal contendo pelo menos um cátion de 2-hidróxi-*N,N,N*-trimetiletanamônio.

[0041] "Meglumina" refere-se a (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-6-(metilamino) hexano-1,2,3,4,5-pentol. A "sal de meglumina" é um sal contendo pelo menos um cátion de (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-penta-hidróxi-*N*-metilhexan-1-amínio.

[0042] "Forma cristalina" refere-se a uma forma sólida de um composto em que as moléculas constituintes são embaladas em um padrão de repetição regularmente ordenado. Uma forma cristalina pode ser triclinica, monoclinica, ortorrômbica, tetragonal, trigonal, hexagonal, ou cúbica. Uma forma cristalina pode conter uma ou mais regiões, isto é, grãos, com limites de cristal distintos. Um sólido cristalino pode conter duas, uma ou mais geometrias cristalinas.

[0043] "Integrina" refere-se a um receptor de superfície α/β -heterodimérica não covalentemente ligada que media a adesão, migração e sinalização celular. Integrinas são expressas em uma ampla faixa de organismos, incluindo *C. elegans*, *Drosophila* sp., anfíbios, répteis, pássaros, e mamíferos, incluindo humanos. Diversas subunidades α , designadas, por exemplo, αV , $\alpha 5$ e similares, e diversas subunidades β , designadas, por exemplo, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ e similares, foram identificadas, e várias combinações destas subunidades são representadas na superfamília de integrina, incluindo $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$. A superfamília de integrinas pode ser subdividida em famílias, por exemplo, como integrinas contendo αV , incluindo $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$, ou como integrinas contendo $\beta 1$, incluindo $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 1$.

[0044] " $\beta 2$ integrina" refere-se a uma integrina específica de leucócito tendo uma subunidade $\beta 2$ (também referida como CD18). $\beta 2$ integrinas têm subunidades α distintas selecionadas de CD11a, CD11b, CD11c e CD11d. $\beta 2$ integrinas, incluindo integrina altamente expressa

CD11b/CD18 (também conhecida como Mac-1, CR3 e $\alpha M\beta 2$), modulam as funções de leucócito, incluindo adesão, migração, recrutamento e ativação celular.

[0045] "Mediadas por $\beta 2$," como usado aqui, refere-se às doenças e/ou condições em um paciente, significa que a doença ou condição resulta (no total ou em parte) de um processo químico ou físico envolvendo uma $\beta 2$ integrina. Doenças e condições mediadas por $\beta 2$ incluem doenças inflamatórias e autoimunes. Exemplos de doenças e condições mediadas por $\beta 2$ incluem, porém não são limitados a, lesão de reperfusão-isquemia (incluindo insuficiência renal aguda e aterosclerose), lúpus, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, artrite reumatoide, esclerose múltipla, nefrite lúpica, glomerulosclerose segmental focal, lesão renal, glaucoma, condições oftálmicas, rejeição de aloenxerto (tal como nefropatia), transplante, doença do enxerto versus hospedeiro, distúrbios neurológicos, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, dermatite, lesão tecidual, acidente vascular cerebral, espessamento neoíntimo em resposta à lesão vascular, anti-GBM nefrite, dor (incluindo dor crônica), e cânceres, incluindo tumores primários e tumores metastáticos, tais como câncer de mama, melanoma, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer pancreático, e outros.

[0046] "Câncer" refere-se a um estado ou condição anormal caracterizada por crescimento celular rapidamente proliferante. Estados de doença neoplásicos e hiperproliferativos podem ser categorizados como patológicos, isto é, caracterizando ou constituindo um estado de doença, ou podem ser categorizados como não patológicos, isto é, um desvio de normal, porém não associado com um estado de doença. Em geral, um câncer será associado com a presença de um ou mais tumores, isto é, massas de célula anormal. O termo "tumor" destina-se a incluir todos os tipos de crescimento cancerosos ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células malignamente transformadas,

tecidos, ou órgãos, independente do tipo histopatológicos ou estágio de invasividade.

[0047] Exemplos de câncer incluem malignidades de vários sistemas de órgão, tais como cânceres de pulmão, cânceres de mama, cânceres de tireoide, cânceres de linfóide, cânceres gastrointestinais, e cânceres do trato genitourinário. Câncer pode também referir-se a adenocarcinomas, que incluem malignidades tais como cânceres de cólon, carcinoma de célula renal, câncer de próstata e/ou tumores testiculares, carcinoma de célula não pequena do pulmão, câncer do intestino delgado, e câncer do esôfago. Carcinomas são malignidades de tecidos epiteliais ou endócrinos incluindo carcinomas de sistema respiratório, carcinomas de sistema gastrointestinal, carcinomas de sistema genitourinário, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas de sistema endócrino, e melanomas. Um "adenocarcinoma" refere-se a um carcinoma derivado do tecido glandular ou em que as células de tumor formam estruturas glandulares reconhecíveis. Um "sarcoma" refere-se a um tumor maligno de derivação mesenquimatosa.

[0048] "Melanoma" refere-se a um tumor que se origina de melanócito. Melanomas ocorrem mais comumente na pele e são frequentemente observados metastatizar amplamente.

[0049] "Ponto de checagem imunológica" refere-se a uma série de reação regulatória que contribui para o controle coestimulatório ou inibitório de atividade de célula T em um organismo. A interação de "proteínas de ponto de checagem imunológica," incluindo proteínas nas superfícies de células de apresentação de antígeno e células T, contribuem para regulação e manutenção de autotolerância e a duração e amplitude de respostas imunológicas fisiológicas no organismo. Veja, por exemplo, D.M. Pardoll. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264 (2012). Exemplos de proteínas de ponto de checagem imunológica incluem,

porém não são limitados a, A2aR (receptor de adenosina A2a); BTLA, B, e T (atenuador de linfócito); ICOS (coestimulador de célula T induzível); KIR (receptor de imunoglobulina de célula exterminadora); LAG3 (gene de ativação de linfócito 3); PD1 (proteína de morte celular programada 1); CTLA-4 (antígeno associado com linfócito T citotóxico 4); e TIM3 (proteína de membrana de célula T 3).

[0050] "Inibidor de ponto de checagem imunológica" refere-se a uma molécula que total ou parcialmente reduz, inibe, interfere com, ou de outro modo modula a atividade de uma ou mais proteínas de ponto de checagem. Inibidores de ponto de checagem imunológica podem, por exemplo, incluir anticorpos ou compostos semelhantes a peptídeo derivados de anticorpos.

[0051] "PD1" refere-se à proteína de morte celular programada 1, também conhecida como CD279, expressa por células T, células B, e monócitos. PD-1 é uma glicoproteína de superfície do tipo I caracterizada por um domínio de superfamília de imunoglobulina de grupo V (IgSF) ligado a um domínio de transmembrana e um domínio citoplasmático contendo dois *motivos* de sinalização com base em tirosina. PD1 liga pelo menos dois ligantes: PD-L1 (expressa por células incluindo células T, células B, células dendríticas, macrófagos, e células tronco mesenquimal) e PD-L2 (expressa por células incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos).

[0052] "CTLA-4" refere-se a antígeno associado com linfócito T citotóxico 4, também conhecido como CD152, que é expresso exclusivamente em células T. CTLA-4 inclui um domínio extracelular única dobra de Ig com três alças tipo CDR, e liga-se aos ligantes CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), entre outros, que são diferencialmente expressos em células de apresentação de antígeno.

[0053] "Marcador de leucócito" refere-se a uma biomolécula (por exemplo, um polipeptídeo) encontrada na superfície celular de um leu-

cócito. Marcadores de leucócito incluem, porém não são limitados a, receptores de antígeno de célula T; CD1; receptores de célula NK; IDO1/2; TDO; CSF1R; VEGFR; SIRPa; moléculas de adesão celular (por exemplo, CD2, CD58 (LFA-3), CD3, CD4, CD5, CD7, CD8); β 2 integrinas (por exemplo, LeuCAM, CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1 (CR3)), CD11c (CR4), CD18, CD16 (FcR111), CD21 (CR2), CD23, CD25, CD30, CD35 (CR1)); β 3 integrinas (por exemplo, CD41, CDS1); receptores de retorno (por exemplo, CD44, Mel-14); β 1 integrinas (por exemplo, CD49a-f (VLA-1), VLA-2, VLA-3, VLA-4); CD14; CD56; CD68; CD71; e CD163.

[0054] "Integrina" refere-se a um receptor de superfície celular α/β -heterodimérica não covalentemente ligado que media a adesão, migração, e sinalização celular. As integrinas são expressas em uma ampla faixa de organismos, incluindo *C. elegans*, *Drosophila* sp., anfíbios, répteis, pássaros, e mamíferos, incluindo humanos. Diversas α , designadas, por exemplo, α V, α 5 e similares, e diversas subunidades β , designadas, por exemplo, β 1, β 2, β 3, β 5 e similares, foram identificadas, e várias combinações destas subunidades são representadas na superfamília de integrina, incluindo α 5 β 1, α V β 3 e α V β 5. A superfamília de integrinas pode ser subdividida em famílias, por exemplo, como as integrinas contendo α V, incluindo α V β 3 e α V β 5, ou as integrinas contendo β 1, incluindo α 5 β 1 e α V β 1.

[0055] " β 2 integrina" refere-se a uma integrina específica de leucócito tendo uma subunidade β 2 (também referida como CD18). β 2 integrinas têm subunidades α distintas selecionadas de CD11a, CD11b, CD11c e CD11d. β 2 integrinas, incluindo integrina altamente expressa CD11b/CD18 (também conhecida como Mac-1, CR3 e α M β 2), modulam as funções de leucócito, incluindo adesão, migração, recrutamento e ativação celular.

[0056] "Célula mieloide" geralmente refere-se a qualquer glóbulo

branco (isto é, leucócito) que não é um linfócito (por exemplo, não uma célula exterminadora natural, célula T ou célula B). Células mieloides incluem macrófagos, células dendríticas, e células granulocíticas.

[0057] O termo "tratar," como usado aqui, a menos que de outro modo indicado, significa reverter, aliviar, inibir o progresso de, ou prevenir o distúrbio ou condição à qual tal termo se aplica, ou um ou mais sintomas de tal distúrbio ou condição. O termo "tratamento," como usado aqui, refere-se ao ato de tratar, visto que "tratar" é definido imediatamente acima.

[0058] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade de um sal de LA1 ou forma cristalina é necessária para fornecer um nível desejado de fármaco nos tecidos, corrente sanguínea, ou outro compartimento físico de um paciente, o nível desejado que dá origem a uma resposta fisiológica antecipada ou efeito biológico quando o sal de LA1 ou forma cristalina é administrado pela rotina escolhida de administração. A quantidade precisa dependerá de numerosos fatores incluindo, por exemplo, o sal de LA1 particular ou forma cristalina; a formulação farmacêutica específica ou dispositivo de liberação empregado; a gravidade do estado de doença; e aderência do paciente a um regime de tratamento. A quantidade terapeuticamente eficaz de sais de LA1 e formas cristalinas pode ser facilmente determinada por alguém versado na técnica com base na informação fornecida aqui.

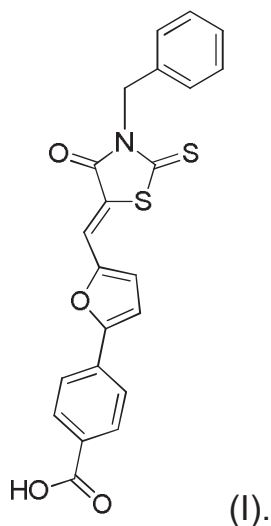
[0059] "Cerca de" e "em torno de," como usado aqui para modificar um valor numérico, indicam uma faixa definida em torno daquele valor. Se "X" for o valor, "cerca de X" ou "em torno de X" geralmente indicaria um valor de 0,95X a 1,05X incluindo, por exemplo, de 0,98X a 1,02X ou de 0,99X a 1,01X. Qualquer referência a "cerca de X" ou "em torno de X" especificamente indica pelo menos os valores X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X, e

1,05X, Desse modo, "cerca de X" e "em torno de X" são destinados a ensinar e fornecer suporte de descrição por escrito para uma limitação de reivindicação de, por exemplo, "0,98X." Quando a quantidade "X" apenas inclui valores de números inteiros (por exemplo, "X carbonos"), "cerca de X" ou "em torno de X" indica de (X-1) a (X+1), Em tais casos, "cerca de X" ou "em torno de X" especificamente indica pelo menos os valores X, X-1, e X+1.

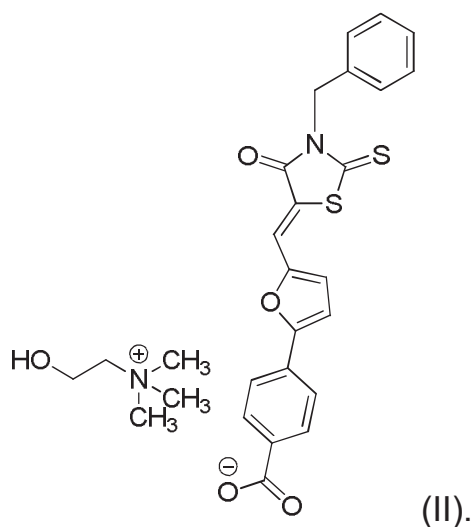
III. Sais de LA1

[0060] Alguém versado na técnica apreciará que diversas bases farmacologicamente aceitáveis podem ser usadas para preparar sais de LA1. Bases farmacologicamente aceitáveis incluem, porém não são limitadas a, amônia, L-arginina, hidróxido de cálcio, colina, meglumina, hidróxido de magnésio, benetamina, benzetina, betaína, deanol, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, hidrabamina, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, t-butilamina, trometamina, piperazina, imidazol, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, e trietanolamina. Em certas modalidades, o sal de LA1 compreende um cátion derivado de uma base farmacologicamente aceitável selecionado de amônia, L-arginina, hidróxido de cálcio, colina, meglumina, e hidróxido de magnésio.

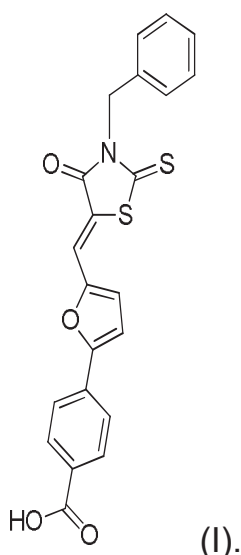
[0061] Em um aspecto, a invenção fornece um sal de colina de um composto de Fórmula I:



[0062] Como acima descrito, a fórmula I corresponde a LA1. Colina é também referida por sinônimos incluindo (2-hidroxietil) trimetilamônio e 2-hidróxi-*N,N,N*-trimetiletanamônio. Como usado aqui, "sal de colina" refere-se a um sal contendo como pelo menos cátion de 2-hidróxi-*N,N,N*-trimetiletanamônio. Em certas modalidades, o sal de colina de LA1 é um sal de acordo com a fórmula II:



[0063] Em um aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina G de um sal de colina de um composto de Fórmula I:



[0064] Em algumas modalidades, a forma cristalina G é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,6, 7,9, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,2, 16,5, 16,6, 17,8, 18,1, 18,5, 19,1, 19,8, 20,0, 21,1, 23,0, 24,6,

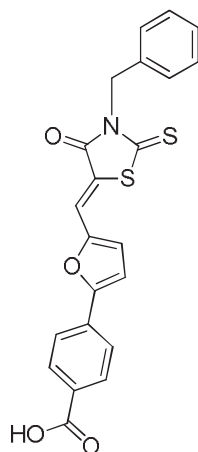
25,0, 25,6, 26,6, 26,8, 26,9, 29,3, 29,7, 30,6, 30,7, e 34,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina G pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, ou 29 tais picos.

[0065] Em algumas modalidades, a forma cristalina G é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,6, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,6, 19,1, 24,6, 25,0, 25,6, e 26,8 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0066] Em algumas modalidades, a forma cristalina G é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,6, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,6, 19,1, 24,6, 25,0, 25,6, e 26,8 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0067] Em algumas modalidades, a forma cristalina G é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 5B, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0068] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina O de um sal de colina de um composto de Fórmula I:



(I).

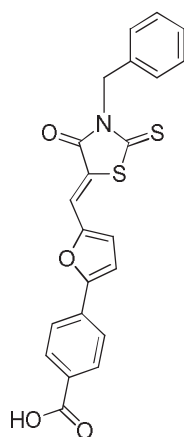
[0069] Em algumas modalidades, a forma cristalina O é caracte-

rizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 8,4, 8,8, 9,3, 13,3, 14,3, 16,7, 17,0, 18,1, 19,4, 19,6, 19,9, 20,7, 20,9, 21,4, 21,7, 22,5, 23,4, 24,1, e 25,5 °2 θ , $\pm$ 0,2 °2 θ como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . Por exemplo, a forma cristalina O pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ou 19 tais picos.

[0070] Em algumas modalidades, a forma cristalina O é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 8,4, 8,8, 9,3, 16,7, 19,9, 20,7, 21,7, 22,5, 23,4, e 25,5 °2 θ , $\pm$ 0,2 °2 θ como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0071] Em algumas modalidades, a forma cristalina O é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 6E, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0072] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina Q de um sal de colina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0073] Em algumas modalidades, a forma cristalina Q é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,0, 5,2, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,6, 12,8, 13,3, 14,4, 15,8, 16,1, 16,6, 17,5, 18,0, 19,3, 20,6, 20,7, 21,5, 21,7, 22,9, 23,7, 24,8, 25,1, 25,3, 25,3, 25,5, 26,3, 26,9, 27,0, 28,1,

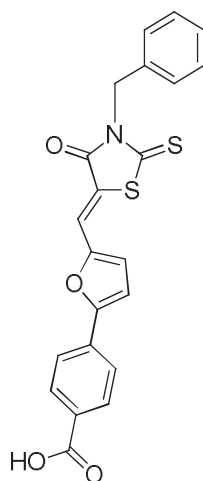
28,8, 30,4, 31,2, 32,0, 35,7, e 37,4 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina Q pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, ou 37 tais picos.

[0074] Em algumas modalidades, a forma cristalina Q é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,0, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,8, 13,3, 14,4, 18,0, 19,3, 23,7, e 25,5 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0075] Em algumas modalidades, a forma cristalina Q é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,0, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,8, 13,3, 14,4, 18,0, 19,3, 23,7, e 25,5 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0076] Em algumas modalidades, a forma cristalina Q é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com D, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0077] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina R de um sal de colina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0078] Em algumas modalidades, a forma cristalina R é caracteri-

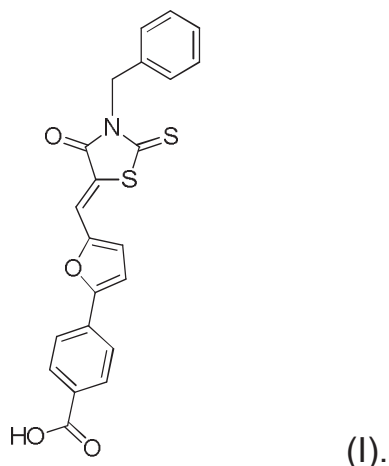
zada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,1, 5,6, 8,0, 8,2, 8,4, 9,8, 11,2, 12,7, 13,4, 14,6, 15,1, 15,7, 16,1, 16,3, 16,7, 17,1, 17,8, 18,2, 18,5, 19,1, 19,9, 20,1, 21,1, 22,6, 23,0, 23,4, 24,0, 24,5, 24,7, 25,0, 25,6, 26,0, 26,6, 26,8, 27,1, 27,4, 27,7, 28,1, 29,3, 29,7, 30,6, 31,1, 31,7, 32,2, 32,8, 33,2, 33,5, 34,5, 34,8, 35,1, 35,4, 36,5, 37,6, 38,5, 39,5, 40,4, 41,3, 42,7, e 44,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina R pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, ou 59 tais picos.

[0079] Em algumas modalidades, a forma cristalina R é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,6, 11,2, 15,1, 16,3, 16,7, 19,1, 20,1, 21,1, 23,0, 24,5, 25,0, 25,6, 26,0, 31,1, 32,8, e 33,5 ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0080] Em algumas modalidades, a forma cristalina R é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos nove picos selecionados de 5,6, 11,2, 15,1, 16,3, 16,7, 19,1, 20,1, 21,1, 23,0, 24,5, 25,0, 25,6, 26,0, 31,1, 32,8, e 33,5 ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0081] Em algumas modalidades, a forma cristalina R é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a figura 7, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Em algumas modalidades, a forma cristalina R é caracterizada por um termograma de calorimetria de varredura diferencial compreendendo um pico endotérmico em torno de 224.5°C.

[0082] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina S de um sal de colina de um composto de Fórmula I:



[0083] Em algumas modalidades, a forma cristalina S é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 11,6, 12,9, 13,3, 14,4, 14,9, 15,8, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 19,3, 20,6, 21,4, 21,7, 22,7, 23,7, 24,8, 25,4, 26,3, 26,8, 28,1, 28,7, 29,6, 30,3, 31,0, 31,9, 33,0, 34,0, 35,7, 37,4, 39,2, 40,5, e 41,7 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina S pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, ou 37 tais picos.

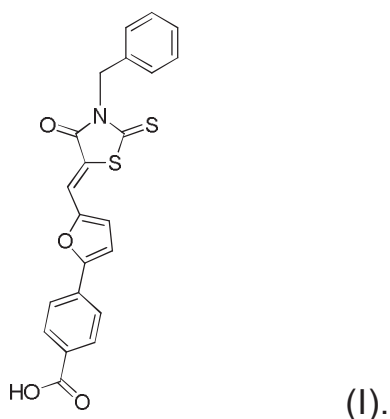
[0084] Em algumas modalidades, a forma cristalina S é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 12,9, 13,3, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 20,6, 21,4, 21,7, 23,7, 25,4, e 28,1 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0085] Em algumas modalidades, a forma cristalina S é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 12,9, 13,3, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 20,6, 21,4, 21,7, 23,7, 25,4, e 28,1 °2θ

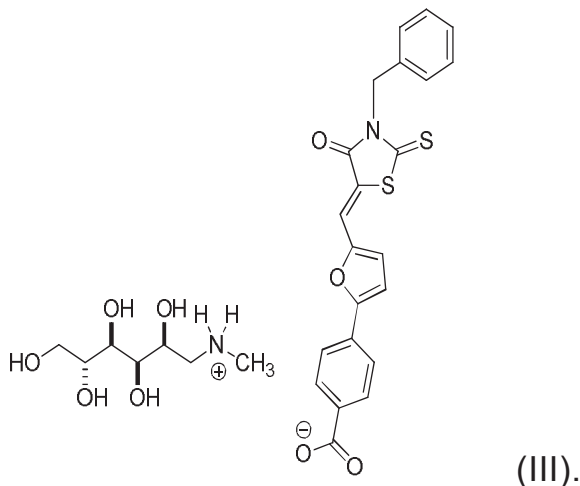
$\pm 0,2^\circ 2\theta$, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0086] Em algumas modalidades, a forma cristalina S é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 8, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0087] Em outro aspecto, a invenção fornece um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:

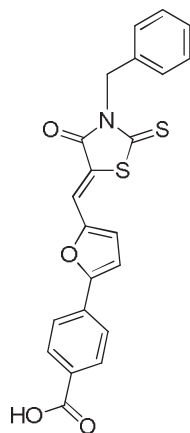


[0088] Meglumina é também referida a por sinônimos incluindo *N*-metil-D-glucamina e (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-6-(metilamino)hexano-1,2,3,4,5-pentol. Como usado aqui, "sal de meglumina" refere-se a um sal contendo pelo menos um cátion (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-penta-hidróxi-*N*-metilhexan-1-amínio. Em certas modalidades, o sal de meglumina de LA1 é um sal de acordo com a fórmula III:



[0089] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristali-

na H de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0090] Em algumas modalidades, a forma cristalina H é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e 27,2 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina H pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 tais picos.

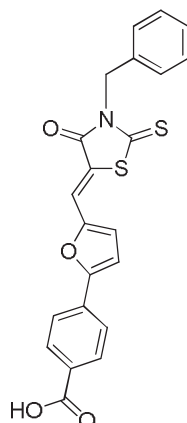
[0091] Em algumas modalidades, a forma cristalina H é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e 27,2 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0092] Em algumas modalidades, a forma cristalina H é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e 27,2°2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0093] Em algumas modalidades, a forma cristalina H é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 6B, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0094] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina

L de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0095] Em algumas modalidades, a forma cristalina L é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,3, 7,9, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 10,9, 11,6, 12,0, 12,6, 13,1, 14,5, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,2, 16,9, 17,4, 17,8, 18,0, 18,4, 18,8, 19,2, 20,2, 20,8, 21,3, 21,7, 22,1, 23,2, 23,8, 24,5, 25,2, 25,5, 26,3, 26,9, 27,3, 27,9, 28,4, 28,9, 29,2, 29,8, 30,3, 30,6, 31,1, 32,1, 32,8, 34,1, 34,5, 34,9, 35,1, 36,0, 36,5, 37,5, 38,0, 38,9, 39,6, 40,7, 41,7, 42,5, e 42,9 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difrattômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina L pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, ou 61 tais picos.

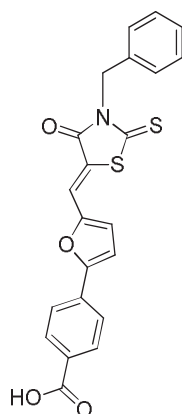
[0096] Em algumas modalidades, a forma cristalina L é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 8,5, 9,0, 10,9, 15,0, 16,9, 20,2, 21,7, 23,8, 24,5, 25,2, 26,3, 29,2, e 29,8 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difrattômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0097] Em algumas modalidades, a forma cristalina L é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 8,5, 9,0, 10,9, 15,0, 16,9, 20,2, 21,7, 23,8, 24,5, 25,2, 26,3, 29,2, e 29,8 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado

em um difrattômetro usando radiação de Cu-K α .

[0098] Em algumas modalidades, a forma cristalina L é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 11, como determinado em um difrattômetro usando radiação de Cu-K α . Em algumas modalidades, a forma cristalina L é caracterizada por um termograma de calorimetria de varredura diferencial compreendendo um pico endotérmico em torno de 136,3 °C.

[0099] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina M de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0100] Em algumas modalidades, a forma cristalina M é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 6,5, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 11,6, 14,4, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,1, 16,9, 17,8, 18,0, 19,0, 20,4, 20,8, 21,3, 21,7, 23,6, 24,5, 25,2, 26,3, 26,9, 27,5, 27,9, 28,5, 28,9, 29,8, 30,6, 32,1, 32,8, 33,8, 34,5, 36,0, 36,4, 37,1, 38,0, 39,7, 40,7, 41,7, 43,0, e 44,0 °2 θ , $\pm$ 0,2 °2 θ , como determinado em um difrattômetro usando radiação de Cu-K α . Por exemplo, a forma cristalina M pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, ou 44 tais picos.

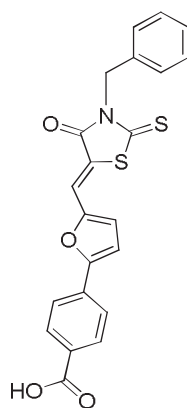
[0101] Em algumas modalidades, a forma cristalina M é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo

menos seis picos selecionados de 8,5, 9,0, 14,8, 15,0, 16,9, 18,0, 21,7, 24,5, 25,2, 26,3, e 29,8 $\pm$ 0,2 $^{\circ}2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

[0102] Em algumas modalidades, a forma cristalina M é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos nove picos selecionados de 8,5, 9,0, 14,8, 15,0, 16,9, 18,0, 21,7, 24,5, 25,2, 26,3, e 29,8 $\pm$ 0,2 $^{\circ}2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

[0103] Em algumas modalidades, a forma cristalina M é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 12, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α . Em algumas modalidades, a forma cristalina M é caracterizada por um termograma de calorimetria de varredura diferencial compreendendo um pico endotérmico em torno de 294,5 $^{\circ}\text{C}$.

[0104] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina N de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:



(I).

[0105] Em algumas modalidades, a forma cristalina N é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 4,3, 5,0, 5,4, 6,1, 7,5, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 10,8, 11,4, 12,1, 12,5, 13,8, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 16,7, 17,4, 18,1, 19,2, 19,5, 20,1, 20,9, 21,4, 21,5, 22,1, 22,5, 23,9, 24,6, 25,3, 26,3, 26,7, 27,1, 27,6, 28,2, 29,0, 30,4, 30,9, 32,0, 32,9, 33,9, 34,7, 36,9, 38,3, 39,1, 39,6, 40,2, e 41,4 $^{\circ}2\theta$, $\pm$ 0,2 $^{\circ}2\theta$, como determinado

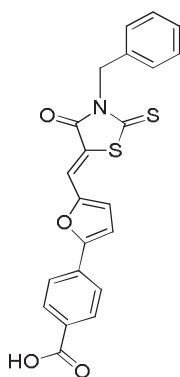
em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . Por exemplo, a forma cristalina N pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 tais picos.

[0106] Em algumas modalidades, a forma cristalina N é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 6,1, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 12,5, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 17,4, 18,1, 19,5, 20,9, 21,4, 21,5, 23,9, 24,6, 25,3, e 29,0 °2 θ $\pm$ 0,2 °2 θ , como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0107] Em algumas modalidades, a forma cristalina N é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 6,1, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 12,5, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 17,4, 18,1, 19,5, 20,9, 21,4, 21,5, 23,9, 24,6, 25,3, e 29,0 °2 θ $\pm$ 0,2 °2 θ , como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

[0108] Em algumas modalidades, a forma cristalina N é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 13, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . Em algumas modalidades, a forma cristalina N é caracterizada por um termograma de calorimetria de varredura diferencial compreendendo um pico endotérmico em torno de 139.9 °C.

[0109] Em outro aspecto, a invenção fornece uma forma cristalina T de um sal de meglumina de um composto de Fórmula I:



(I).

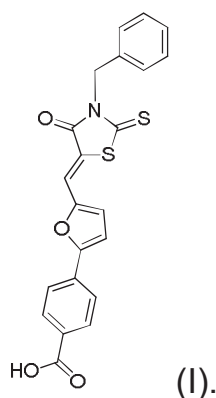
[0110] Em algumas modalidades, a forma cristalina T é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 6,9, 8,2, 8,4, 9,4, 11,6, 15,0, 15,1, 15,5, 17,2, 17,8, 18,1, 20,5, 21,3, 21,9, 22,3, 23,5, 25,0, e 26,7 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα. Por exemplo, a forma cristalina T pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, ou 18 tais picos.

[0111] Em algumas modalidades, a forma cristalina T é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 6,9, 8,4, 9,4, 11,6, 15,5, 17,2, 21,3, 21,9, 22,3, 23,5, 25,0, e 26,7 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0112] Em algumas modalidades, a forma cristalina T é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e 27,2 °2θ ± 0,2 °2θ, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0113] Em algumas modalidades, a forma cristalina T é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 10E, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-Kα.

[0114] Em outro aspecto, a invenção fornece a solid form A de um composto de Fórmula I:



[0115] Em algumas modalidades, a forma sólida A é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5, e $26,9^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α . Por exemplo, a forma cristalina A pode incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou 11 tais picos.

[0116] Em algumas modalidades, a forma sólida A é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos seis picos selecionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5, e $26,9^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

[0117] Em algumas modalidades, a forma sólida A é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos dez picos selecionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5, e $26,9^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

[0118] Em algumas modalidades, a forma sólida A é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) substancialmente de acordo com a figura 2, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

[0119] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece métodos para a preparação de sais e formas cristalinas de LA1. Em geral, um sal de LA1 é preparado formando uma mistura (isto é, uma mistura de formação de sal) contendo o ácido livre de LA1 e pelo menos um equivalente molar de uma base adequada sob condições suficientes para formar o sal. A mistura tipicamente contém um solvente em que o ácido livre de LA1 e/ou a base é parcialmente solúvel ou totalmente solúvel. Exemplos de solventes que são úteis para preparação de sal de LA1s incluem, porém não são limitados a, tetra-hidrofurano, dioxano, metanol, etanol, isopropanol, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirolidona,

terc-butil éter de metila, acetona, acetato de etila, diclorometano, água, e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém pelo menos um solvente selecionado de tetra-hidrofurano e metanol. Em algumas modalidades, a mistura contém tetra-hidrofurano. Em algumas modalidades, a mistura contém tetra-hidrofurano e metanol. Em algumas modalidades, a mistura contém acetona. Em algumas modalidades, a mistura contém etanol.

[0120] A mistura de formação de sal contendo o ácido livre de LA1 e a base pode ser formada sob ou mantida em qualquer temperatura adequada. Tipicamente, a mistura é mantida em uma temperatura variando de cerca de 20°C a cerca de 80°C durante um tempo suficiente para formação de sal. A mistura pode ser mantida, por exemplo, de cerca de 20°C a cerca de 80°C durante qualquer momento de cerca de 15 minutos a cerca de 72 horas ou mais. A mistura pode ser mantida de cerca de 40°C a cerca de 60°C durante cerca de 1 hora a cerca de 48 horas, ou de cerca de 40°C a cerca de 50°C durante cerca de 1 hora a cerca de 16 horas.

[0121] Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém ácido livre de LA1, hidróxi de colina, tetra-hidrofurano, e metanol. Em algumas modalidades, a relação de tetra-hidrofurano para metanol é de 3:1 v:v. Em algumas modalidades, a forma cristalina G é preparada por um processo incluindo a formação de uma mistura contendo um equivalente molar de ácido livre de LA1, um equivalente molar de hidróxido de colina, e combinação de tetra-hidrofurano e metanol em uma relação de 3:1 v:v. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina G também inclui agitar a mistura de cerca de 40°C a cerca de 50°C durante cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina G inclui agitar a mistura a cerca de 50°C durante pelo menos cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, o processo

para a preparação da forma cristalina G inclui a remoção da combinação de tetra-hidrofurano e metanol da mistura por evaporação após formação da forma cristalina G.

[0122] Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém ácido livre de LA1, hidróxido de colina, e tetra-hidrofurano. Em algumas modalidades, a relação de tetra-hidrofurano para metanol é de 3:1 v:v. Em algumas modalidades, a forma cristalina O é preparada por um processo incluindo a formação de uma mistura contendo um equivalente molar de ácido livre de LA1, um equivalente molar de hidróxido de colina, e tetra-hidrofurano. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina O também inclui agitar a mistura de cerca de 20°C a cerca de 30°C durante cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina O inclui agitar a mistura a não mais do que cerca de 30°C durante pelo menos cerca de 24 horas.

[0123] Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém ácido livre de LA1, hidróxido de colina, e acetato de etila ou acetona. Em algumas modalidades, a forma cristalina Q é preparada por um processo incluindo a formação de uma mistura contendo um equivalente molar de ácido livre de LA1, um equivalente molar de hidróxido de colina, e acetato de etila. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina Q também inclui agitar a mistura de cerca de 20°C a cerca de 30°C durante cerca de 12 horas a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina Q inclui agitar a mistura em não mais do que cerca de 30°C durante pelo menos cerca de 12 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina Q inclui a remoção de the acetato de etila ou acetona por meio de filtração a vácuo após formação da forma cristalina Q.

[0124] A preparação de formas cristalinas de sal de colina de LA1

pode também incluir a recristalização dos sais de colina de LA1. A recristalização pode ser conduzida usando qualquer solvente adequado, incluindo um solvente prótico (por exemplo, metanol, etanol, álcool isopropílico (IPA), *n*-butanol, e água), um solvente aprótico (por exemplo, acetato de isopropila, acetato de etila, e acetona), ou a misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, a preparação de uma forma cristalina de sal de colina de LA1 inclui a recristalização do sal de colina de LA1 de um solvente prótico. Em algumas modalidades, a preparação da forma cristalina R de sal de colina de LA1 inclui a recristalização de sal de colina de LA1 de *n*-butanol. Em algumas modalidades, a preparação da forma cristalina S de sal de colina de LA1 inclui a recristalização de sal de colina de LA1 de metanol.

[0125] Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém ácido livre de LA1, meglumina, tetra-hidrofurano, e metanol. Em algumas modalidades, a relação de tetra-hidrofurano para metanol é de 2:1 v:v. Em algumas modalidades, a forma cristalina H é preparada por um processo incluindo a formação de uma mistura contendo um equivalente molar de ácido livre de LA1, um equivalente molar de meglumina, e a combinação de tetra-hidrofurano e metanol em uma relação de 2:1 v:v. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina H também inclui agitar a mistura de cerca de 40°C a cerca de 50°C durante cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina H inclui agitar a mistura a cerca de 50°C durante pelo menos cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina H inclui a remoção de a combinação de tetra-hidrofurano e metanol da mistura por evaporação após formação da forma cristalina H.

[0126] Em algumas modalidades, a mistura de formação de sal contém ácido livre de LA1, meglumina, e etanol. Em algumas modali-

dades, a forma cristalina T é preparada por um processo incluindo a formação de uma mistura contendo um equivalente molar de ácido livre de LA1, um equivalente molar de meglumina, e etanol. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina T também inclui agitar a mistura de cerca de 40°C a cerca de 50°C durante cerca de 24 horas a cerca de 48 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina T inclui agitar a mistura a cerca de 40°C durante pelo menos cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina T inclui a remoção do etanol da mistura por filtração a vácuo após formação da forma cristalina T e isolamento de pelo menos uma porção da forma cristalina T. Em algumas modalidades, o processo para a preparação da forma cristalina T também inclui a lavagem da forma cristalina T isolada com terc-butil éter de metila.

[0127] A preparação das formas cristalinas de sal de meglumina de LA1 pode também incluir a recristalização dos sais de meglumina de LA1. A recristalização pode ser conduzida usando qualquer solvente adequado, incluindo um solvente prótico (*por exemplo*, metanol, etanol, álcool isopropílico (IPA), *n*-butanol, e água), um solvente aprótico (*por exemplo*, *N,N*-dimetil formamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de isopropila, acetato de etila, e acetona), ou a misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, a preparação de uma forma cristalina de sal de meglumina de LA1 inclui a recristalização do sal de meglumina de LA1 de um solvente aprótico. Em algumas modalidades, a preparação da forma cristalina L de sal de meglumina de LA1 inclui a recristalização de sal de colina de LA1 de acetato de isopropila. Em algumas modalidades, a preparação da forma cristalina M de sal de meglumina de LA1 inclui a recristalização de sal de colina de LA1 de acetona. Em algumas modalidades, a preparação da forma cristalina N de sal de meglumina de LA1 inclui a recristalização de sal de colina de LA1 de DMF.

IV. Composições Farmacêuticas

[0128] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece composições farmacêuticas para a administração dos sais e formas cristalinas descritos aqui. As composições farmacêuticas podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia e liberação de fármaco. Em geral, métodos e preparação das composições incluem a etapa de introduzir o ingrediente ativo em associação com um veículo contendo um ou mais ingredientes acessórios. As composições farmacêuticas são tipicamente preparadas introduzindo uniforme e intimamente o ingrediente ativo em associação com um veículo líquido ou um veículo sólido finamente dividido ou ambos, e em seguida, se necessário, moldando o produto na formulação desejada. As composições podem ser convenientemente preparadas e/ou embaladas em forma de dosagem unitária.

[0129] As composições farmacêuticas podem estar na forma de soluções e esuspensões aquosas ou oleaginosas injetáveis estéreis. Preparações estéreis injetáveis podem ser formuladas usando veículos parenteralmente aceitáveis não tóxicos incluindo água, solução de Ringer, e solução de cloreto de sódio isotônica, e solventes aceitáveis tal como 1,3-butano diol. Além disso, óleos estéreis, fixos são convencionalmente empregados como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito, qualquer óleo fixo brando pode ser empregado incluindo mono ou diglicerídeo sintético. Além disso, ácidos graxos tal como ácido oleico encontram uso na preparação de injetáveis.

[0130] Suspensões aquosas contêm os materiais ativos em mistura com excipientes incluindo, porém não limitados: agentes de suspensão tais como carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, oleagino-propilmetilcelulose, alginato de sódio, polivinil-pirrolidona, goma de tragacanto e goma de acácia; agentes de dispersão ou umectação tais como lecitina, estearato de polioxietileno, e mono-oleato de polietileno sorbita-

no; e conservantes tais como etila, *n*-propila, e *p*-hidroxibenzoato.

[0131] Suspensões oleosas podem ser formuladas suspendendo o ingrediente ativo em um óleo vegetal, por exemplo, óleo de amendoim, azeite de oliva, óleo de gergelim ou óleo de coco, ou em um óleo mineral tal como parafina líquida. As suspensões oleosas podem conter um agente espessante, por exemplo, cerca de abelha, parafina dura ou álcool cetílico. Estas composições podem ser conservadas pela adição de um antioxidante tal como ácido ascórbico.

[0132] Pós e grânulos dispersíveis (adequados para a preparação de uma suspensão aquosa pela adição de água) podem conter o ingrediente ativo em mistura com um agente de dispersão, agentes umectantes, agentes de suspensão, ou combinações dos mesmos. Excipientes adicionais podem também estar presentes.

[0133] As composições farmacêuticas da invenção podem também estar na forma de emulsões de óleo-em-água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, por exemplo, azeite de oliva ou óleo de amendoim, ou um óleo mineral, por exemplo, parafina líquida ou mistura destes. Agentes emulsificantes adequados podem ser gomas de ocorrência natural, tais como goma de acácia ou goma de tragacanto; fosfolipídios de ocorrência natural, tal como lecitina de soja; ésteres ou ésteres parciais de ácidos graxos e anidridos de hexitol, tal como mono-oleato de sorbitano; e produtos de condensação dos referidos ésteres parciais com etileno óxido, tal como mono-oleato de polioxietileno sorbitana.

[0134] Composições farmacêuticas contendo os sais e formas cristalinas descritas aqui podem também estar em uma forma adequada para uso oral. Composições adequadas para administração oral incluem, porém não são limitados a comprimidos, trociscos, losangos, suspensões aquosas ou oleosas, grânulos ou pós dispersíveis, emulsões, cápsulas macias ou duras, xaropes, elixires, soluções, antissépticos bucais, géis orais, gomas mastigáveis, comprimidos mastigáveis, pós efervescentes,

comprimidos efervescentes. Composições para administração oral podem ser formuladas de acordo com qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica. Tais composições podem conter um ou mais agentes selecionados de agente adoçantes, agentes aromatizantes, agentes corantes, antioxidantes e agentes conservantes a fim de fornecer preparações farmacologicamente palatáveis e elegantes.

[0135] Os comprimidos geralmente contêm o ingrediente ativo em mistura com excipientes aceitáveis farmacologicamente não tóxicos, incluindo: diluentes inertes, tal como celulose, dióxido de silício, óxido de alumínio, carbonato de cálcio, carbonato de sódio, glicose, manitol, sorbitol, lactose, fosfato de cálcio, e fosfato de sódio; agentes de granulação e desintegrantes, tais como amido de milho e ácido algínico; agentes de ligação, tais como polivinilpirrolidona (PVP), celulose, polietileno glicol (PEG), amido, gelatina, e acácia; e agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico, e talco. Os comprimidos podem ser não revestidos ou revestidos, entericamente ou de outro modo, por técnicas conhecidas para retardar a desintegração e absorção no trato gastrointestinal e, desse modo fornecem uma ação prolongada durante um período de tempo mais longo. Por exemplo, um material de retardo de tempo tal como monoestearato de glicerila ou distearato de glicerila pode ser empregado. Os comprimidos podem também ser revestidos com uma membrana semipermeável e osmointegres poliméricos opcionais de acordo com as técnicas conhecidas para formar composições de bomba ótica para liberação controlada.

[0136] As composições para administração oral podem ser formuladas como cápsulas de gelatina duras em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte (tal como carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, ou caulim), ou como cápsulas de gelatina macias em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio de óleo (tal como óleo de amendoim, parafina líquida, ou azeite de oliva).

[0137] Os sais e formas cristalinas descritos aqui podem também ser administrados topicamente como uma solução, unguento, creme, gel, suspensão, antissépticos bucais, colírios, e similares. Ainda também, a liberação transdérmica dos sais e formas cristalinas pode ser realizada por meio de emplastos iontoferéticos e similares. O composto pode também ser administrado na forma de supositórios para administração retal do fármaco. Estas composições podem ser preparadas misturando o fármaco com um excipiente não irritante adequado que é sólido em temperaturas ordinárias, porém líquido na temperatura retal e, portanto, derreterá no reto para liberar o fármaco. Tais materiais incluem manteiga de cacau e polietileno glicóis.

[0138] Em algumas modalidades, um sal ou forma cristalina descrito aqui é administrado por meio de injeção intraperitoneal. Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado oralmente. Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado intravenosamente.

[0139] LA1 pode ser usado em combinação com fármacos selecionados de, porém não limitados ao grupo que consiste em 5-fluorouracil, AZD8055, bevacizumabe, bortezomibe, cetuximabe, ciclofosfamida, docetaxel, gencitabine, imatinibe, ipilimumabe, lapatinibe, paclitaxel, pertuzumabe, rapamicina, sipuleucel-T, sorafenibe, sunitinibe, trastuzumabe, temsirolimo, vemurafenibe, taxol, paclitaxel, abiraterona, esteroides, corticosteroides, prednisona, NSAIDs, mitomicina, androgênios, antiandrogênios, estrogênios, antiestrogênios, estatinas, inibidores de CTLA-4, anticorpos anti-CTLA-4, moduladores de B7, abatacept, rituximabe, belatacept, benlumimabe, PD-1 moduladores, anticorpos anti-PD1, moduladores de PDL1, anticorpos anti-PDL1, inibidores e moduladores de IDO1, moduladores de CSF1, moduladores de CMsF1R, anticorpos anti-CSF1R, moduladores e inibidores de CD47, moduladores e inibidores de CD206, moduladores e inibidores

de TNF α , anticorpos anti-TNF α , moduladores de citocina, anticorpos anti-citocina, moduladores e inibidores de interleucina, anticorpos anti-interleucina, anti-CCL2, anti-CCL4, inibidores de CXCR-4, anti-CXCR4, anti-IL17, e anti-IL23.

[0140] As composições farmacêuticas da invenção podem também incluir LA1 micronizada ou um sal de LA1 micronizado ou uma forma cristalina micronizada de um sal de LA1. Em geral, composições contendo LA1 micronizada contêm partículas que consistem essencialmente em LA1 com diâmetros médios abaixo de 50 μm . O diâmetro médio das partículas de LA1 pode ser, por exemplo, abaixo de 45 μm , abaixo de 40 μm , abaixo de 35 μm , abaixo de 30 μm , abaixo de 25 μm , ou abaixo de 20 μm . O diâmetro médio das partículas de LA1 pode ser de cerca de 10 μm a cerca de 49 μm , ou de cerca de 10 μm a cerca de 45 μm , ou de cerca de 15 μm a cerca de 40 μm , ou de cerca de 20 μm a cerca de 35 μm , ou de cerca de 25 μm a cerca de 30 μm . O diâmetro médio das partículas de LA1 pode ser cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 μm . Em algumas modalidades, as partículas consistem essencialmente em LA1 micronizada em sua forma de ácido livre. Em algumas modalidades, as partículas consistem essencialmente em um sal de LA1 micronizado, como descrito aqui, em forma amorfa ou cristalina.

V. Métodos de tratamento

[0141] Os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser usados para o tratamento de doença ou condição associada com a atividade de $\beta 2$ integrinas. Em certas modalidades, tal doença ou condição é selecionada de inflamação (incluindo, porém não limitada à inflamação aguda ou crônica), doenças inflamatórias da pele, distúrbios imuno relacionados, doenças autoimunes, queimadura, deficiência imunológica, síndrome da deficiência imunológica adquirida (AIDS), deficiência de mieloperoxidase, síndrome de Wiskott-Aldrich, doença renal crônica, doenças

granulomatosa crônica, síndrome de hiper-IgM, deficiência de adesão de leucócito, deficiência de ferro, síndrome Chediak-Higashi, imunodeficiência combinada severa, diabetes, obesidade, hipertensão, HIV, cicatrização de ferida, remodelagem, cicatrização, fibrose, terapias de célula tronco, caquexia, encefalomielite, esclerose múltipla, psoríase, lúpus, artrite reumatoide, distúrbios imuno relacionados, lesão por radiação, transplante, transplante celular, transfusão de sangue, transplante de órgão, transplante de medula óssea, preservação de órgão, preservação de célula, asma, doença do intestino irritável, síndrome do intestino irritável, colite ulcerativa, colite, doença intestinal, câncer, leucemia, lesão de reperfusão-isquemia, acidente vascular cerebral, espessamento neoíntimo associado com lesão vascular, pênfigoide bolhoso, nefropatia obstrutiva neonatal, hipercolesterolemia familiar, aterosclerose, dislipidemia, aneurismas aórticos, arterite, oclusão vascular, incluindo oclusão da artéria cerebral, complicações de cirurgia de desvio coronário, miocardite, incluindo miocardite autoimune crônica e miocardite viral, insuficiência cardíaca, incluindo insuficiência cardíaca crônica (CHF), caquexia de insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, estenose, restenose após cirurgia cardíaca, isquemia miocárdica silenciosa, complicações pós-implante de dispositivos auxiliares do ventrículo esquerdo, tromboflebite, vasculite, incluindo vasculite de Kawasaki, arterite de célula gigante, granulomatose de Wegener, ferimento na cabeça traumático, lesão de reperfusão pós isquêmica, inflamação cerebral pós isquêmica, lesão de reperfusão-isquemia após infarto do miocárdio, doença cardiovascular, glaucoma, degeneração macular, uveíte, e doença do enxerto versus hospedeiro, condições neurológicas, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, dermatite, dor (incluindo dor crônica), e câncer, incluindo tumores primários e tumores metastáticos, tais como câncer de mama, câncer de próstata, melanoma, câncer de pulmão e câncer pancreático. Em certas tais modalidades, a doença ou condição associada com a atividade de $\beta 2$

integrinas é selecionada de doença renal inflamatória, uma condição que afeta milhões de pessoas no mundo e leva à insuficiência renal, e restenose, um problema comum em pessoas que foram submetidas à angioplastia, um dos procedimentos mais comuns em cardiologia intervencional. Em certas modalidades, a $\beta 2$ integrina é CD11b/CD18.

[0142] Os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser usados para o tratamento de câncer ou redução de tumores em pacientes. Em certas modalidades, os sais e formas cristalinas modulam a infiltração de tumor de leucócitos. Os tumores secretam citocinas inflamatórias para recrutar as células expressando $\beta 2$ integrinas, tal como CD11b/CD18, para facilitar a neovascularização. Durante os tratamentos de câncer, incluindo por meio de quimioterapia e irradiação, os tumores recrutam grandes números de leucócitos específicos ou células derivadas da medula óssea que restauram a vasculatura e permitem o recrescimento e recorrência de tumor. Portanto, os compostos e métodos desta invenção são úteis na redução de atividade, tal como infiltração, de tais células. Além disso, a ativação de CD11b pode realçar respostas imunológicas antitumor. Consequentemente, os compostos que agonizam CD11b, incluindo os sais e formas cristalinas descritos aqui, bem como outros compostos, podem ser usados para alvejar e explorar as séries de reação imunomodulatórias com relação à terapia antitumor. Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas descritos aqui são úteis no realce da resposta de outros tratamentos de câncer, tais como quimioterapia, terapia de anticorpo, terapia de radiação, e terapias com base em célula.

[0143] Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas descritos podem ser usados para diminuir o recrutamento de leucócito em consequência à lesão, inflamação, infecção bacteriana, infecção viral, ou outras doenças e condições em mamíferos. Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas podem ser usados para reduzir a lesão de órgão, incluindo hiperplasia neointima em consequência à lesão arterial.

Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas podem ser usados para preservar o funcionamento do órgão em consequência à lesão de órgão aguda, tal como lesão de reperfusão-isquemia. Por exemplo, os sais e formas cristalinas podem preservar o funcionamento renal sob lesão renal aguda. Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser usados para preservar a função renal em consequência à nefrite glomerular ou nefrose.

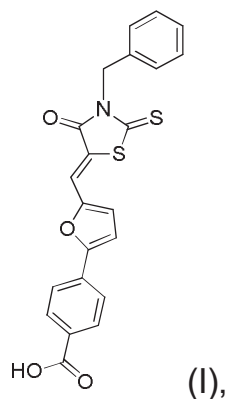
[0144] Em algumas modalidades, os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser usados para modular a função de células inflamatórias, tais como linfócitos e leucócitos. Os compostos podem ser usados para tratar inflamação mediada por integrina em diversos órgãos e tecidos incluindo, porém não limitada à inflamação mediada por integrina do olho, do cérebro, da pele, do fígado, e do rim. Por exemplo, os sais e formas cristalinas podem ser usados para induzir tolerância ao enxerto em um animal receptor. Enxertos podem incluir medula óssea, células da medula óssea, células-tronco, células imunes, células, órgãos, tecidos criados, ou outras células. Similarmente, os sais e formas cristalinas podem reduzir a doença do enxerto versus hospedeiro no receptor. Desse modo, os sais e formas cristalinas podem melhorar os resultados de transplante.

[0145] Consequentemente, a invenção fornece métodos para a prevenção ou tratamento de uma condição ou doença mediada por $\beta 2$ integrina em um paciente, compreendendo administrar ao referido paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal ou forma cristalina descrito aqui. Em certas modalidades, a condição ou doença mediada por $\beta 2$ integrina é uma condição ou doença mediada por CD11b/CD18.

[0146] LA1 também mostrou eficácia em um ensaio de agonista de receptor de adenosina A2A e um ensaio de agonista de receptor de glicocorticoide, indicando que LA1 e os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser usados para tratar as condições relacionadas com a atividade daqueles receptores.

[0147] Em um aspecto, a invenção fornece um método para o tratamento de câncer. O método compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo:

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com a fórmula I



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de ponto de checagem imunológica.

[0148] Em algumas modalidades, o método compreende administrar ao indivíduo um sal farmaceuticamente aceitável do composto de acordo com a fórmula I. Em algumas modalidades, o sal é um sal de meglumina ou um sal de colina. Em algumas tais modalidades, a invenção inclui administrar um sal ou forma cristalina de LA1 como descrito aqui.

[0149] Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de checagem imunológica inibe a atividade de um ou mais alvos selecionados do grupo que consiste em CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160, IDO1/IDO2 (indoleamina 2,3-dioxigenase), e CGEN-15049.

[0150] Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de checagem imunológica é uma proteína que inibe um ou mais alvos selecionados do grupo que consiste em CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160, e CGEN-15049.

[0151] Em algumas modalidades, a proteína é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo e um fragmento de anticorpo de ligação de antígeno. Em algumas modalidades, a proteína é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo de CTLA-4, um anticorpo de OX40, um anticorpo de PD-L1, um anticorpo de PD1, e um anticorpo de BY55. Em algumas modalidades, a proteína é um anticorpo de CTLA-4. Em algumas modalidades, a proteína é um anticorpo de PD1.

[0152] Em algumas modalidades, a proteína é selecionada do grupo que consiste em tremelimumabe, MEDI4736, MK-3475, nivolumab, CT-011, AMP224, BMS-936559, MPLDL3280A, MSB0010718C, e ipilimumabe.

[0153] Em algumas modalidades, o câncer é associado com expressão de um ou mais marcadores de leucócito no indivíduo. Em algumas modalidades, os marcadores de leucócito são selecionados do grupo que consiste em CD11b/CD18, IDO1/2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, e SIRPa.

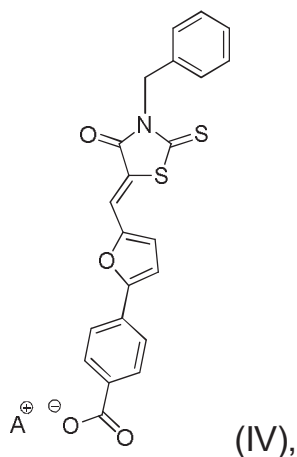
[0154] Em algumas modalidades, o câncer expressa um ou mais alvos para $\beta 2$ integrinas. Em algumas modalidades, os alvos são selecionados do grupo que consiste em ICAM-1, VCAM-1, fibronectina, vironectina, fibrinogênio, e fragmentos de complemento.

[0155] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em um melanoma, um sarcoma, um linfoma, um glioma, uma leucemia, câncer pancreático, um tumor de célula gigante tenossinovial, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de cólon, câncer de estômago, e câncer de pulmão. Em algumas modalidades, o câncer é um melanoma. Em algumas modalidades, o paciente de câncer foi diagnosticado com uma doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla, lúpus, artrite reumatoide, doença de Crohn, ou colite ulcerativa).

[0156] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para o tra-

tamento de melanoma. O método compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com a fórmula IV

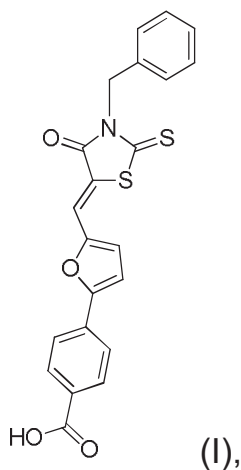


em que A^+ é selecionado do grupo que consiste em um cátion de colina e um cátion de meglumina, e

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de PD1.

[0157] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para o tratamento de câncer que inclui administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com a fórmula I



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente que alveja as células mieloides.

[0158] Em algumas modalidades, o agente que alveja as células mieloides inibe a atividade de um ou mais alvos selecionados do grupo que consiste em CSF1R, IDO1/2, TDO, CCR2, CCL2, CXCR4, JAK1/2/3/4/5, PI3Kg, integrina $\beta 1$, integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA4), VEGFR.

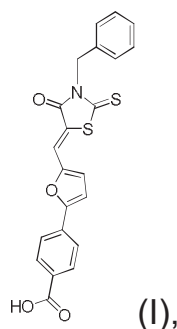
[0159] Em algumas modalidades, o agente que alveja as células mieloides aumenta a atividade de SIRPa.

[0160] Em algumas modalidades de qualquer um dos aspectos anteriores, o método também compreende detectar um ou mais marcadores de leucócito em um ou mais marcadores de leucócito em uma amostra obtida do indivíduo, desse modo identificando o indivíduo como necessitando do tratamento. Em algumas tais modalidades, os marcadores de leucócito são selecionados do grupo que consiste em CD11b/CD18, IDO1/2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, e SIRPa. Em algumas tais modalidades, o marcador é CD11b/CD18.

[0161] Em algumas modalidades de qualquer um dos aspectos anteriores, o método também compreende monitorar a eficácia de tratamento imageando as células de tumor com agentes de imageamento alvejado por macrófago. Em algumas modalidades de qualquer um dos aspectos anteriores, o método também compreende monitorar a eficácia do tratamento monitorando níveis de um ou mais marcadores de macrófago no indivíduo.

[0162] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para a redução de CD11b+ leucócitos em um tumor. O método compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo:

uma quantidade eficaz de um composto de acordo com a fórmula I



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e

uma quantidade eficaz de um agente selecionado do grupo que consiste em um inibidor de ponto de checagem imunológica, um agente que alveja células mieloides, e combinações dos mesmos.

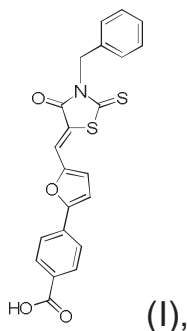
[0163] Em algumas modalidades, os leucócitos de CD11b⁺ são células mieloides. Em algumas modalidades, os leucócitos de CD11b⁺ são macrófagos. Em algumas modalidades, os leucócitos de CD11b⁺ são neutrófilos.

[0164] Em algumas modalidades, a relação de macrófagos anti-tumorigênicos para pró-tumorigênicos no tecido de tumor é mudada.

[0165] Em algumas modalidades, a relação de M1/M2 é mudada no tumor. Em algumas tais modalidades, os macrófagos são polarizados em direção ao fenótipo de M1.

[0166] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para a prevenção de metástase de tumor em um indivíduo tendo câncer. O método inclui:

Administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um composto de acordo com a fórmula I



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e

reduzir a infiltração de leucócitos de CD11b+ em um sítio de metástase potencial no indivíduo.

[0167] Em algumas modalidades, o método para a prevenção de tumor também inclui administrar uma quantidade eficaz de um agente selecionado do grupo que consiste em um inibidor de ponto de checagem imunológica, um agente que alveja as células mieloides, e combinações dos mesmos.

[0168] Os sais e formas cristalinas descritos aqui podem ser administrados em qualquer dose adequada nos métodos da invenção. Em geral, um sal ou forma cristalina é administrado em uma dose variando de cerca de 0,1 miligrama a cerca de 2000 miligramas por quilograma de um peso corporal do indivíduo (isto é, cerca de 0,1-2000 mg/kg). A dose do sal ou a forma cristalina pode ser, por exemplo, cerca de 0,1-1000 mg/kg, ou cerca de 1-500 mg/kg, ou cerca de 25-250 mg/kg, ou cerca de 50-100 mg/kg, ou cerca de 10-100 mg/kg. A dose do sal ou a forma cristalina pode ser cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950 ou 2000 mg/kg. A dose do sal ou a forma cristalina pode ser administrada em uma dose abaixo de cerca de 1, abaixo de cerca de 2, abaixo de cerca de 3, abaixo de cerca de 4, abaixo de cerca de 5, abaixo de cerca de 10, abaixo de cerca de 15, abaixo de cerca de 20, abaixo de cerca de 25, abaixo de cerca de 30, abaixo de cerca de 35, abaixo de cerca de 40, abaixo de cerca de 45, abaixo de cerca de 50, abaixo de cerca de 55, abaixo de cerca de 60, abaixo de cerca de 65, abaixo de cerca de 70, abaixo de cerca de 75, abaixo de cerca de 85, abaixo de cerca de 90, abaixo de cerca de 95, abaixo de cerca de 100, abaixo de cerca de 150, abaixo de cerca de 200, abaixo de cerca de 250,

abaixo de cerca de 300, abaixo de cerca de 350, abaixo de cerca de 400, abaixo de cerca de 450, abaixo de cerca de 500, abaixo de cerca de 550, abaixo de cerca de 600, abaixo de cerca de 650, abaixo de cerca de 700, abaixo de cerca de 750, abaixo de cerca de 800, abaixo de cerca de 850, abaixo de cerca de 900, abaixo de cerca de 950, ou abaixo de cerca de 1000 mg/kg. Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado em uma dose abaixo de 200 mg de composto por kg do peso corporal do indivíduo (200 mg/kg). Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado em uma dose abaixo de 100 mg/kg. Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado em uma dose abaixo de 50 mg/kg. Em algumas modalidades, o sal ou forma cristalina é administrado em uma dose abaixo de 20 mg/kg.

[0169] Inibidores de ponto de checagem imunológica podem ser administrados em qualquer dose adequada nos métodos da invenção. Em certas modalidades, um inibidor de ponto de checagem imunológica de anticorpo é administrado em uma dose variando de cerca de 0,1 miligrama a cerca de 100 miligramas por quilograma de um peso corporal do indivíduo (*isto é*, cerca de 0,1-100 mg/kg). A dose do inibidor de ponto de checagem imunológica do anticorpo pode ser, por exemplo, cerca de 0,1-50 mg/kg, ou cerca de 1-10 mg/kg. A dose do inibidor de ponto de checagem imunológica de anticorpo pode ser cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 mg/kg.

[0170] As dosagens podem ser variadas dependendo dos requisitos do paciente, da gravidade do distúrbio ou condição mediada por $\beta 2$ integrina sendo tratada, e da formulação particular sendo administrada. A dose administrada a um paciente deve ser suficiente para resultar em uma resposta terapêutica benéfica. O tamanho da dose também será determinado pela existência, natureza, e extensão de quaisquer efeitos colaterais adversos. A determinação da

dosagem para uma situação particular está na habilidade do praticante típico. A dosagem total pode ser dividida e administrada em porções durante um período de tempo adequado para tratar a condição mediada por integrina.

[0171] A administração de um sal ou forma cristalina descrito aqui pode ser conduzida durante um período de tempo que variará dependendo da natureza do distúrbio ou condição mediada por $\beta 2$ integrina particular, sua gravidade e da condição global do paciente. A administração pode ser conduzida, por exemplo, por hora, a cada 2 horas, três horas, quatro horas, seis horas, oito horas, ou duas vezes diariamente incluindo a cada 12 horas, ou qualquer intervalo intermediário dos mesmos. A administração pode ser conduzida uma vez diariamente, ou uma vez a cada 36 horas ou 48 horas, ou uma vez a cada mês ou diversos meses. Após tratamento, um paciente pode ser monitorado quanto a sua condição e quanto ao alívio dos sintomas do distúrbio ou condição mediada por $\beta 2$ integrina. A dosagem do sal ou da forma cristalina pode ser aumentada no caso de o paciente não responder significativamente a um nível de dosagem particular, ou a dose pode ser diminuída se um alívio dos sintomas do distúrbio ou condição mediada por $\beta 2$ integrina é observado, ou se o distúrbio ou condição tiver sido extinto, ou se os efeitos colaterais inaceitáveis forem observados com uma dosagem particular.

[0172] Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal ou forma cristalina descrito aqui pode ser administrada a um indivíduo em um regime de tratamento compreendendo intervalos de pelo menos 1 hora, ou 6 horas, ou 12 horas, ou 24 horas, ou 36 horas, ou 48 horas entre as dosagens. A administração pode ser conduzida em intervalos de pelo menos 72, 96, 120, 168, 192, 216, ou 240 horas, ou a quantidade equivalente de dias. O regime de dosagem pode consistir em dois ou mais grupos de intervalo diferentes. Por exemplo, uma primei-

ra parte do regime de dosagem pode ser administrada a um indivíduo múltiplas vezes ao dia, diariamente, dia si, dia não, a cada terceiro dia. O regime de dosagem pode iniciar com a dosagem do indivíduo dia sim, dia não, a cada terceiro dia, semanalmente, quinzenalmente, ou mensalmente. A primeira parte do regime de dosagem pode ser administrada, por exemplo, durante até 30 dias, tal como 7, 14, 21, ou 30 dias. Uma segunda parte subsequente do regime de dosagem com uma administração de intervalo diferente administrada semanalmente, a cada 14 dias, ou mensalmente pode opcionalmente seguir, continuar durante 4 semanas até dois anos ou mais, tal como 4, 6, 8, 12, 16, 26, 32, 40, 52, 63, 68, 78, ou 104 semanas. Alternativamente, se o distúrbio ou condição mediada por $\beta 2$ integrina entra em remissão ou de modo geral melhora, a dosagem pode ser mantida ou conservada em menor do que a quantidade máxima. Se o distúrbio ou condição mediada reincidir, o primeiro regime de dosagem pode ser resumido até que uma melhora seja observada, e o segundo regime de dosagem podem ser implementados novamente. Este ciclo pode ser repetido múltiplas vezes tanto quanto necessárias.

[0173] Em certas modalidades, um sal de LA1 e um inibidor de ponto de checagem imunológica são administrados em quantidades sinérgicas; em tais casos, o efeito dos agentes quando administrados em combinação é maior do que o efeito aditivo dos compostos quando administrados sozinhos como um agente simples. Em algumas modalidades, o efeito sinérgico é obtido administrando o sal de LA1 e o inibidor de ponto de checagem em concentrações abaixo da concentração maximamente eficaz dos fármacos quando administrados como agentes simples. As quantidades podem depender de fatores incluindo, porém não limitados ao sal de LA1 particular ou forma cristalina, o inibidor de ponto de checagem imunológica particular, a condição (por exemplo, tipo de câncer) sendo tratada, e a rotina e frequência de ad-

ministração. Sinergia pode ser observado em termos de citotoxicidade menor, efeito antiproliferativo e/ou anti-infeccioso aumentado, ou algum outro efeito benéfico da combinação em comparação com os componentes individuais.

[0174] Em algumas modalidades, LA1 ou um sal de LA1 como descrito acima é administrado ao indivíduo em uma quantidade variando de cerca de 1 mg/kg a cerca de 2000 mg/kg. Em algumas tais modalidades, o inibidor de ponto de checagem imunológica é administrado em uma quantidade sinérgica com o LA1 ou o sal de LA1. Em algumas destas modalidades, LA1 ou o sal de LA1 é administrado oralmente ao indivíduo.

[0175] Em algumas modalidades, LA1 ou um sal de LA1 é administrado ao indivíduo em uma quantidade variando de cerca de 2 mg/kg a cerca de 100 mg/kg. Em algumas tais modalidades, o inibidor de ponto de checagem imunológica é administrado em uma quantidade sinérgica com o LA1 ou o sal de LA1. Em algumas destas modalidades, LA1 ou o sal de LA1 é administrado oralmente ao indivíduo.

[0176] LA1 pode modular a liberação de um ou mais fatores secretados, incluindo, porém não limitados à citocinas e quimiocinas, de leucócitos. Citocinas incluem citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucina (IL)-1, fator de necrose de tumor (TNF)) e citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13). Em certas modalidades, a administração de um sal ou forma cristalina descrita aqui resultou na modulação de expressão de citocina (ou outro fator solúvel) por LA1. Em algumas modalidades, a citocina é selecionada de IL-1 β , IL-6, e IL-10. Em algumas modalidades, o fator solúvel é selecionado de TNF- α , interferon α (IFN α), interferon β (IFN β) e interferon γ (IFN γ). Fatores solúveis tal como citocinas são marcadores inflamatórios e podem ser ensaiados em soros de paciente ou células ou tecidos derivados do paciente para medir a eficácia de LA1 (ou a eficácia de um sal de LA1

ou forma cristalina) no tratamento de uma condição particular. Diversos ensaios diagnósticos para citocinas tais como IL-1 β e TNF- α são conhecidos na técnica e podem ser usados para avaliar a eficácia anti-inflamatória de um sal de LA1 ou forma cristalina. Tais métodos incluem, porém não são limitados a, ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima) e sistema de disposição de conta para a captura de citocinas por anticorpos ligados à resina e detecção por citometria de fluxo.

[0177] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para o tratamento de câncer, em que o método inclui: determinar o nível de expressão de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo que consiste em CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, actina de músculo alfa-liso, e CD64, CD32, CD89 no indivíduo, e administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de LA1, ou um sal ou forma cristalina do mesmo, ao indivíduo. Em algumas modalidades, determinando o nível de expressão das proteínas inclui a obtenção de um bioespécime (tal como uma biópsia) do paciente e determinando o nível de expressão das proteínas no bioespécime. Em algumas tais modalidades, o método também inclui administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor de ponto de checagem imunológica ao indivíduo. Em algumas tais modalidades, o método também compreende periodicamente determinar o nível de expressão de uma proteína durante o curso de um período de avaliação, e ajustar o tratamento se o nível de expressão da proteína for observado mudar durante o curso do período de avaliação.

[0178] Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível de expressão da proteína em um bioespécime, tal como uma biópsia, obtido de um indivíduo é maior do que o nível de expressão da proteína em uma amostra de bioespécime obtida de um indivíduo sau-

dável. Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível de expressão da proteína em uma amostra de biópsia obtida de um indivíduo é maior do que o nível de expressão da proteína em uma amostra de tecido não canceroso obtida do indivíduo. Em algumas tais modalidades, o nível de expressão de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo que consiste em CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, actina do músculo alfa-liso, CD64, CD32, e CD89 é determinado.

[0179] Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível de expressão de uma proteína em um bioespécime, tal como uma biópsia, obtido de um indivíduo é menor do que o nível de expressão de uma proteína em uma amostra de bioespécime obtida de um indivíduo saudável. Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível de expressão de uma proteína em uma amostra de biópsia obtida de um indivíduo é menor do que o nível de expressão de uma proteína em uma amostra de tecido não canceroso obtido do indivíduo. Em algumas tais modalidades, o nível de expressão de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo que consiste em CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, actina de músculo alfa-liso, CD64, CD32, e CD89 é determinado.

[0180] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para o tratamento de câncer, em que o método inclui: determinar o nível de uma ou mais substâncias selecionadas do grupo que consiste em fator de estimulação de colônia 1 (CSF1); proteína reativa C (CRP); receptor de urocinase (uPAR); receptor de ativador de plasminogênio tipo urocinase solúvel (suPAR); Glipican-1; CD11b; fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF); receptor de VEGF; uma matriz metaloproteinase tal como MMP-9 e similares; TNF α ; uma interleucina tal como IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-23, e similares; TGF β ; interferons incluindo IFN- α , IFN- β , e similares; triptofano; lisina; arginina; lactato; e um microRNA no indivíduo, e administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de LA1, ou um sal ou forma cristalina do mesmo, ao indivíduo tendo o biomarcador. Em algumas modalidades, determinar o nível da substância inclui a obtenção de uma amostra de sangue, plasma, urina, ou saliva do paciente e determinar o nível de expressão das proteínas na amostra. Em algumas tais modalidades, o método também inclui administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de ponto de checagem imunológica ao indivíduo. Em algumas tais modalidades, o método também compreende periodicamente determinar o nível da substância durante o curso de um período de avaliação, e ajustar o tratamento se o nível da substância for observado mudar durante o curso do período de avaliação.

[0181] Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível da substância em uma amostra de sangue, plasma, urina, ou saliva de um indivíduo é maior do que o nível de expressão de uma proteína em uma amostra de plasma similar obtida de um indivíduo saudável. Em algumas modalidades, o método inclui determinar que o nível da substância em uma amostra de sangue, plasma, urina, ou saliva obtida de um indivíduo é menor do que o nível da substância em uma amostra similar obtida de um indivíduo saudável. Em algumas tais modalidades, o nível de uma ou mais substâncias selecionadas do grupo que consiste em fator de estimulação de colônia 1 (CSF1); proteína reativa C (CRP); receptor de urocinase (uPAR); receptor de plasminogênio tipo urocinase solúvel (suPAR); Glipican-1; CD11b; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptor de VEGF; uma matriz metaloproteinase tal como MMP-9 e similares; TNF α ; uma interleu-

cina tal como IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-23, e similares; TGF β ; interferons incluindo IFN- α , IFN- β , e similares; triptofano; lisina; arginina; lactato; e um micro-RNA é determinado.

VI. Exemplos

Exemplo 1. Preparação de Forma I de Leucaderina solvato de DMSO de LA1

[0182] Uma difusão de vapor de dietil éter (frascote externo, fechado) foi preparada em uma solução de DMSO (frascote interno, aberto). Após um dia em temperatura ambiente, em que uma quantidade razoável de éter foi adicionada ao frascote contendo o DMSO, o frascote foi colocado em um refrigerador a -10°C. O DMSO congelou, porém havia placas cristalinas que cresceram nas regiões superiores do frascote interno. As placas cristalinas foram caracterizadas. ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,10 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,96 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,50 (d, 1H, J = 3,8 Hz) 7,42 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,37-7,26 (m, 5H), 5,25 (s, 1H), 3,31 (bs, 1H).

[0183] A nova forma cristalina de LA1 de leucaderina foi caracterizada por espectroscopia de difração de raio X em pó, que produz uma impressão digital da particular forma cristalina. Medições de 2θ tipicamente são precisas dentro de $\pm 0,2$ graus.

[0184] Dados de difração de raio X para LA1 de leucaderina cristalina foram adquiridos usando um difractômetro de plataforma Bruker SMART APEX II CCD para uma coleta de dados a 100,0(5) K. Um conjunto preliminar de constantes de célula e uma matriz de orientação foram calculados de reflexões colhidas de três cunhas ortogonais de espaço recíproco. A coleta de dados completa foi realizada usando radiação MoK α (monocromador de grafite) com um prazo de 60 segundos e uma distância do detector de 3,99 cm. Uma região orientada aleatoriamente de espaço recíproco foi pesquisada: quatro seções maiores de prazos foram coletadas com etapas a 0,50° em ω em qua-

tro diferentes configurações ϕ e uma posição do detector de -38° em 2θ . Os dados de intensidade foram corrigidos para absorção. As constantes de célula finais foram calculadas dos centroides xyz de reflexões fortes 4045 da coleta de dados real após integração.

[0185] **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra a estrutura de cristal de raio X determinada para solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I, dados para os quais é sumarizada na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1. Dados de cristal para solvato de DMSO de LA1 Forma I.

Dados de cristal e refinamento de estrutura para solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I	
Código de identificação	solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I
Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₁ N O ₅ S ₃
Peso da fórmula	499,60
Temperatura	100,0(5) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	Triclinico
Grupo de espaço	<i>P</i> -1
Dimensões de célula unitária	$a = 8,1554(15)$ Å, $\alpha = 66,860(4)^\circ$ $b = 11,535(2)$ Å, $\beta = 86,581(4)^\circ$ $c = 14,091(3)$ Å, $\gamma = 70,621(4)^\circ$
Volume	1146,1(4) Å ³
Z	2
Densidade (calculada)	1,448 mg/m ³
Coeficiente de absorção	0,361 mm ⁻¹
<i>F</i> (000)	520
Cor de cristal, morfologia	laranja, placa
Tamanho do cristal	0,36 x 0,30 x 0,12 mm ³
Faixa Theta para coleta de dados	2,023 a 35,010°
Faixas de índice	$-13 \leq h \leq 13$, $-18 \leq k \leq 18$, $-22 \leq l \leq 22$
Reflexões coletadas	25036
Reflexões independentes	9940 [<i>R</i> (int) = 0,0562]

Dados de cristal e refinamento de estrutura para solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I	
Reflexões observadas	6038
Competude para theta = 34,970°	98,7%
Transmissão máx. e min.	0,7469 e 0,6405
Método de refinamento	Quadrados mínimos de matriz total sobre F^2
Dados / restrições / parâmetros	9940 / 0 / 304
Qualidade de ajuste sobre F^2	1,001
Índices de R final [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0553$, $wR2 = 0,1174$
Índices de R (todos os dados)	$R1 = 0,1054$, $wR2 = 0,1372$
Pico e orifício de difusão maiores	0,766 e -0,518 e.Å ⁻³

Tabela 2. Parâmetros posicionais para o LA1 de leucaderina a 100,0 (5) K.

Coordenadas atômicas (x 104) e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalentes (Å²x 103) para solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I.				
	X	Y	Z	U _{eq} *
S1	2808(1)	3734(1)	6146(1)	19(1)
S2	4823(1)	4939(1)	6943(1)	23(1)
O1	7504(2)	-525(2)	1974(1)	32(1)
O2	8673(2)	634(2)	2520(1)	28(1)
O3	1403(2)	2458(1)	5120(1)	17(1)
O4	-1385(2)	5201(1)	7265(1)	22(1)
N1	1461(2)	5146(1)	7210(1)	17(1)
C1	7429(2)	155(2)	2464(2)	22(1)
C2	5898(2)	544(2)	3041(1)	19(1)
C3	4530(2)	71(2)	3059(1)	21(1)
C4	3046(2)	465(2)	3547(1)	21(1)
C5	2937(2)	1324(2)	4047(1)	17(1)
C6	4315(2)	1794(2)	4028(1)	19(1)
C7	5772(2)	1413(2)	3530(1)	20(1)
C8	1369(2)	1744(2)	4542(1)	17(1)
C9	-235(2)	1618(2)	4542(1)	19(1)
C10	-1252(2)	2280(2)	5141(1)	20(1)

Coordenadas atômicas (x 104) e parâmetros de deslocamento isotrópico equivalentes (Å²x 103) para solvato de DMSO de LA1 de Leucaderina Forma I.				
C11	-218(2)	2786(2)	5478(1)	18(1)
C12	-535(2)	3562(2)	6086(1)	18(1)
C13	607(2)	4002(2)	6381(1)	17(1)
C14	57(2)	4831(2)	6989(1)	17(1)
C15	3005(2)	4676(2)	6823(1)	18(1)
C16	1272(2)	5907(2)	7860(1)	18(1)
C17	1905(2)	5017(2)	8974(1)	18(1)
C18	2607(3)	5494(2)	9560(2)	25(1)
C19	3138(3)	4721(2)	10599(2)	28(1)
C20	2976(3)	3464(2)	11065(2)	26(1)
C21	2281(3)	2984(2)	10489(2)	27(1)
C22	1744(2)	3757(2)	9451(1)	23(1)
S3	7700(1)	1389(1)	8335(1)	26(1)
O5	8762(2)	-62(1)	8587(1)	30(1)
C23	5936(3)	1352(2)	9147(2)	36(1)
C24	8883(3)	1978(2)	8955(2)	34(1)

*Ueq é definido como um terço do traço do tensor de Uij ortogonalizado

[0186] **Dados de cristal e refinamento de estrutura para LA1 de leucaderina:** Os seguintes parâmetros foram usados. Temperatura - 100,0(5) K, comprimento de onda - 0,71073 Å, sistema de cristal – tri-clínico, grupo de espaço - P-1, dimensões de célula unitária – (a = 8,1554(15) Å, α = 66,860(4)°, b = 11,535(2) Å, β = 86,581(4)°, c = 14,091(3) Å, γ = 70,621(4)°), volume - 1146,1(4) Å³, Z – 2, Densidade (calculada) - 1,448 Mg/m³, coeficiente de absorção - 0,361 mm⁻¹, F(000) – 520, cor de cristal & morfologia – laranja & placa, tamanho do cristal - 0,36 x 0,30 x 0,12 mm³, faixa Theta para coleta de dados - 2,023 a 35,010°, faixas de índice – (-13 ≤ h ≤ 13, -18 ≤ k ≤ 18, -22 ≤ l ≤ 22), reflexos coletados – 25036, reflexão independente - 9940 [R(int) = 0,0562], reflexões observadas – 6038, competência para theta = 34,970° - 98,7%, correção de absorção – varredura mínima, transmissão máx. e min. - 0,7469 e 0,6405, método de refinamento - Quadra-

dos mínimos de matriz total sobre F2, qualidade de ajuste sobre F2 - 1,001, índices de R final [$I > 2\sigma(I)$] – ($R1 = 0,0553$, $wR2 = 0,1174$), Índices de R (todos os dados) – ($R1 = 0,1054$, $wR2 = 0,1372$), pico e orifício de difusão maior - 0,766 e -0,518 e.Å⁻³

[0187] A unidade assimétrica de LA1 de leucaderina Forma I contém uma molécula alvo e uma molécula de solvente de sulfóxido de dimetila co-cristalizado, ambas em posições gerais. Os anéis fenila das moléculas são empilhados em pares em distâncias planares de aproximadamente 3,5 e 3,6 Å para anéis C2-C7 e C17-C22, respectivamente (veja figura 1). A ligação de hidrogênio liga a molécula de solvente à molécula-alvo (veja figura 1e Tabela 1).

Exemplo 2. Caracterização de ácido livre de LA1

[0188] A forma de ácido livre de LA1 tem uma solubilidade aquosa de 0,78 µg/mL e um pKa calculado de 4,1. Uma tela de sal limitada foi anteriormente conduzida usando cinco contraíons inorgânicos (Na, K, NH₄, Ca e Mg). Apesar dos sais exibirem cristalinidade, a maior parte foi higroscópica.

[0189] **Estimativa de solubilidade.** As alíquotas do solvente teste foram adicionadas a uma amostra pesada com precisão (~10 mg) de LA1 em temperatura ambiente. Os volumes de alíquota foram tipicamente 200-1000 µL. Dissolução completa do material teste foi determinada por inspeção visual. A solubilidade foi estimada destes experimentos com base no solvente total usado para fornecer dissolução completa. Deve ser notado que a solubilidade real pode ser maior do que aquela calculada por causa do uso de alíquotas de solvente que eram muito grandes ou devido a uma lenta taxa de dissolução.

[0190] Diversas amostras que não mostraram dissolução por adição de alíquota foram submetidas a um regime de ciclos de temperatura. Primeiro, as amostras foram aquecidas de 20°C até 3°C de ponto de ebulição de solvente (ou 100°C, o que foi menor) a 0,5°C/minuto;

em seguida resfriadas para 20°C a 0,2°C/minuto ao mesmo tempo que agitando a 800 rpm.

[0191] Dos dados de transmissão infravermelhos (IR) dos frascos-netes de amostra, eventos de dissolução e precipitação foram gravados como o ponto de transmissão completa de IR e o início de turbidez por IR respectivamente. As amostras selecionadas foram também agitadas sobre um agitador orbital a 50°C e visualmente observadas para dissolução.

[0192] **Determinação de solubilidade por equilíbrio.** Uma alíquota do solvente teste de água UHQ (1 mL) foi adicionada a uma amostra precisamente pesada dos sais de LA1 e agitada em temperatura ambiente durante um período de 4 dias. Uma amostra foi retirada, filtrada através de um filtro de PTFE de 0,2 µm, e analisada por HPLC.

[0193] **Difração de Pó de raio X (XRPD).** Análises de XRPD foram realizadas usando um difratômetro Panalytical Xpert Pro equipado com um tubo de raio X de Cu e um sistema detector Pixcel. As amostras isotérmicas foram analisadas em modo de transmissão e mantidas entre películas de polietileno de baixa densidade. As estruturas foram coletadas com etapas de 0,013° em ω , uma faixa de posição de detector de 3-40° em 2 θ com um tempo de contagem de 99 seg., e um tempo de realização de ~22 min. Os padrões de XRPD foram classificados e manipulados usando o *software* HighScore Plus 2,2c.

[0194] **Análise Térmica Diferencial Termogravimétrica (TG/DTA).** Análises termogravimétricas foram analisadas em um Mettler Toledo TGA/DSC1 STARe. Os padrões de calibração foram índio e estanho. As amostras foram colocadas em uma panela de amostra de alumínio, inseridas no forno TG e precisamente pesadas. O sinal de fluxo de calor foi estabilizado durante um minuto a 30°C, antes do aquecimento para 300°C em uma corrente de nitrogênio em uma taxa de 10°C/minuto.

[0195] **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de**

Próton (RMN). Análise de RMN de próton foi realizada em um instrumento Bruker 500MHz ou 400MHz em d_6 -DMSO ou MeOD. Uma gota de D₂O e/ou TFA foi adicionada a diversas amostras para mudar o pico de água de sobreposição com o pico devido à base.

[0196] **Análise de HPLC.** HPLC foi usada para determinar a solubilidade em equilíbrio aquosa em temperatura. HPLC foi conduzida usando uma coluna Supelco Ascentis Express C18, 4.6 x 150 mm, 2.7 μ m; uma fase móvel A contendo 0,1% de ácido fosfórico em água; uma fase móvel B contendo acetonitrila; um gradiente de solvente variando de 10% B a 95% B durante 9 minutos; uma taxa de fluxo de solvente de 1,5 mL/min; um volume de amostra de 10 μ L; e detecção de UV a 264 nm. O tempo de retenção de LA1 foi tipicamente de $8,4 \pm 0,2$ min. Um padrão para análise de HPLC foi inicialmente preparado usando ácido livre de LA1, porém foi insolúvel em DMSO:acetonitrila:água (1:1:1) e, portanto, outro padrão foi preparado usando sal de colina de LA1, que foi solúvel em acetonitrila:água (1:1).

[0197] **Caracterização de LA1.** LA1 como recebido foi um sólido cristalino pela análise de XRPD, porém continha algum distúrbio como indicado por ampliação de pico de algum dos picos de difração. (figura 2). Análise termogravimétrica/térmica diferencial (TG/DTA) foi realizada para determinar o perfil térmico e % de mudanças de peso associadas de LA1. Uma perda de peso de <1% foi observada abaixo de 280°C, sugerindo que o material é anidroso figura 3. Uma pequena perda de peso de 0,5% foi observada de 280-300°C, correspondendo a um pequeno endoterma no traço de DTA acompanhante, porém não foi também investigado.

[0198] O termograma de DSC da amostra indicou um início de fusão de ~318°C figura 4. Pequenos desvios para a linha de base foram observados entre 260-280°C, porém não foram também investigados. O espectro de RMN de próton do API foi registrado em d_6 -DMSO e em

conformidade com a estrutura molecular. Logo após a dissolução do API em d_6 -DMSO, precipitação notável foi observada no tubo de RMN, provavelmente devido à formação do solvato de DMSO conhecido.

[0199] **Solubilidade estimada de LA1.** Solubilidade aproximada de LA1 como recebido foi estimada em oito solventes pelos métodos de adição de alíquota a fim de selecionar solventes adequados para os estudos de sal (Tabela 3) e foi insolúvel em todos os solventes testados. Diversas misturas de solvente foram testadas, porém o API foi insolúvel em todas as misturas investigadas. Mesmo sob aquecimento, o API apenas dissolvido em DMF a 10 mg/mL a 73°C.

Tabela 3. Solubilidades aproximadas de LA1 a 20°C

Solvente	Acrônimo	Solubilidade aproximada (mg/mL)	Amostra no. (2116-)
Acetona	-	<10	001-09
Acetonitrila	ACN	<10	001-08
Anisol	-	<10	001-13
Diclorometano	DCM	<10	001-10
Dimetilformamida	DMF	<10	001-12
DMF:MeOH (1:1)	-	<10	001-19
DMF:THF (1:1)	-	<7	001-18
Hexafluoroisopropanol	HFIPA	<10	001-11
MeOH:ACN:dioxano (1:1:1)	MAD	<10	001-15
MeOH:acetona (1:1)	-	<10	001-16
Metanol	MeOH	<10	001-06
THF	THF	<10	001-07
THF:Acetona (1:1)	-	<10	001-14
THF:MeOH (1:1)	-	<10	001-17
DMF:água (1:1)	-	<10	001-20

[0200] Aqueles experimentos que não mostraram dissolução em ~10 volumes foram temperatura ciclada ou suspensa em uma temperatura elevada como descrito acima.

[0201] **Conclusões de caracterização e estudo de solvente.** A

análise de XRPD indicou que LA1 era um material cristalino desordenado. Os dados de TG/DTA mostram perda de peso insignificante 30-280°C, sugerindo umidade mínima ou teor de solvente residual, e indicando que LA1 permanece termicamente estável até 280°C. Uma pequena perda de peso de 0,5% com endoterma acompanhante foi observada a partir de 280-300°C, porém não foi investigado também. O termograma de DSC da amostra indicou um início de fusão de ~318°C. Pequenos desvios para a linha de base foram observados entre 260-280°C, porém não foram também investigados. A estrutura molecular foi confirmada por espectroscopia de ^1H RMN usando d_6 -DMSO. Precipitação foi observada no tubo de RMN após dissolução inicial do API e foi provavelmente devido à formação do solvato de DMSO conhecido. A solubilidade de LA1 foi avaliada por adição de alíquota e exibiu fraca solubilidade em todos os solventes testados. A dissolução foi obtida apenas em DMF com aquecimento (73°C) a ~10 mg/mL.

Exemplo 3. Preparação e Caracterização de Sais de LA1

[0202] Sais de LA1 com solubilidade aquosa melhorada e baixa higroscopicidade foram preparados e caracterizados.

[0203] Todos os sólidos dos experimentos de cristalização foram analisados por XRPD e os padrões resultantes em comparação com aqueles exibidos pelo material de partida. Aos novos padrões de XRPD foram designados um descritor alfabético em ordem de descoberta (Padrão B, Padrão C etc.). Onde material suficiente estava disponível, outra análise (por exemplo, RMN ou TGA) foi conduzida em sólidos com novos padrões de XRPD para permitir a tentativa de atribuição do novo padrão como um polimorfo, solvato, degradante ou misturas dos mesmos. Bases usadas são sumariadas na Tabela 4.

Tabela 4. Materiais e reagentes usados para estudos de sal

Base usada	Abreviação	Base usada	Abreviação
2-(dimetilamino)etanol	Deanol	Piperazina	-
4-(2-hidroxietil) morfina	-	Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃
hidrogenocarbonato de amônio	NH ₄ HCO ₃	Carbonato de hidrogênio de potássio	KHCO ₃
hidróxido de amônio	NH ₄ OH	hidróxido de potássio	KOH
hidróxido de cálcio	Ca(OH) ₂	Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃
Hidróxido de colina	-	Carbonato de hidrogênio de sódio	NaHCO ₃
Mono-hidrato de L-lisina	-	hidróxido de sódio	NaOH
hidróxido de magnésio	Mg(OH) ₂	Trometamina	TRIS
N-metil-D-glucamina	meglumina	-	-

[0204] **Técnicas com base em solvente.** Os experimentos com base em solvente foram inicialmente realizados em escala de aproximadamente 90 mg; entrtanto, isto foi revisado para escala de aproximadamente 20–30 mg em frascos de vidro devido ao API limitado.

[0205] Os experimentos foram realizados em uma escala de 20-30 mg com estequiometria equimolar e usando excesso de base. As quantidades pesadas de ácido e base foram combinadas em frascos de vidro, seguido por solvente e suspensas em temperatura ambiente ou 40°C. Alternativamente, quantidades pesadas de ácido foram combinadas com excesso de base em frascos de vidro e solventes adicionados. As amostras foram suspensas em temperatura ambiente ou a 40°C/50°C durante 1-2 dias. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo, centrifugação ou secados por evaporação lenta, purgados sob corrente de N₂ ou sob dissecação a vácuo.

[0206] **Evaporação lenta.** Alguns dos experimentos organizados como suspensões foram deixados evaporar até a secura sob condições ambientes, sob corrente de N₂ ou sob dissecação a vácuo e os sólidos isolados e analisados por XRPD. Uma amostra de trometamina produziu uma solução quando o API foi combinado com excesso de base e esta foi

evaporada sob corrente de N₂.

[0207] **Experimentos de suspensão.** LA1 e base (em estequiometria equimolar ou em excesso) foram colocados em um frasconete e solvente adicionado. A mistura foi agitada na temperatura selecionada por agitação magnética durante 1 ou 2 dias. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo/centrifugação e secados por ar antes da análise por XRPD.

[0208] **Sonicação.** Os sólidos gerados de experimentos de suspensão foram sonicados a 70% de intensidade durante aproximadamente 8 minutos usando um processador ultrassônico Cole-Parmer 130W usando um programa pulsado. Todos os sólidos recuperados destes experimentos foram analisados usando XRPD.

[0209] Técnicas de evaporação, suspensão prolongada (em temperatura ambiente e elevadas) e sonicação foram empregadas usando uma estequiometria equimolar de API para base. O excesso de base foi também usado para diversos experimentos visto que os resultados iniciais de misturas equimolares de diversas bases indicaram formação de sal incompleta.

[0210] **Evaporação em frasconetes.** Apenas as amostras que se dissolveram completamente foram aquelas com colina in DMF ou MeOH-THF, a formação de uma solução vermelho escuro. A evaporação destas soluções gerou óleos, que foram em seguida secadas sob vácuo. Os sólidos foram recuperados de uma das amostras após secagem, porém a outra amostra permaneceu como um óleo pegajoso e não foi analisado (Tabela 5). O sólido foi composto de material cristalino (figura 5) e a formação de sal foi confirmada com relação aos sólidos por espectroscopia de ¹H RMN.

Tabela 5. Resultados de evaporações em frasconetes

Base	Condições	Evaporação lenta	
		Resultado	XRPD
colina	1:1 base:API slurry @ 50°C THF-MeOH (3:1). Evaporação lenta sob N ₂	Sólido vermelho escuro	Padrão G
colina	XS API + DMF, evaporação de soln, seco sob vac	Óleo pegajoso	-

[0211] **Experimentos de suspensão.** As suspensões de LA1 e base foram agitadas em vários solventes em temperatura ambiente ou 40/50°C durante 1-2 dias e analisadas por XRPD (Tabela 6). Diversas suspensões foram evaporadas até a secura deixando-as destampadas ou sob N₂. Duas novas formas do API foram isoladas de diversos experimentos (materiais de padrão C e D) e são também descritos na seção 7. Os sólidos cristalinos foram isolados de diversos contrações incluindo os sais de colina, meglumina, trometamina e sais de colina (figura 6), e sólidos desordenados de Ca, K, Mg, Na e piperazina (figura 9), embora muitos fossem misturas contendo API. Uma nova forma de sal de colina foi cristalizada e duas formas de sais de Ca e trometamina foram isoladas. A formação de sal foi confirmada com relação aos sólidos únicos por espectroscopia de ¹H RMN.

Tabela 6. Resultados de experimentos de suspensão

Base	amostra (2116-)	Condições	XRPD
Ca(OH) ₂	011-24	1:2 base:API, suspensão @ 40°C em água-NMP (5:1)	Padrão N (desordenado)
colina OH	011-26	1:1 base:API suspensos em THF em RT	Padrão O
meglumina	011-07_1	1:1 base:API suspensão @ 50°C em THF-MeOH (2:1). Evaporação lenta sob N ₂	Padrão H

Base	amostra (2116-)	Condições	XRPD
Piperazina	011-28	1:1 base:API suspensão @ 40°C 1 day	Padrão P)
trometamina	011-23_2	2:1 base:API suspensão @ 40°C em NMP. Evap parcial sob N ₂ . Lavado 4x THF.	Padrão M

[0212] **Conclusões de estudos de sal.** Sais de LA1 foram preparados usando doze bases farmacologicamente aceitáveis e condições e técnicas de cristalização diferentes envolvidas.

[0213] Cinco sais foram isolados que exibiam cristalinidade: colina, meglumina, cálcio, piperazina, e trometamina. Formação de sal para cada qual foi confirmada por análise de ¹H RMN e os sais de trometamina pareceram ser solvatos de NMP. Múltiplas formas de sais foram isoladas quanto aos sais de colina, trometamina, e sais de cálcio. Os sólidos foram também isolados de contraíons de Ca, Mg, e Na que exibiram cristalinidade, porém por XRPD pareceram ser uma mistura de API e sal suspeito. A conversão completa em sais não seria obtida, exceto por uma amostra de sal de Ca, que foi desordenado por XRPD. Os sólidos isolados de outros contraíons foram compostos de misturas de materiais de partida.

Exemplo 4. Higroscopicidade e solubilidade aquosa de sais cristalinos

[0214] **Estresse por umidade a 40°C/75% de RH.** As amostras de sal que exibiam cristalinidade foram estressadas sob condições de 40°C/75% de umidade relativa durante 5-6 dias para avaliar a deliques-cência e higroscopicidade. Aproximadamente, 5 mg de sais de LA1 que exibiram cristalinidade foram adicionados aos frascos de vidro, que foram colocados destampados no interior dos frascos maiores contendo solução aquosa saturada de NaCl. Os frascos maiores foram tampados, selados com Parafilm e colocados dentro de um forno a 40°C durante até 6 dias. Os sais foram em seguida re-

movidos destas condições e as mudanças observadas (por exemplo, cor, deliquescência etc.) antes de serem analisados quanto à mudança de peso e por XRPD. As amostras foram examinadas visualmente após estresse, a composição de forma confirmada pela análise de XRPD e mudança de peso registrada (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados de experimentos de estresse por umidade

Sal	Amostra (2116-)	Resultado	Ganho de peso (%)	XRPD após estresse
Ca	021-04	Sólido, não deliquescente	1,7	Mais desordenado
colina	021-01	Sólido, não deliquescente	8,9	Novo padrão (Q)
meglumina	021-02	Sólido, não deliquescente	1,4	Nenhuma mudança
piperazina	021-05	Sólido, não deliquescente	-5,5	Novo padrão (R)
Trometamina	021-03	Sólido, não deliquescente	n/a	Novo padrão (S)

[0215] Nenhuma das amostras deliquescentes sob as condições de umidade testadas, porém três das amostras ganharam peso, particularmente para o sal de colina. Além disso, a análise de XRPD indicou que os sais de colina, trometamina e piperazina haviam sido submetidos à mudança de fase após estresse, possivelmente às formas hidratadas. O grande peso de ganho notado com relação ao sal de colina suportaria a formação de hidrato, porém uma perda de peso foi observada com relação ao sal de piperazina, a causa da qual é desconhecida.

[0216] **Solubilidades aquosas de sais selecionados.** As solubilidades aquosas de sais que exibiram cristalinidade e não foram deliquescentes foram determinadas por análise de HPLC em temperatura ambiente. As amostras foram suspensas em água durante 4-5 dias antes da análise. A solubilidade é sumariada na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados de estimativa de solubilidade aquosa

Sal	Amostra (2116-)	Entrada de sal (2116-)	Solubilidade aquosa (mg/mL) ¹	Purificação de HPLC(%)	pH de Soln	Aparência
Cálcio	029-04	011-24	0,002	5,58	7	Nenhuma mudança
Colina	029-01	011-06	7,052	75,51	8	Cor vermelha mais escura

Sal	Amostra (2116-)	Entrada de sal (2116-)	Solubilidade aquosa (mg/mL) ¹	Purificação de HPLC(%)	pH de Soln	Aparência
Meglumina	029-02	011-07_1	0,724	34,7	8	Nenhuma mudança
Piperazina	029-06	011-28	0,013	5,31	8	Nenhuma mudança
Trometamina	029-03	011-23	0,387	89,7	8	ppt amarelo observado

Nota: Os valores de concentração foram corrigidos com relação ao peso de contraíon, pureza de teor padrão (91.6%) e volátil de padrão (4,8%).

[0217] O sal de colina foi o mais solúvel a 7,1 mg/mL, seguido por meglumina e trometamina. Os sais de cálcio e piperazina não foram muito solúveis.

[0218] O sal de trometamina mudou de cor durante a suspensão para um sólido amarelo. A análise de XRPD indicou que tinha se convertido para o API livre durante a suspensão e assim, não foi fisicamente estável em água durante aquele período de tempo. A estimativa de solubilidade e pureza química por HPLC foi aproximada à medida que o método de HPLC não foi validado. Os resultados sugerem que todos os sais não são quimicamente estáveis quando suspensos em meios aquosos durante 4-5 dias. Entretanto, os dados foram obtidos após 4-5 dias de suspensão a fim de obter solubilidade em equilíbrio; é possível que os sais possam ser estáveis durante períodos de tempo mais curtos em água.

Exemplo 5. Graduação de Colina e Meglumina de Produção de Sal

[0219] **Produção de pequena escala.** Ambos os sais foram preparados em uma pequena escala suspendendo os componentes em etanol (Tabela 9). O sal de colina foi também suspenso em acetona e EtOAc visto que a produção de EtOH foi baixa, devido à solubilidade melhorada do sal em EtOH.

[0220] O padrão de XRPD do sal de colina de EtOH equiparou-se àquele do sal gerado de dioxano-THF, porém as amostras de acetona e EtOAc exibiram um padrão de pó diferente, que se equiparou àquele

da amostra do estresse 40°/75% de umidade relativa, veja seção 6.1 (figura 10). A amostra de acetona foi analisada por espectroscopia de ^1H RMN e a formação de sal foi confirmada. Uma gota de TFA foi adicionada para mudar o pico de água de sobreposição com o pico devido à colina. Acetona não foi detectada no espectro.

[0221] Os sólidos da preparação de sal de meglumina exibiram um padrão de pó único (figura 10). A formação de sal foi confirmada por espectroscopia de ^1H RMN e etanol estava presente em 1 mole eq. Sugerindo a formação de solvato.

Tabela 9. Resultados de cristalização de sais de colina e meglumina

Base/ ID	Solvente	Método	XRPD	Comentários
colina/ 2116-031-01	EtOH, MTBE (2:1)	1:1 base:API suspenso @ 40°C ~2 horas. Alíquota removida, filtro a vácuo, MtBE wash	Padrão G, combina com 011-06	Sólido laranja
colina/ 2116-031-03	acetona	1:1 base:API suspenso em temperatura ambiente o/n. Alí- quota removida, filtro a vácuo	Padrão Q, combina com sal es- tressado a 40 C/75%de Umida- de Relativa (021-01)	Sólido ver- melho
colina/ 2116-031-04	EtOAc	1:1 base:API suspenso em temperatura ambiente o/n. Alí- quota removida, filtro a vácuo	Padrão Q	Sólido laranja
meglumina/ 2116-031-02	EtOH	1:1 base:API suspenso @ 40°C ~2 horas. Alíquota removida, filtro a vácuo, lavagem com MtBE	novo Padrão (T)	Sólido laranja amarelado

o/n = durante a noite, RT = temperatura ambiente, vac = vácuo

[0222] **Preparação de sal de meglumina de LA1 em uma grande escala (2116-033-02).** LA1 (203,3 mg) e N-metil-D-glucamina (94,16 mg) foram pesados em um frascote de vidro seguido pela adição de EtOH (0.6 mL) e a mistura agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com t-BME, em seguida com EtOH. Os sólidos foram em seguida colocados em um forno a vácuo e secados a

40-47°C durante a noite. Um pó vermelho/laranja foi coletado, produzido = 71%.

[0223] **Preparação de sal de colina de LA1 em uma escala maior (2116-033-04).** LA1 (201,3 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água (117,3 µL) foram combinados em um frasco-nete de vidro, seguido pela adição de acetona (0,7 mL) e a mistura agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e secados por ar. Um pó vermelho-escuro foi coletado, produção = 73%.

[0224] Ambos os sais foram inicialmente preparados em uma escala maior de etanol. Análise de XRPD de sólidos da suspensão de sal de colina indicou que o sal tinha se formado, porém continha uma pequena quantidade de API (figura 14). Alguns picos de difração única foram também observados indicando a presença de uma quantidade menor de um componente adicional. A formação de sal foi confirmada por espectroscopia de ¹H RMN. A produção para o sal de colina foi fraca devido à solubilidade aumentada em etanol e, portanto, a preparação foi repetida. A amostra repetida foi secada sob vácuo para remover o etanol residual, porém a análise de XRPD indicou que ela foi desordenada e foi diferente da forma original (figura 14). A amostra também continha uma quantidade significativa de API. A formação de sal foi confirmada por espectroscopia de ¹H RMN.

[0225] A preparação foi repetida novamente usando acetona com melhor produção e os sólidos cristalinos foram compostos de material de Padrão Q (figura 14). A formação de sal foi confirmada por espectroscopia de ¹H RMN.

[0226] O sal de meglumina foi preparado em uma escala maior com produção razoável e o padrão de XRPD foi consistente com aquele de sal gerado em uma escala menor de etanol (figura 14). A Quantidade menor de API estava também presente por análise de

XRPD. A amostra foi secada para remover o solvente residual e análise de XRPD indicou que o sólido foi desordenado, porém continua a mesma forma (figura 14). A formação de sal foi confirmada por espectroscopia de ^1H RMN com uma estequiometria equimolar e continha 0,5 mol eq. de etanol.

Exemplo 6. Preparação de Leucaderina sal de meglumina de LA1 Form H

[0227] LA1 de leucaderina (203.3 mg) e N-metil-D-glucamina (94,16 mg) foram pesados em um frascote de vidro. Etanol (0,6 mL) foi adicionado e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com metil éter de t-butila, em seguida com etanol. Os sólidos foram em seguida colocados em um forno a vácuo e secados a 40-47°C durante a noite. Um pó vermelho/laranja foi coletado, produção = 71%. Alternativamente, LA1 de leucaderina (~200 mg) e N-metil-D-glucamina em uma relação 1:1 foram pesadas em um frascote de vidro. Tetra-hidrofurano:Metanol (2:1, 0,6mL) foi adicionado e a mistura agitada a 50°C com uma lenta evaporação sob atmosfera de nitrogênio. Um sólido vermelho/laranja foi coletado. ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,87 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, $J_{AB} = 3,9$ Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, $J = 4,4, 3,9$ Hz), 3,68 (dd, 1H, $J = 4,9, 1,5$ Hz), 3,60 (dd, 1H, $J = 10,9, \text{ Hz}$), 3,50 (m, 1H) 3,44 (dd, 1H, $J = 8,1, 1,7$ Hz), 3,41 (dd, 1H, $J = 10,8, 5,8$ Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, $J = 12,5, 3,8$ Hz), 2,84(dd, 1H, $J = 11,3, 7,8$ Hz), 2,47 (s, 3H).

[0228] A forma H produz um padrão de difração de pó de raio X único (figura 6B; Tabela 10).

Tabela 10. Intensidades e posições de pico de difração de pó de raio X para Forma H de Leucaderina sal de meglumina de LA1.

Posição de pico 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição de pico 2θ (Cobre)	Intensidade
5,334	1574	23,092	1135
7,128	3086	23,326	732
9,221	985	23,56	1443
9,611	871	23,82	787
10,716	2414	23,859	716
10,716	2414	24,86	1360
10,911	2184	25,302	795
11,847	1077	27,2	1554
12,315	995	28,019	504
14,109	922	29,761	511
14,876	804	30,021	420
16,085	1271	30,268	419
16,488	1653	30,359	433
17,047	963	31,074	685
17,658	1285	32,14	363
18,477	1127	33,141	291
18,828	837	33,453	283
19,166	819	33,713	436
19,322	994	33,804	389
19,725	1062	34,181	298
19,855	784	34,701	408
20,31	1438	35,715	318
20,817	852	36,118	285
20,856	866	36,287	337
21,545	726	36,508	301
22,078	617	38,419	372
22,377	640	38,536	343

Exemplo 7. Preparação de forma T de Leucaderina sal de meglumina de LA1

[0229] LA1 de leucaderina (~200 mg) e N-metil-D-glucamina em uma relação 1:1 foram pesadas em um frascote de vidro. Etanol (0,6mL) foi adicionado e a mistura agitada a 50°C durante 2 horas. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com metil éter de t-butila. Um sólido vermelho/laranja foi coletado. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, J_{AB} = 3,9 Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, J = 4,4, 3,9 Hz), 3,68 (dd, 1H, J = 4,9, 1,5 Hz), 3,60 (dd, 1H, J = 10,9, Hz), 3,50 (m, 1H) 3,44 (dd, 1H, J = 8,1, 1,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, J = 10,8, 5,8 Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, J = 12,5, 3,8 Hz), 2,84(dd, 1H, J = 11,3, 7,8 Hz), 2,47 (s, 3H).

[0230] A Forma T produz um padrão de difração de pó de raio X único (Tabela 11).

Tabela 11. Intensidades e posições de pico de difração de pó de raio X para forma T de Leucaderina sal de meglumina de LA1

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
6,907	1088
8,233	882
8,376	1295
9,416	723
11,587	672
14,98	518
15,058	526
15,5	593
17,229	958
17,84	557
18,061	579
20,531	506

Posição 2 θ (Cobre)	Intensidade
21,285	838
21,909	751
22,312	684
23,508	546
24,964	587
26,719	579

Exemplo 8. Purificação de polimorfos de sal de meglumina de LA1 (NMDG).

[0231] Sais de NMDG foram purificados através de recristalização por aquecimento em várias temperaturas ou em temperatura ambiente em vários solventes como mostrado na Tabela 12-Tabela 13. A Tabela 12 mostra análise de polimorfo de sal de meglumina em solventes próticos, e Tabela 13 mostra análise de polimorfo de sal de meglumina em solventes apróticos. Os solventes próticos incluíam metanol, etanol, álcool isopropílico, n-butanol e água. Os solventes apróticos incluíam acetona, acetato de etila, dimetilformamida (DMF), dimetil sulfoxido (DMSO), álcool isopropílico (IPA), tetra-hidrofurano (THF), acetonitrila (ACN) e N-metil pirrolidona (NMP). A precipitação ocorreu em temperatura ambiente. Nenhuma solução clara foi observada sob aquecimento. A figura 15 mostra o padrão de XRPD obtido para sais de meglumina de LA1 em vários solventes.

[0232] A forma cristalina L foi obtida em isopropilacetato, a 70°C, e é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a figura 11, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . A forma cristalina M foi obtida em acetona, a 70°C, e é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a figura 12, como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . A forma cristalina N foi obtida em DMF, a 70°C, e é caracterizada por um padrão de difração de pó de

raio X (XRPD) de acordo com a figura 13 (e figura 15I), como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

Tabela 12. Análise de polimorfo de sal de meglumina em solventes práticos

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD
Metanol	1:30 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA
Etanol	1:30 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA
IPA	1:30 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA
n-Butanol	1:30 Sal:Solvente a 100°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA
Metanol	1:30 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD
Etanol	1:30 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração parcial de sal é observada com base no padrão de RMN	NA
H ₂ O	1:30 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração completa de sal é observada com base no padrão de RMN	NA

Tabela 13: Análise de polimorfo de sal de meglumina em solventes apróticos

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Pureza de HPLC (A%)
DMF	1:10 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada, Precipitado apareceu sob resfriamento em temperatura ambiente, MTBE foi usado para transferência e filtragem	RMN em conformidade com o autêntico, DSC mostra amplo ponto de fusão de 139,9°C, Forma N de cristal	Veja, Fig. 15I, Fig. 13	98,72
DMF	1:10 Sal:Solvent e a 25-30°C	Solução clara observada, Precipitado apareceu sob resfriamento em temperatura ambiente, MTBE foi usado para transferência e filtragem,	RMN em conformidade com o autêntico, DSC mostra amplo ponto de fusão de 139,3°C	Veja, Fig. 15B	98,65
DMSO	1:10 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada. Metanol adicionado em temperatura ambiente para precipitação	Desintegração de sal é observada com base no padrão de RMN	NA	
DMSO	1:5 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada. Metanol adicionado em temperatura ambiente para precipitação	Desintegração de sal é observada com base no padrão de RMN,	NA	
DMSO	1:5	Solução clara ob-	Precipitação	NA	

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Pureza de HPLC (A%)
	Sal:Solvent e a 70°C	servada. Sob resfriamento, THF adicionado como antissolvente	não ocorreu		
DMSO	1:5 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada, Sob resfriamento, ACN adicionada como antissolvente e ppt observed	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 15J	
DMSO	1:5 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada. Sob resfriamento, Acetona adicionada como antissolvente	Precipitação não ocorreu	NA	
THF	1:30 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada, Precipitação apareceu durante resfriamento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 15H (Amorphous)	97,80
ACN	1:30 Sal:Solvent e a 70°C	Nenhuma solução clara observada, Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 15C	
Acetona	1:30 Sal:Solvent e a 70°C	Nenhuma solução clara observada, Natureza macia observada durante o aquecimento	Desintegração parcial de sal é observada com base no padrão de RMN, DSC mostra espectro com a ponto de fusão de 294,5°C, forma M de cristal	Veja, Fig. 15D, Fig. 12	98,53
Acetato de etila	1:30 Sal:Solvent e a 70°C	Nenhuma solução clara observada, Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico, DSC mostra amplo ponto de fusão de 114,5°C	Veja, Fig. 15G	98,76
Acetato de isopropila	1:30 Sal:Solvent e a 70°C	Nenhuma solução clara observada, Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico, DSC mostra ponto de fusão de 136,3°C, forma L de cristal	Veja, Fig. 15F, Fig. 11	98,99
NMP	1:10 Sal:Solvent e a 70°C	Solução clara observada, Sob resfriamento, MTBE adicionado para precipitação	Desintegração parcial de sal é observada com base no padrão de RMN	Veja, Fig. 15E	93,74

Exemplo 9. Preparação de Sal de colina de LA1 de leucaderina Form G

[0233] LA1 de leucaderina (~200 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água em uma relação 1:1 foram suspensos em uma solução de tetra-hidrofurano:metanol (3:1, 0,7 mL) em um frascote de vidro e a mistura agitada a 50°C com uma lenta evaporação sob atmosfera de nitrogênio. Um sólido vermelho escuro foi coletado.

[0234] Alternativamente, LA1 de leucaderina (~200 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água em uma relação 1:1 foram suspensos em uma solução de etanol:metil éter de t-butila (2:1, 0,7 mL) em um frascote de vidro e a mistura agitada a 40°C durante 2 horas. Os sólidos foram isolados por filtragem a vácuo, lavados com t-butil éter de metila e secados por ar. Um sólido vermelho escuro foi coletado. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).

[0235] A forma G produz um padrão de difração de pó de raio X único (Tabela 14).

Tabela 14. Intensidades e posições de pico de difração de pó de raio X para forma G de sal de colina de LA1 de Leucaderina

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
5,555	1684	20,024	603
7,869	685	21,051	557
11,158	1298	22,949	509
13,329	769	24,639	1051
15,045	1133	24,964	1146
15,656	825	25,575	1881
16,072	1512	26,641	461
16,202	639	26,823	613
16,475	793	26,901	539

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
16,644	1734	29,28	368
17,801	509	29,683	334
18,113	520	30,58	286
18,49	683	30,697	332
19,062	1192	34,415	215
19,829	600		

Exemplo 10. Preparação de Forma O de sal de colina de LA1 de leucaderina

[0236] LA1 de leucaderina (~200 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água em uma relação 1:1 foram suspensos em uma solução de THF (0,7 mL) em um frascote de vidro e a mistura agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e secados por ar. Um sólido vermelho escuro foi coletado. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).

[0237] A forma O produz um padrão de difração de pó de raio X único (Tabela 15).

Tabela 15. Intensidades e posições de pico de difração de pó de raio X para Sal de colina de LA1 de leucaderina Form O

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
8,35	1010	19,907	777
8,792	1057	20,661	765
9,286	998	20,934	605
13,251	806	21,402	609
14,304	826	21,727	850

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
16,735	1365	22,52	661
17,008	826	23,417	669
18,074	731	24,145	722
19,426	784	25,458	610
19,647	735	25,549	587

Exemplo 11. Preparação de Forma Q de sal de colina de LA1 de leucaderina

[0238] LA1 de leucaderina (~200 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água em uma relação 1:1 foram suspensos em uma solução de acetona (0,7 mL) em um frascote de vidro e a mistura agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e secados por ar. Um sólido vermelho escuro foi coletado. Alternativamente, LA1 de leucaderina (~200 mg) e ~46% de solução de hidróxido de colina em água em uma relação 1:1 foram suspensos em uma solução de acetato de etila (0.7 mL) em um frascote de vidro e a mistura agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e secados por ar. Um sólido vermelho-escuro foi coletado. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).

[0239] A forma Q produz um padrão de difração de pó de raio X único (Tabela 16).

Tabela 16. Intensidades e posições de pico de difração de pó de raio X para forma Q de sal de colina de LA1 de leucaderina

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
4,996	2333	21,74	1114
5,23	932	22,884	925

Posição 2θ (Cobre)	Intensidade	Posição 2θ (Cobre)	Intensidade
8,35	2283	23,703	1447
9,585	1626	24,847	1082
9,91	1604	25,094	793
11,548	1112	25,263	800
12,64	1272	25,302	813
12,822	1947	25,341	812
13,303	2639	25,497	2964
14,369	1193	26,329	749
15,812	937	26,927	728
16,085	834	26,979	727
16,579	1095	28,136	803
17,541	1074	28,773	560
17,957	1194	30,424	505
19,283	2225	31,204	534
20,557	857	31,958	409
20,726	1096	35,702	386
21,467	1046	37,392	335

Calorimetria de Varredura Diferencial

[0240] A Tabela 17 mostra as temperaturas de fusão de formas várias de sais de colina e meglumina.

Tabela 17: Leituras de termograma de DSC de várias formas de sais

Tipo de forma	Início de fusão (°C)	Pico de fusão (°C)	Entalpia (J/g)
Forma A			
Forma G			
Forma H			
Forma O			
Forma R	221,45	224,48	157,5
Forma S			
Forma L	132,13	136,32	59,29
Forma M	276,23	294,45	46,18
Forma N	130,18	139,87	84,91

Exemplo 12. Purificação de polimorfos de sal de colina de LA1

[0241] Sais de colina foram purificados através de recristalização por aquecimento em várias temperaturas ou em temperatura ambiente em solventes próticos e apróticos como mostrado na Tabela 18 e Tabela 19. A Tabela 18 mostra análise de polimorfo de sal de colina em solventes próticos, e Tabela 19 mostra análise de polimorfo de sal de colina em solventes apróticos. Os solventes próticos incluíam metanol, etanol, álcool isopropílico, n-butanol e água. Os solventes apróticos incluíam acetona, acetato de etila, dimetiformamida (DMF), dimetil sulfoxido (DMSO), álcool isopropílico (IPA), tetra-hidrofurano (THF), acetonitrila (ACN) e N-metil pirrolidona (NMP). A precipitação ocorreu em temperatura ambiente. Nenhuma solução clara foi observada sob aquecimento. Figura 16 mostra o padrão de XRPD obtido para sais de colina de LA1 em vários solventes separadamente. A forma cristalina R foi obtida em n-butanol, a 70°C, e é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a figura 7 (e figura 16A), como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α . A forma cristalina S foi obtida em metanol, a 70°C, e é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a figura 8 (figura 16L), como determinado em um difractômetro usando radiação de Cu-K α .

Tabela 18. Análise de polimorfo de sal de colina em solventes próticos

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Purificação de HPLC (A%)
Metanol	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Solução clara observada, Precipitação ocorre após resfriamento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16B, Fig. 8	99,93
Etanol	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Solução clara observada, Precipitação ocorre após resfriamento	RMN em conformidade com o autêntico	--	

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Purificação de HPLC (A%)
IPA	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16F	
IPA	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16E	
n-Butanol	1:20 Sal:Solvente a 120°C	Solução clara observada, Precipitação observada sob resfriamento em temperatura ambiente	RMN em conformidade com o autêntico, forma R cristalina	Veja, Fig. 16A, Fig. 7	>99 (por LCMS)
Metanol	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Solução clara observada. Precipitação após envelhecimento	RMN em conformidade com o autêntico, forma S cristalina	Veja, Fig. 16L, Fig. 8	99,47
Etanol	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Solução clara não encontrada	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16G	99,75
H ₂ O	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Turbidez de solução observado	Não filtrável	-	

Tabela 19. Análise de polimorfo de sal de colina em solventes apróticos

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Purificação de HPLC (A%)
Acetato de iso-propila	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16D	89,61
Acetato de iso-propila	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16C	97,85
Acetona	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16K	99,62

Solvente	Condição	Observação	Comentários	XPRD	Purificação de HPLC (A%)
Acetona	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16J	99,44
Acetato de etila	1:20 Sal:Solvente a 70°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16I	98,56
Acetato de etila	1:20 Sal:Solvente a 25-30°C	Nenhuma solução clara observada. Natureza macia observada durante o aquecimento	RMN em conformidade com o autêntico	Veja, Fig. 16H	98,77

Exemplo 13. Caracterização de propriedades farmacocinéticas de ácido livre de LA1 em ratos.

[0242] A biodisponibilidade intraperitoneal e oral absoluta de LA1 foi avaliada em ratos Sprague Dawley (SD) após administração por rotina oral simples e IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) de LA1.

[0243] Em um primeiro experimento, a solução de dose foi preparada em 30% p:v de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina preparada em PBS a 2 mg/kg. *Depuração* (ml/min/kg) e biodisponibilidade (AUC em mM*h) são resumidas na Tabela 20. Biodisponibilidade melhorada foi necessária.

Tabela 20. Dados de PK com relação ao ácido livre de LA1 para administração PO

DMPK PO - 2 mg/kg	Ácido livre de LA1
Rato CI (ml/min/kg)	11,1
Rat= F% (AUC e mM*h)	15,1% (8,7)
Vss (L)	0,59
t _{1/2} (h)	2,03
MRT (h)	3,49

[0244] Em um segundo experimento, a solução de dose foi preparada em Tween-80 (0,02%) e 0,5% de metil celulose em água Milli-Q. Soluções de dose IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) foram preparadas em 5% de DMSO e 95% de PEG-200. O PK de rato mostra *depuração* razoável de 20 ml/min/kg como mostrado na Tabela 21. A dosagem PO não alcançou exposição significativa para produzir dados para cálculos. A dosagem IP produziu 82% de biodisponibilidade (3,5 mM*h) PO (2 mg/kg).

Tabela 21. Dados de PK para ácido livre de LA1 para administração PO e IP

DMPK		Ácido livre de LA1
PO - 2 mg/kg	Rato Cl (ml/min/kg)	19,7
	Rato F% (AUC em mM*h)	Exposição muito baixa
	Vss (L/kg)	4,19
	t _{1/2} (h)	Exposição muito baixa
	MRT (h)	Exposição muito baixa
IP - 2 mg/kg	Rato Cl (ml/min/kg)	19,7
	Rato F% (AUC em mM*h)	81,6% (3,5)
	Vss (L/kg)	4,19
	t _{1/2} (h)	0,78
	MRT (h)	3,44

Exemplo 14. Caracterização de propriedades farmacocinéticas de ácido livre de LA1 micronizado em ratos

[0245] A solução de dose PO (2 mg/kg) foi preparada em Tween-80 (0,02%) e 0,5% de metil celulose em água Milli-Q. A solução de dose IV (1 mg/kg) foi preparada em uma solução de 5% de DMSO e 95% de PEG-200. O PK de rato mostra *clearance* razoável de 23,4 ml/min/kg como mostrado na Tabela 22. A dosagem PO produziu 23% de biodisponibilidade (0,76 µM*h).

[0246] Após administração IV de LA1, a t_{1/2} e *clearance* foram cons-

tatadas ser de 1,16 h e 19,7 mL/min/Kg, respectivamente. O volume médio de distribuição foi de 2,39 L/Kg. Após administração IP de LA1, a $C_{\text{máx}}$ média foi de 1284 ng/mL atingida a 0,25 hora (t_{max}). A $t_{1/2}$ foi constatada ser de 0,78 h. A biodisponibilidade IP absoluta foi de 82%.

Tabela 22. Dados de PK de administração PO de ácido livre de LA1 micronizado

DMPK PO - 2 mg/kg	Ácido livre de LA1 (Micronizado)
Cl de rato (ml/min/kg)	23,4
F% de rato (AUC em mM*h)	23% (0,76)
Vss (L/kg)	2,14
$t_{1/2}$ (h)	1,10
MRT (h)	2,04

Exemplo 15. Caracterização de propriedades farmacocinéticas para sal de LA1s em ratos

[0247] A biodisponibilidade oral e intraperitoneal absoluta de LA1 foi avaliada em ratos SD seguindo uma dose oral simples (*per os*, PO) e intraperitoneal (IP) (2 mg/kg) e administração intravenosa (IV) (1 mg/kg) de LA1, sal de colina de LA1, e sal de meglumina de LA1. Os estudos foram conduzidos com a forma Q de sal de colina e forma T de sal de meglumina preparadas de acordo com o Exemplo 5.

[0248] The PK os estudos foram conduzidos como por protocolo aprovado por IAEC interno no. IAEC/JDC/2012/27. As rotinas de administração foram, a saber, PO (gavagem), IP (bolus) e IV (bolus através de veia da cauda). Um total de quatro ratos machos SD foram usados com idades entre 5 a 6 semanas. O regime de alimentação incluía 12 horas de jejum e a comida foi fornecida 2 horas após a inoculação de dosagem e água foi fornecida à vontade. O cronograma de

coleta de sangue para PO/IP foi em 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 e 24 horas, e para IV foi em 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas. Para dosagem PO, tween-80 (0,02%) e 0,5% de metil celulose preparados em água Milli-Q foram usados como veículos; para dosagem IP e IV, 5% de DMSO e 95% PEG-200 foram usados como veículos.

[0249] **Procedimento de preparação de dose de LA1:** Para dosagem PO, 2,00 mg de LA1 foram umedecidos com ~30 µL de Tween-80 e triturados em um almofariz e pilão, em seguida lentamente 0,5% de metil celulose foi adicionado para preparar o volume final para 10,0 mL. Para dosagem IP, 2,050 mg de LA1 foram dissolvidos em 100 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 1,90 mL de PEG-200 foram adicionados. Para dosagem IV, 2,010 mg de LA1 foram dissolvidos em 200 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 3,80 mL de PEG-200 foram adicionados.

[0250] **Procedimento de preparação de dose de colina de LA1:** Para dosagem PO, 3,670 mg de sal de colina de LA1 foram umedecidos com ~30 µL de Tween-80 e triturados em um almofariz e pilão, em seguida lentamente 0,5% de metil celulose foi adicionado para preparar o volume final para 13,90 mL. Para dosagem IP, 4,286 mg de sal de colina de LA1 foram dissolvidos em 162 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 3,078 mL de PEG-200 foram adicionados. Para dosagem IV, 2,025 mg de sal de colina de LA1 foram dissolvidos em 153 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 2,907 mL de PEG-200 foram adicionados.

[0251] **Procedimento de dose de colina de LA1:** Para dosagem PO, 3,600 mg de sal de meglumina de LA1 foram umedecidos com ~30 µL de Tween-80 e triturados em um almofariz e pilão, em seguida lentamente 0,5% de metil celulose foram adicionados para um volume final de 11,760 mL. Para dosagem IP, 4,134 mg de sal de meglumina de LA1 foram dissolvidos em 135 µL de DMSO, turbilhonados e 2,565

mL de PEG-200 foram adicionados. Para dosagem IV, 2,066 mg de sal de meglumina de LA1 foram dissolvidos em 135 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 2,565 mL de PEG-200 foram adicionados.

[0252] Solução de matéria-prima (178 µg/mL) em metanol foi também diluída usando metanol: água (80:20, v/v) para obter soluções de trabalho na faixa de 10,4 a 20745 ng/mL.

[0253] **Metodologia para preparação de amostras de CC/QC:** 50 µL de amostra foram aliquotadas em frascos pré-rotulados. A eles foram adicionados 200 µL de 10% de Tetra-hidrofurano contendo Is (100 ng/mL; tolbutamida) e misturados bem, turbilhonados durante 5 minutos seguidos por centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi separado e 5 µL do mesmo foram injetados em LC-MS/MS.

[0254] Análise de dados: Os dados de concentração-tempo individuais foram analisados usando WinNonlin (Versão 5.3) por método de análise não compartimental (NCA).

Resultados:

[0255] O PK de rato mostrou *clearance* razoável de 18 mL/min/kg como mostrado na Tabela 23. Dosagem de PO produziu 41% de biodisponibilidade (1,5 mM*h). A dosagem IP produziu 84% de biodisponibilidade (3,2 mM*h). Solução de dose PO (2 mg/kg) foi preparada em Tween-80 (0,02%) e 0,5% de metil celulose em água Milli-Q. As soluções de dose IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) foram preparadas em 5% de DMSO e 95% PEG-200.

[0256] Resultados com relação ao sal de colina de LA1 são mostrados na Tabela 23. Após administração oral de sal de colina de LA1, a concentração plasmática máxima para LA1 (C_{máx}: 477 ng/mL) foi atingida a 0,50 h (t_{max}). A t_{1/2} foi constatada ser de 1,57 horas. A biodisponibilidade oral absoluta foi de 41%. Após administração IP de sal de colina de LA1, a C_{max} média para LA1 foi de 1590 ng/mL, que foi atingida a 0,25

h (t_{max}). A $t_{1/2}$ foi constatada ser de 1,60 h. A biodisponibilidade IP absoluta foi de 84%. Após administração IV de sal de colina de LA1, a $t_{1/2}$ e *clearance* foram constatadas ser de 1,21 h e 17,6 mL/min/kg, respectivamente para LA1. O volume médio de distribuição foi de 1,78 lit/kg.

Tabela 23. Dados de PK de sal de colina de LA1 para administração PO e IP

DMPK		Sal de colina de LA1
PO - 2 mg/kg	Cl de rato (ml/min/kg)	17,6
	F% de rato (AUC em mM*h)	41,0% (1,5)
	Vss (L/kg)	0,73
	$t_{1/2}$ (h)	1,57
	MRT (h)	1,81
IP - 2 mg/kg	Cl de rato (ml/min/kg)	17,6
	F% de rato (AUC in mM*h)	83,9% (3,2)
	Vss (L/kg)	0,73
	$t_{1/2}$ (h)	1,60
	MRT (h)	1,02

[0257] O PK de rato mostrou *clearance* razoável de 18 ml/min/kg como mostrado na Tabela 24. Dosagem de PO do sal de meglumina de LA1 produziu excelentes 37% de biodisponibilidade (1,2 mM*h). O sal de meglumina de LA1 mostrou uma biodisponibilidade de maior do que 100% (167%, 5,3 mM*h) para administração intraperitoneal (IP). Uma possível causa para >100% de biodisponibilidade é a circulação entero-hepática. Circulação entero-hepática refere-se à circulação de ácidos biliares, bilirrubina, fármacos, ou outras substâncias do fígado para a bile, seguido pela entrada no intestino delgado, e reabsorção

pelo enterócito e transporte de volta à corrente sanguínea.

[0258] Resultados com relação ao sal de meglumina de LA1 são mostrados na Tabela 24. Após administração oral de sal de meglumina de LA1, a $C_{\text{máx}}$ média (463 ng/mL) para LA1 foi atingida a 0,50 h (t_{max}). A $t_{1/2}$ foi constatada ser de 1,60 h. A biodisponibilidade oral absoluta foi de 37%. Após administração IP de sal de meglumina de LA1, a $C_{\text{máx}}$ média para LA1 foi de 2865 ng/mL, que atingiu a 0,25 h (t_{max}). A $t_{1/2}$ foi constatada ser de 1,95 h. A biodisponibilidade IP absoluta média foi de >100%. Após administração IV de sal de meglumina de LA1, a $t_{1/2}$ e *de-puração* foram constatadas ser de 1,41 h e 17,5 mL/min/Kg, respectivamente para LA1. O volume médio de distribuição foi de 1,85 L/Kg.

Tabela 24. Dados de PK de sal de meglumina de LA1 para administração PO e IP

DMPK		Sal de meglumina de LA1
PO - 2 mg/kg	Cl de rato (ml/min/kg)	17,5
	F% de rato (AUC in mM*h)	37,1% (1,2)
	Vss (L/kg)	0,74
	$t_{1/2}$ (h)	1,60
	MRT (h)	1,54
IP - 2 mg/kg	Cl de rato (ml/min/kg)	17,5
	F% de rato (AUC in mM*h)	167% (5,3)
	Vss (L/kg)	0,74
	$t_{1/2}$ (h)	1,95
	MRT (h)	1,54

[0259] Tanto o sal de colina de LA1 quanto o sal de meglumina de LA1 mostraram biodisponibilidade similar após administração oral. A

biodisponibilidade IP para o sal de meglumina de LA1 foi maior do que a biodisponibilidade IP para o LA1 e o sal de colina de LA1. LA1, o sal de colina de LA1, e o sal de meglumina de LA1 exibiram perfis farmacocinéticos similares após administração IV.

[0260] Os farmacocinéticos de LA1, meglumina de LA1 e colina de LA1 em ratos Sprague Dawley (SD) após administração intravenosa, intraperitoneal, e oral a 1, 2, e 2 mg/kg, respectivamente, foram avaliados.

[0261] Tabela 25 fornece uma consideração comparativa dos parâmetros farmacocinéticos de LA1 em ratos SD após uma dose oral de LA1, colina de LA1 e meglumina de LA1 a 2 mg/kg. Figura 17 mostra a concentração vs. perfil de tempo de LA1 liberado após administração oral de sal de colina de LA1 (2 mg/kg) e sal de meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratos SD.

Tabela 25. Comparação dos Dados de PK para administração oral de vários sais

Parâmetro de PK		LA1		Colina de LA1		Meglumina de LA1	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
$t_{1/2,\beta}$	(h)	Parâmetros de PK podem não ser calculados devido à baixa exposição		1,57	0,30	1,60	0,35
AUC_{0-t}	(ng·h/mL)			808	555	722	109
$AUC_{0-\infty}$	(ng·h/mL)			814	560	726	110
C_{max}	(ng/mL)			477	388	463	168
t_{max}	(h)			0,50	0,00	0,50	0,00
MRT	(h)			1,81	0,45	1,54	0,28
$T_{posterior}$	(h)			10,0	0,00	10,0	0,00
F	(%)	NA		41,0		37,1	

[0262]

Tabela 26 fornece uma consideração comparativa dos parâmetros farmacocinéticos de LA1 em ratos SD após uma dose IP de LA1, sal de colina de LA1 e sal de meglumina de LA1 a 2 mg/kg. Figura 18 mostra concentração vs. perfil de tempo de LA1 após administração intraperitoneal de LA1 (2 mg/kg) e LA1 liberada após administração intraperitoneal de colina de LA1 (2 mg/kg) e meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratos SD.

Tabela 26. Comparação de Parâmetros de PK para administração IP de vários sais

Parâmetro de PK		LA1		Colina de LA1		Meglumina de LA1	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
$t_{1/2,\beta}$	(h)	0,78	0,17	1,60	0,10	1,95	0,24
AUC _{0-t}	(ng·h/mL)	1481	255	1657	115	3252	191
AUC _{0-∞}	(ng·h/mL)	1499	268	1666	122	3270	183
C _{max}	(ng/mL)	1284	258	1590	190	2865	87,2
t _{max}	(h)	0,25	0,00	0,25	0,00	0,25	0,00
MRT	(h)	3,44	3,58	1,02	0,09	1,54	0,27
T _{posterior}	(h)	20,5	7,00	10,0	0,00	17,0	8,08
% F		81,6		83,9		>100	

[0263] A Tabela 27 fornece uma consideração comparativa dos parâmetros farmacocinéticos de LA1 em ratos SD após uma dose IV de LA1, sal de colina de LA1 e sal de meglumina de LA1 a 1 mg/kg. A figura 19 mostra a concentração vs. perfil de tempo de LA1 após administração intravenosa de LA1 (1 mg/kg) e LA1 liberada após administração intravenosa de LA colina (1 mg/kg) e meglumina de LA1 (1 mg/kg) a ratos SD.

Tabela 27. Comparação dos Parâmetros de PK para administração IV de vários sais

Parâmetro de PK		LA1		Colina de LA1		Meglumina de LA1	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD
$t_{1/2,\beta}$	(h)	1,16	0,34	1,21	0,20	1,41	0,33
C _{max}	(ng/mL)	952	143	1418	266	1445	314
C ₀	(ng/mL)	1317	270	1856	392	2142	410
AUC _{0-t}	(ng·h/mL)	903	339	985	249	967	168
AUC _{0-∞}	(ng·h/mL)	918	335	993	245	978	173
CL	(mL/min/kg)	19,7	5,90	17,6	4,30	17,5	3,08
Vd	(L/kg)	2,39	1,31	1,78	0,60	1,85	0,46
Vss	(L/kg)	4,19	1,80	0,73	0,17	0,74	0,27
MRT	(h)	3,38	1,45	0,72	0,03	0,91	0,39
T _{last}	(h)	20,0	8,00	7,00	2,00	8,00	0,00

Exemplo 16. Caracterização de propriedades farmacocinéticas para formulações de LA1 em ratos

[0264] As rotinas de administração foram, a saber, PO (gavagem) e IV (bolus através de veia da cauda). Um total de quatro ratos machos SD foram usados com idades entre 5-6 semanas. O regime de alimentação incluía 12 horas de jejum e a comida foi fornecida 2 horas após a inoculação de dosagem e água foi fornecida à vontade. O cronograma de coleta de sangue para PO foi em 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 e 24 h, e para IV, ele foi em 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 h. Para dosagem PO, tween-80 (0,02%) e 0,5% de metil celulose preparados em água Milli-Q foram usados como veículos; para dosagem IV, 10% de DMSO e 90% PEG-200 foram usados como veículos.

[0265] **Preparação de dose:** Para dosagem PO, 2,582 mg de LA1 foram umedecidos com ~30 µL de Tween-80 e triturados em um almofariz e pilão, em seguida lentamente 0,5% de metil celulose foi adicionado para preparar o volume final para 12,910 mL. Para dosagem IV, 2,196 mg de LA1 foram dissolvidos em 440 µL de DMSO, turbilhonados e finalmente 3,952 mL de PEG-200 foram adicionados.

Resultados:

[0266] A Tabela 28 mostra uma consideração comparativa de parâmetros farmacocinéticos de LA1 micronizada em ratos SD após uma dose oral de 2 mg/kg w.r.t de colina de LA1 e meglumina de LA1.

Tabela 28. Comparação dos Dados de PK para administração oral de formulações de LA1

Parâmetro de PK		*LA1		LA1 (mi-cronizada)		Sal de colina de LA1		Sal de meglumina de LA1	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
$t_{1/2,\beta}$	(h)			1,10	0,27	1,57	0,30	1,60	0,35
AUC_{0-t}	(ng·h/mL)			319	79,0	808	555	722	109
$AUC_{0-\infty}$	(ng·h/mL)			336	93,4	814	560	726	110
C_{max}	(ng/mL)			123	3,40	477	388	463	168
t_{max}	(h)			0,88	0,75	0,50	0,00	0,50	0,00
MRT obs	(h)			2,04	3,00	1,81	0,45	1,54	0,28
T_{last}	(h)			6,50	3,00	10,0	0,00	10,0	0,00

F	(%)	NA	23,0	41,0	37,1
*- Parâmetros de PK poderiam não ser calculados devido à baixa exposição.					

[0267] A Tabela 29 mostra uma consideração comparativa de parâmetros farmacocinéticos de LA1 micronizada em ratos SD após uma dose IV de 1 mg/kg w.r.t de colina de LA1 e meglumina de LA1.

Tabela 29. Comparação dos Dados de PK para administração IV de formulações de LA1

Parâmetro de PK		LA1		LA1 (micronizada)		Sal de colina de LA1		Sal de meglumina de LA1	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
$t_{1/2\beta}$	(h)	1,16	0,34	1,36	0,57	1,21	0,20	1,41	0,33
C_{max}	(ng/mL)	952	143	822	160	1418	266	1445	314
C_0	(ng/mL)	1317	270	1025	217	1856	392	2142	410
AUC_{0-t}	(ng·h/mL)	903	339	715	126	985	249	967	168
$AUC_{0-\infty}$	(ng·h/mL)	918	335	729	131	993	245	978	173
CL	(mL/min/kg)	19,7	5,90	23,4	3,96	17,6	4,30	17,5	3,08
Vd	(L/kg)	2,39	1,31	2,63	1,07	1,78	0,60	1,85	0,46
Vss	(L/kg)	4,19	1,80	2,14	0,45	0,73	0,17	0,74	0,27
MRT obs	(h)	3,38	1,45	1,47	0,17	0,72	0,03	0,91	0,39
T_{last}	(h)	20,0	8,00	12,0	8,00	7,00	2,00	8,00	0,00

[0268] A biodisponibilidade oral e intraperitoneal absoluta de LA1 foi avaliada em ratos SD após uma administração oral simples e IV (1 mg/kg) de LA1 micronizada. Após administração oral de LA1 micronizada, concentrações plasmáticas máximas para LA1 (C_{max} : 123 ng/mL) foram atingidas a 0,88 h ($t_{máx}$). A $t_{1/2}$ foi constatada ser de 1,10 h e a biodisponibilidade oral absoluta foi de 23%. Após administração IV de LA1 micronizada, a $t_{1/2}$, e *clearance* foram constatadas ser de 1,36 h e 23,4 mL/min/kg, respectivamente. Além disso, o volume médio de distribuição foi de 2,63 lit/kg.

[0269] Conclui-se que a LA1 micronizada mostra exposição sistêmica melhor quando comparada à LA1 após administração oral. Entretanto, LA1 e LA1 micronizada mostraram perfil farmacocinético similar após administração IV.

Exemplo 17. Caracterização de propriedades farmacocinéticas para ácido livre de LA1 em cachorros.

[0270] O PK de cachorro mostra grande *clearance* de 2,1 ml/min/kg como mostrado na Tabela 30. A dosagem oral produziu uma excelente biodisponibilidade de 50%. (6,1 mM*h). A solução de dose PO (2 mg/kg) de LA1 micronizada foi preparada em 0,1% de Tween-80 0,5% (p/v) e metil celulose em água. As soluções de dose IV (0,5 mg/kg) foram preparadas em a 5% de DMSO, 90% PEG-200 e 5% etanol.

Tabela 30. Dados de PK para administração oral de ácido livre de LA1 em cachorros

DMPK		Ácido livre de LA1
PO - 2 mg/kg	Cl de cachorro (ml/min/kg)	2,1
	F% de cachorro (AUC em mM*h)	50 (6,1)
	Vd _{ss} (mL)	0,72
	t _{1/2} (h)	2,11
	MRT (h)	Não calculado

[0271] O objetivo do estudo foi investigar o perfil farmacocinético pré-clínico de LA1 (pó micronizado) em cachorro Beagle. Para delinear a curva de tempo vs. concentração plasmática e caracterizar os parâmetros farmacocinéticos relevantes para gerar dados sobre as propriedades de PK viz., biodisponibilidade, meia vida (t_{1/2}), volume de distribuição, C_{máx}, T_{máx}, AUC e constante de taxa de eliminação de LA1 em cachorro Beagle.

[0272] LA1 foi um material grosso que foi micronizado usando moimho em bola de escala laboratorial. Nos processos, o tamanho de partícula de LA1 foi reduzido para ~20 mícrons. A LA1 micronizada foi recuperada, pesada e armazenada em recipiente de vidro em temperatura ambiente. Para administração de fármaco intravenosa, ensaio de compatibilidade de excipiente de LA1 para dosagem em cachorros foi realizado. A partir dos resultados de teste, uma solução clara foi obtida usando a mistura de formulação; 5% de DMSO + 90% de Polietileno

glicol 400 (PEG-400) + 5% de etanol.

[0273] A micronização de LA1 de Item teste: O tamanho de partícula de LA1 foi reduzido ~20 microns usando moinho de bola de escala laboratorial. Em resumo, uma quantidade conhecida de LA1 foi carregada para um recipiente tampado cilíndrico deito de aço inoxidável após adição de bolas de aço inoxidável. Os moinhos de bola foram girados em seu eixo durante um total de 60 minutos (6 ciclos X 10 minutos). A LA1 micronizada foi recuperada, pesada e armazenada em garrafa de vidro em temperatura ambiente.

[0274] Sistema de teste: Cachorro Beagle saudável pesando 10-12 kg (idade 10 meses) machos foram usados para o estudo. O projetor reticulador foi adotado para os experimentos em que 02 cachorros foram usados no estudo para administração oral e intravenosa. Ambos os animais foram alojados em gaiola de aço inoxidável fornecida com uma tremonha para manter a alimentação em pélete e uma tremonha de água separada. A temperatura e umidade foram mantidas a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e 40 - 70%, respectivamente. A iluminação foi controlada para fornecer uma sequência de ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Todos os animais foram adaptados para as condições experimentais durante pelo menos 5 dias antes da dosagem. Todos os animais foram providos com ração em pélete padrão Pedigree™, exceto durante 10 a 12 h antes do tratamento e 4 h após a administração de fármaco. Água foi fornecida à vontade.

[0275] Formulação e administração de fármaco: Exatamente 90 mg do LA1 de item teste (pó micronizado) foram pesados e transferidos para um almofariz e brevemente triturados com pistão. Volume pequeno de veículo [0,5% (p/v) de Carbóxi metil celulose com 0,1% de Tween-80] em água foi em seguida adicionado lentamente com trituração contínua até uma suspensão uniforme ser obtida. O teor foi em seguida transferido em um cilindro de medição. O almofariz foi enxaguado até a

transferência completa do item teste no cilindro de medição ser assegurada. O volume final foi em seguida preparado para 225 mL com veículo para fornecer uma suspensão uniforme com concentração desejada de 0,4 mg/mL. Formulações de dosagem foram fornecidas por gavagem oral em um volume de dose não excedendo 5 mL/kg.

[0276] Formulação de fármaco intravenoso: Ensaio de hemólise usando sangue completo de cachorro foi empregado para avaliar o dano de células sanguíneas para a seleção de excipiente para dosagem intravenosa. Com base nos resultados obtidos, o procedimento descrito foi adaptado. Exatamente 22,5 mg do item teste (pó micronizado) foram pesados em um tubo graduado. 2,25 mL de DMSO foram adicionados gota a gota e misturados por turbilhonamento. Em seguida, 40,50 mL de Polietileno glicol 400 (PEG-400) foram adicionados em dois a três fragmentos e turbilhonamento intermitente. Em seguida 2,25 mL de etanol foram adicionados e turbilhonados para obter uma solução clara. A formulação foi submetida a ultrassonicação durante 5 minutos. A administração e foi infundida na taxa de 0,33 mL/kg/min, o volume de dose não excedendo 1 mL/kg.

[0277] **Coleta de amostra:** Método serial foi usado para amostragem de sangue. As amostras de sangue foram coletadas como mencionado na seção de projeto de estudo (7). A amostra de sangue (~1,5 mL) foi coletada de veia safena em tubos rotulados, contendo solução a 2% p/v de K₂EDTA, como uma anticoagulante. Sangue completo foi armazenado em -20°C até ser tomado para bioanálise.

[0278] Procedimento de extração: O plasma separado do sangue completo foi usado para bioanálise. O LA1 analisado foi extraído do plasma por método de precipitação de acetonitrila. O sobrenadante de ambas as camadas foi misturado e turbilhonado durante 10 minutos. Todas as amostras (Incluindo CCs, QCs) foram injetadas em sistema de LC-MS/MS.

[0279] Análise de dados: A partir das concentrações plasmáticas, a análise de farmacocinéticos foi realizada usando o solucionador PK.

Resultados:

[0280] Os dados farmacocinéticos sugeriram que a absorção de LA1 foi moderada com a concentração de pico que ocorre 4 horas após dose. A fase de absorção mostrou um desenvolvimento constante de níveis de LA1 para alcançar sua concentração de pico. A concentração de pico foi constatada ser de 685,47 ng/mL. A fase de eliminação de LA1 mostrou um declínio constante imediatamente após a concentração de pico ser obtida. A meia-vida oral de LA1, é aproximadamente 2 horas e a AUC_{0-12} é 2572.24 h*ng/mL. O volume de distribuição de LA1 foi de 0,72 ml com clearance sendo de 0,39 ml/h. A biodisponibilidade oral absoluta de LA1 (pó micronizado) foi constatada ser de 50,62% (0,5 mg i.v. vs 2 mg oral).

[0281] As concentrações de item teste no plasma foram detectadas em amnos os animais tratados. O perfil farmacocinético de LA1 mostrou uma meia vida de 2 h, T_{max} = 4 h, C_{max} = 685.47 ng/mL e AUC_{0-12} = 2572.24 h*ng/mL. Tabela 31 fornece as concentrações plasmáticas de LA1 (pó micronizado) em ng/mL em dose i.v.

Tabela 31. Concentrações plasmáticas de LA1 micronizada para administração IV em diferentes intervalos de tempo

IV - 0,5 mg/kg Bwt (n=03)					
Tempo (h)	Concentração (ng/ml)			média	± SD
Animal No,	1	2	3		
Pre-dose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,05	1567,58	1336,59	1083,05	1329,07	242,35
0,1	897,32	830,40	949,27	892,33	59,59
0,25	716,65	632,69	709,29	686,21	46,50
0,5	504,90	416,91	501,66	474,49	49,89
1	405,11	313,73	349,30	356,05	46,06

IV - 0,5 mg/kg Bwt (n=03)					
Tempo (h)	Concentração (ng/ml)			média	± SD
Animal No,	1	2	3		
2	322,73	132,37	192,17	215,76	97,35
3	246,29	60,85	96,99	134,71	98,31
4	68,79	55,50	26,76	50,35	21,48
6	71,62	16,42	9,53	32,52	34,03
8	24,37	12,59	4,17	13,71	10,14
12	7,93	4,80	4,78	5,84	1,81

[0282] Tabela 32 fornece as concentrações plasmáticas de LA1 (pó micronizado) em ng/mL em dose oral.

Tabela 32. Concentrações plasmáticas de LA1 micronizada para administração oral em diferentes intervalos de tempo

Oral - 0,5 mg/kg Bwt (n=03)					
Time (h)	Concentração (ng/ml)			Média	± SD
Animal No,	1	2	3		
Pre-dose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	102,75	35,26	44,77	60,93	36,53
1	410,51	70,30	84,94	188,59	192,33
1,5	438,29	202,64	90,83	243,92	177,37
2	471,76	197,65	154,03	274,48	172,24
3	503,29	236,15	309,30	349,58	138,05
4	659,92	769,83	626,66	685,47	74,93
6	210,79	203,53	210,23	208,19	4,04
8	118,18	65,17	65,10	82,82	30,63
12	37,49	43,15	34,94	38,52	4,21

[0283] Tabela 33 fornece parâmetros farmacocinéticos de LA1 resumidos (pó micronizado) em cachorro Beagle.

Tabela 33. Comparação de parâmetros de IV e oral PK em cachorro

Beagles

Rotina de administração	Meia vida (h)	Co/ C _{max} (ng/mL)	Vd _{ss} (mL)	Cl (mL/h)	T _{max} (h)	AUC _{0-12h} (h*ng/mL)	AUC _{0-inf} (h*ng/mL)
Intravenous (0.5 mg/kg)	2.15	2041.83	0.72	0.39	---	1332.79	1350.43
Oral (3mg/kg)	2.11	685.47	---	---	4.0	2572.24	2689.56
Biodisponibilidade oral absoluta de LA1 (pó micronizado) é 50.62% (0.5 mg i.v vs 2 mg oral).							

[0284] Tabela 34 fornece individual animal parâmetros farmacocinéticos de LA1 (pó micronizado) em 0,5 mg/kg B.wt, intravenous dose em cachorro Beagle. Figura 20 é um gráfico de perfil de PK para LA1 em cachorro Beagles em uma dosagem IV de 1 mg/kg.

Tabela 34. Comparação de Parâmetros de PK entre vários cachorros beagle para administração IV

Animal N°.	K _{el} (1/h)	Meia vida (h)	C ₀ (ng/ml)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{0-12h} (h*ng/mL)	Vd _{ss} (mL)	Cl (mL/h)	Biodisponibilidade absoluta F%
1	0,38	1,82	1567,58	1798,33	1777,48	0,65	0,28	45,93
2	0,21	3,30	1336,59	1101,33	1078,51	0,88	0,45	56,88
3	0,52	1,34	1083,05	1151,64	1142,39	0,64	0,43	49,03
Mean	0,37	2,15	1329,07	1350,43	1332,79	0,72	0,39	50,62
SD	0,15	1,02	242,35	388,70	386,43	0,14	0,10	5,64

[0285] Tabela 35 fornece parâmetros farmacocinéticos de LA1 de animal individuais (pó micronizado) 2 mg/kg, B.p de tratamento oral em cachorro Beagle. A figura 21 mostra um gráfico de perfil de PK para LA1 em cachorro *Beagles* em uma dosagem oral de 2 mg/kg.

Tabela 35. Comparação de Parâmetros de PK entre vários cachorros beagle para administração oral

Animal No	K _{el} (1/h)	Meia vida (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₁₂ (h*ng/mL)
1	0,29	2,41	659,92	3304,18	4,00	3173,88

Animal No	Kel (1/h)	Meia vida (h)	Cmax (ng/ml)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₁₂ (h*ng/mL)
2	0,35	1,99	769,83	2505,84	4,00	2382,10
3	0,36	1,94	626,66	2258,65	4,00	2160,72
Mean	0,33	2,11	685,47	2689,56	4,00	2572,24
SD	0,04	0,26	74,93	546,44	0,00	532,67

Exemplo 18. Caracterização de propriedades farmacocinéticas para sal de colina de LA1 em cachorros.

[0286] Sistema de teste: Cachorro Beagle saudável pesando 10-12 kg (idade 10 meses) machos foram usados para o estudo. O projeto reticulador foi adotado para os experimentos em que 03 cachorros foram usados no estudo para administração oral e intravenosa. Os animais foram alojados em gaiola de aço inoxidável fornecida com uma tremonha para manter a alimentação em pélete e uma tremonha de água separada. A temperatura e umidade foram mantidas a $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e 30 - 70%, respectivamente. A iluminação foi controlada para fornecer uma sequência de ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Todos os animais foram adaptados para as condições experimentais durante pelo menos 5 dias antes da dosagem. Todos os animais foram providos com ração em pélete padrão Pedigree™, exceto durante 10 a 12 horas antes do tratamento e 4 h após a administração de fármaco. Água foi fornecida à vontade.

[0287] Formulação e administração de fármaco: 251,02 mg de item teste foram transferidos para um almofariz claro. O item teste foi moído uniformemente usando o pistão. 1,235 ml de Tween 80 foram adicionados e o material foi misturado. Uma pequena quantidade de 0,5% (w/v) metilcelulose em água foi adicionada e a mistura foi tritura-da. 0,5% de metil celulose foi adicionado para preparar um volume final de 190 ml. Finalmente, a formulação acima foi transferida para um béquer pré-rotulado e sonicada durante cinco minutos. A suspensão

foi dosada sob condições de agitação colocando-se em um agitador magnético.

[0288] A formulação de dose de LA-1.colina foi administrada por gavagem oral usando um tubo de gavagem de alimentação. O volume requerido de formulação de dose (5 ml/kg de peso corporal) foi composto em uma seringa graduada. O cachorro foi apropriadamente contido com a ajuda de outra pessoa a fim de restringir o movimento. Um tubo de alimentação foi inserido lentamente na boca através do espaço entre a bochecha e os dentes em direção ao esôfago para o estômago. A colocação adequada do tubo foi confirmada por imersão da extremidade externa do tubo em um recipiente com água e observando bolhas de ar. A ausência de bolhas de ar confirmou a localização do tubo no estômago. O volume de dose requerido de suspensão de LA-1.colina foi lentamente administrado através de um tubo de alimentação. Ar foi empurrado através da extremidade para garantir o esvaziamento. O tubo foi lentamente retirado e descartado.

[0289] Formulação de fármaco intravenosa: 27,49 mg precisamente pesados de item teste foram transferidos no tubo claro. Um volume de 0,417 mL de DMSO foi adicionado e misturado até o teste dissolver-se completamente. Um volume de 0,417 mL de Solutol:álcool (1:1, v/v) foi adicionado, a este, 7,496 mL de salina normal foram adicionados e turbilhonados. Finalmente, a formulação acima foi usada para dosagem.

[0290] O volume requerido de formulação de dose (0,2 ml/kg de peso corporal) de LA-1.colina foi composto em uma seringa graduada. As bolhas de ar foram removidas antes da dosagem. O cachorro foi contido na posição de repouso. A porção superior de sítio de injeção da veia cefálica foi comprimida e a agulha do cateter de veia borboleta de tamanho 22G foi lentamente inserida na veia. Visto que o sangue alcançou a extremidade do tubo do cateter, ele foi conectado à serin-

ga. A formulação de dose foi imediatamente injetada lentamente. No término da administração, aproximadamente 0,5 mL de salina normal foi injetado por meio de cateter para garantir o volume de dose requerida. Posteriormente, a agulha foi removida.

[0291] Coleta de amostra: Pós-dosagem ~1,5 ml de amostra de sangue de cada cachorro para os seguintes pontos de tempo 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 8, 10 e 24 h foram coletados da veia jugular em tubos de centrifuga de *vacutainer* pré-rotulado contendo K₂EDTA. O plasma foi obtido centrifugando as amostras sanguíneas a 2500 g durante 10 minutos, sob refrigeração (2-4°C) dentro de um período de 0,5 h de amostragem. As amostras de plasma obtidas foram transferidas nos tubos de microcentrífugas pré-rotulados (aproximadamente ~300 µl) e armazenadas a ou abaixo de -70 ± 10°C. Os rótulos de amostra incluem detalhes tais como número de estudo, código de item teste e grupo de dose e/ou dia de amostragem, número de animal, ponto de tempo.

[0292] **Procedimento de extração:** O plasma separado do sangue completo foi usado para bioanálise. O LA1 analisado foi extraído do plasma por método de precipitação de acetonitrila. O sobrenadante de ambas as camadas foi misturado e turbilhonado durante 10 minutos. Todas as amostras (Incluindo CCs, QCs) foram injetadas no sistema de LC-MS/MS.

[0293] Análise de dados: A partir das concentrações de plasma acima, a análise de farmacocinéticos foi realizada usando um solucionador PK.

[0294] Os dados de PK de cachorro para o sal de colina são resumidos na Tabela 36. Os dados farmacocinéticos mostraram que a concentração de pico de sal de colina de LA1 ocorreu em 1,5 horas pós dose. A fase de absorção mostrou um desenvolvimento constante de níveis de LA1 para alcançar sua concentração de pico. A concentração de pico foi constatada ser de 2068 ng/mL. A fase de eliminação de LA1 mostrou um declínio constante imediatamente após a concentração de pico ser obti-

da. A meia vida oral de LA1, é de aproximadamente 3,4 horas e a AUC_{0-12} é 9184 h*ng/mL. O volume de distribuição de LA1 foi de 0,83 L/Kg com *clearance* sendo de 3,92 ml/min/Kg. A biodisponibilidade oral absoluta de LA1.Sal de colina foi constatada ser de 43.4% (0,5 mg i.v. vs 5 mg oral).

Tabela 36. Dados de PK para administração de sal de colina de LA1 em cachorros Beagle machos

DMPK		Sal de colina de LA1
PO - 5 mg/kg	Cl de cachorro (ml/min/kg)	3,9
	F% de cachorro (AUC em mM*h)	43,4 (22)
	Vd _{ss} (L/kg)	0,83
	t _{1/2} (h)	3,41

[0295] Tabela 37 mostra as concentrações plasmáticas de LA1.Sal de colina em ng/mL resultante de administração i.v.

Tabela 37. Concentrações plasmáticas de LA1.Sal de colina para administração IV em diferentes intervalos de tempo

Animal no.	Ponto de tempo (h) / Concentração (ng/mL)									
	0,25	0,5	1	1,5	2	3	5	8	10	24
30595	987	874	721	571	483	711	182	61,9	51,1	15,8*
4635	843	548	405	300	206	289	77,2	26,1	12,0	BLQ
30507	723	501	397	276	203	265	67,7	44,4	19,8	BLQ
Concentração média (ng/mL)	851	641	508	382	297	421	109	44,1	27,6	NA
SD	132	203	185	164	161	251	64	17,9	20,7	NA
% CV	15,5	31,7	36,4	42,9	54,1	59,5	58,4	40,6	74,9	NA

[0296] Tabela 38 mostra as concentrações plasmáticas de LA1.Sal de colina em ng/mL resultantes de administração oral.

Tabela 38. Concentrações plasmáticas de LA1.Sal de colina para administração oral em diferentes intervalos de tempo

Animal no.	Ponto de tempo (h) / Concentração (ng/mL)									
	0,25	0,5	1	1,5	2	3	5	8	10	24
30595	1003	1869	1662	1199	1485	1812	442	240	164	25,9
4635	1628	2776	2706	2609	2055	2510	429	104	62,2	BLQ

Animal no.	Ponto de tempo (h) / Concentração (ng/mL)									
	0,25	0,5	1	1,5	2	3	5	8	10	24
30507	659	999	1312	1055	1015	1558	370	107	158	7,88
Concentração média (ng/mL)	1097	1882	1894	1621	1518	1960	414	150	128	16,9
SD	491	889	725	859	521	493	38,3	77,9	57,1	NA
% CV	44,8	47,2	38,3	53,0	34,3	25,2	9,26	51,8	44,6	NA

[0297] Tabela 33 fornece parâmetros farmacocinéticos resumidos de LA1.Sal de colina em cachorro Beagle.

Tabela 39. Comparação de parâmetros de PK IV e oral em cachorro Beagles

Rotina de administração	Meia vida (h)	Co/ C _{max} (ng/mL)	Vd _{ss} (mL)	Cl (mL/h)	T _{max} (h)	AUC _{0-12h} (h*ng/mL)	AUC _{0-inf} (h*ng/mL)
Intravenosa (0,5 mg/kg)	2,15	2041,83	0,72	0,39	---	1332,79	1350,43
Oral (3mg/kg)	2,11	685,47	---	---	4,0	2572,24	2689,56
Biodisponibilidade oral absoluta de LA1.Sal de colina é 50,62% (0.5 mg i.v vs 2 mg oral).							

[0298] Fig. 22 mostra um gráfico de perfil de PK para LA1 em cachorro Beagles em uma dosagem IV de 0,5 mg/kg e dosagem oral (PO) de 5 mg/kg.

Exemplo 19. Avaliação de eficácia *in vivo* de LA1 para o tratamento de aloenxerto B16F10 de melanoma de murino em camundongos C57BL/6

[0299] Uma linhagem de tumor de melanoma de camundongo, B16-F10, foi usado para desenvolver um modelo de tumor subcutâneo. $0,1 \times 10^6$ células foram injetadas subcutaneamente na região do flank direito do animal. Quando os tumores alcançaram $\sim 45 \text{ mm}^3$, os animais foram randomizados em vários grupos, cada grupo com 10 animais, de modo que o volume de tumor médio de todos os grupos fosse similar. Os animais foram tratados a partir do dia de randomização (Dia 1). As dimensões do tumor (comprimento e diâmetro) foram medidos com relação a todos os animais três vezes por semana, incluindo o dia de término do estudo. Além disso, por todo o período de es-

tudo, os camundongos foram monitorados diariamente com relação às condições clínicas. No dia 15, amostras de tumor e sangue foram coletadas de todos os camundongos em $T_{\text{máx}}$ (0,5hr) para medir a exposição. Porções das amostras de sangue foram usadas para análise sanguínea e química clínica. Pulmão, coração, fígado, baço, e rins foram também coletados e análise histopatológica foi realizada.

[0300] CÉLULAS DE TUMOR. Células B16-F10 foram cultivadas em meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilin-estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C na ausência de CO₂. Quando as células alcançaram 75-80% de confluência, elas foram colhidas por tripsinização, lavadas, e contadas. As células foram em seguida ressuspensas em meio livre de soro em uma concentração de 0,1 milhão de células/75 µl.

[0301] INOCULAÇÃO DE CÉLULA DE TUMOR. As células foram inoculadas subcutaneamente no flanco de ratos pretos. Antes da inoculação, o pelo foi cortado e a pele no sítio de injeção (flanco direito dorsal) foi esfregada com álcool. Células em meio livre de soro (0,1 milhão de célula/75 µl) foram misturadas com Matrigel em uma relação de 3:1 e um volume total de 100 µl foi injetado em cada animal com uma seringa ligada a uma agulha 26 G.

[0302] RANDOMIZAÇÃO. Os tumores eram palpáveis em torno do dia 7 de inoculação. Uma vez que o volume de tumor alcançou em torno de 45 mm³, os animais foram randomizados em vários grupos com 10 animais em todos os grupos, de modo que o volume de tumor médio de cada grupo fosse similar.

Veículo	5% de DMSO+5% de Solutol:Etanol (1:1) + 20% de Tween20 + 70 % de N-Salina
Artigo teste 1	Ácido livre de LA1
Artigo teste 2	Sal de meglumina de LA1
Artigo teste 3	Anticorpo anti-PD1 (RMP1-14; BioXCell)
Artigo teste 4	Anticorpo anti-CTLA4 (BioXCell)

[0303] FORMULAÇÃO. LA1 foi combinado com uma solução contendo 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1), 20% de Tween20, e 70% de N-salina. O sal de meglumina de LA1 foi combinado com uma solução contendo 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1), e 90% de N-salina.

[0304] CÁLCULOS ESTATÍSTICOS. Todos os cálculos estatísticos foram realizados usando Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, USA). As comparações de medidas de tamanho de tumor durante e no término do estudo foram feitas entre os grupos de tratamento e os grupos de controle de veículo respectivos usando ANOVA Unidirecional seguido por testes de múltiplas comparações de Dunnett. Um valor p menor do que 0,05 foi considerado significativo.

[0305] EXPOSIÇÃO DE LA1. No término do estudo, LA1 mostrou uma exposição de 383 ± 450 ng/ml e $24,7 \pm 17,6$ ng/ml em sangue e tumor, respectivamente. Similarmente, o sal de meglumina de LA1 a 3 e 30 mg/kg mostrou uma exposição de 1519 ± 613 ng/ml e 3744 ± 1755 ng/ml em plasma e 1017 ± 510 ng/ml e 1659 ± 611 ng/ml em tumor, respectivamente.

[0306] HISTOPATOLOGIA. Exame histopatológico foi conduzido usando amostras de fígado, fígado, pulmão, baço, coração, e estômago. Exame microscópico de tecidos de fígado revelou necrose hepatocelular mínima a moderada em um animal em cada um dos grupos de controle, o grupo de sal de LA1, o grupo de α -PD1, o grupo de α -CTLA4, e o grupo de sal de α -CTLA4/LA1. Metástase de tumor foi observada em tecido pulmonar em cada um dos grupos de controle, o grupo de sal de LA1 group, e o grupo de α -PD1.

[0307] Quando dosado a 3 ou 30 mg/kg diariamente durante 15 dias, o tratamento com sal de meglumina de LA1 resultou em cerca de 58-66% de inibição de crescimento de tumores B16-F10 de melanoma de murino em comparação com controle de veículo. O tratamento com um primeiro inibidor de ponto de checagem imunológica (anticorpo de α -

CTLA4, 100 µg/camundongo a cada terceiro dia) sozinho resultou em cerca de 42% de inibição de crescimento. O tratamento de combinação usando anticorpo de α-CTLA4 e LA1 resultou em outra inibição de crescimento de tumor, em comparação com α-CTLA4 sozinho. Entretanto, o tratamento de combinação usando um segundo inibidor de ponto de checagem imunológica (anticorpo de α-PD1) e LA1 ou sal de meglumina de LA1 resultou em inibição mais forte de crescimento de tumor do que qualquer outro agente usado sozinho. *Veja*, Fig. 23. O tratamento com anticorpo de α-PD1 mostrou aproximadamente 64% de inibição de tumor, porém a combinação resultou em aproximadamente 81% de inibição de tumor nestes ensaios.

Exemplo 20. Avaliação de eficácia de LA1 para o tratamento de aloenxerto de B16F10 de melanoma de murino em camundongos C57BL/6

[0308] Os camundongos foram inoculados com tumores B16F10 como descrito acima. Uma vez que o tumor de volume alcançou em torno de 45 mm³, os animais foram randomizados em vários grupos com 10 animais em todos os grupos, de modo que o volume de tumor médio de cada grupo fosse similar.

Veículo	5% de DMSO+5% de Solutol:Etanol (1:1) + 20% de Tween20 + 70 % de N-Salina
Artigo teste 1	LA1
Artigo teste 2	Sal de colina de LA1
Artigo teste 3	Anticorpo anti-PD1 (RMP1-14; BioXCell)
Artigo teste 4	Anticorpo anti-CTLA4 (BioXCell)

[0309] **FORMULAÇÃO.** LA1 foi combinado com uma solução contendo 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1), 20% de Tween20, e 70% de N-salina. O sal de colina de LA1 (recristalizado de *n*-butanol; Forma R) foi combinado com uma solução contendo 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1), e 90% de N-salina.

[0310] **ADMINISTRAÇÃO.** sal de colina de LA1, anticorpo anti-PD1, e anticorpo anti-CTLA4 foram administrados como mostrado abaixo.

Grupo	Treatment	Rotina	Cronograma de dosagem	Dose (mg/kg)	n/grupo
1	Controle de veículo			-	10
2	Sal de colina de LA1	p,o,	b,i,d	3	10
3	Sal de colina de LA1			10	10
4	Sal de colina de LA1			30	10
5	Sal de colina de LA1			100	10
6	Anticorpo anti-PD-1	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	10
7	Anticorpo anti-CTLA4	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	10
8	Sal de colina de LA1	p,o,	b,i,d	3 mg/kg	10
	Anticorpo anti-PD-1	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	
9	Sal de colina de LA1	p,o,	b,i,d	10 mg/kg	10
	Anticorpo anti-PD-1	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	
10	Sal de colina de LA1	p,o,	b,i,d	3 mg/kg BID	10
	Anticorpo anti-CTLA4	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	
11	Sal de colina de LA1	p,o,	b,i,d	10 mg/kg BID	10
	Anticorpo anti-CTLA4	i,p,	a cada 4º dia	0,1 mg/camundongo	

[0311] EXPOSIÇÃO DE LA1. No término do estudo, a administração oral de ácido livre de LA1 resultou em uma exposição abaixo do limite de quantificação no sangue e tumor. O sal de colina de LA1 dosado a 3, 10, 30, e 100 mg/kg oralmente resultou em uma exposição de $314 \pm 77,7$ ng/ml, 996 ± 401 ng/ml, 3518 ± 1483 ng/ml e $21,827 \pm 5628$ ng/ml em plasma. Administração do sal de colina oralmente nas doses de 3, 10, 30, e 100 mg/kg doses resultou em concentrações de tumor de $118 \pm 83,1$ ng/ml, 254 ± 146 ng/ml, 855 ± 312 ng/ml e 2093 ± 1997 ng/ml em tecido de tumor, respectivamente.

[0312] O sal de colina de LA1 diminuiu o volume de tumor de uma maneira dependente de dose. *Veja*, figura 24. O tratamento com sal de colina de LA1, quando dosado a 3-100 mg/kg, resultou em cerca de 43-68% de inibição de crescimento de tumores B16-F10 de melanoma de murino em comparação com controle de veículo. O tratamento com um primeiro inibidor de ponto de checagem imunológica (anticorpo de α -CTLA4) sozinho resultou em cerca de 53% de inibição de crescimento. O tratamento de combinação usando anticorpo de α -CTLA4 e sal de colina de LA1 (3 mg/kg e 10 mg/kg) resultou em outra inibição de crescimento de tumor, 60% e 67%, respectivamente, em comparação

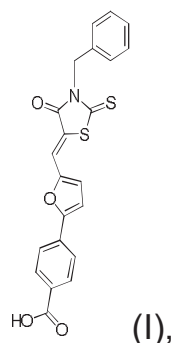
com α -CTLA4 sozinho. *Veja*, figura 25'.

[0313] O tratamento usando um segundo inibidor de ponto de checagem imunológica (anticorpo de α -PD1) resultou em aproximadamente 56% de inibição de tumor. O tratamento de combinação de anticorpo de α -PD1 e sal de colina de LA1 (3 mg/kg e 10 mg/kg) resultou em outra inibição de crescimento de tumor, 66% e 68%, respectivamente, em comparação com anticorpo de α -PD1 sozinho. *Veja*, figura 26.

[0314] Entende-se que os exemplos e modalidades descritas aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou mudanças, à luz das mesmas, serão sugeridas para as pessoas versadas na técnica e devem estar inclusas no espírito e competência deste pedido e escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes, e pedidos de patentes, *websites*, e bases de dados citados aqui são pelo presente incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

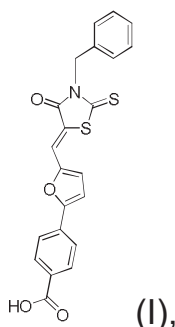
REIVINDICAÇÕES

1. Forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I:



caracterizada pelo fato de que apresenta a forma cristalina H, e apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) compreendendo pelo menos três picos selecionados do grupo consistindo em 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e 27,2 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-Kα, e apresenta os seguintes dados de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a Forma H: ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, J_{AB} = 3,9 Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, J = 4,4, 3,9 Hz), 3,68 (dd, 1H, J = 4,9, 1,5 Hz), 3,60 (dd, 1H, J = 10,9, Hz), 3,50 (m, 1H) 3,44 (dd, 1H, J = 8,1, 1,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, J = 10,8, 5,8 Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, J = 12,5, 3,8 Hz), 2,84(dd, 1H, J = 11,3, 7,8 Hz), 2,47 (s, 3H).

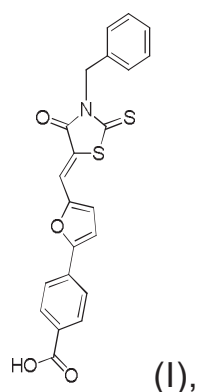
2. Forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I:



de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que

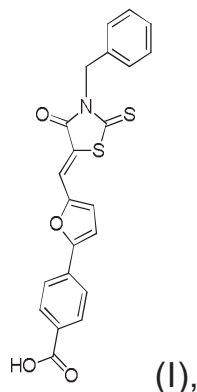
apresenta a forma cristalina L, e apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados dentre 5,3, 7,9, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 10,9, 11,6, 12,0, 12,6, 13,1, 14,5, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,2, 16,9, 17,4, 17,8, 18,0, 18,4, 18,8, 19,2, 20,2, 20,8, 21,3, 21,7, 22,1, 23,2, 23,8, 24,5, 25,2, 25,5, 26,3, 26,9, 27,3, 27,9, 28,4, 28,9, 29,2, 29,8, 30,3, 30,6, 31,1, 32,1, 32,8, 34,1, 34,5, 34,9, 35,1, 36,0, 36,5, 37,5, 38,0, 38,9, 39,6, 40,7, 41,7, 42,5, e 42,9 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-Kα, e apresenta os seguintes dados de termograma de calor de varredura diferencial (DSC) para a Forma L: ponto de fusão: 163,3°C e 98,99% de pureza estabelecida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. Forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I:



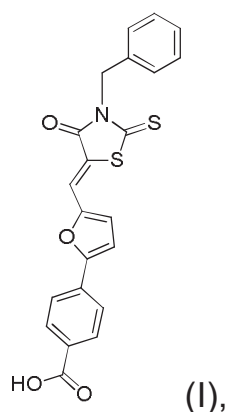
de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que apresenta a forma cristalina M, e apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados dentre 6,5, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 11,6, 11,6, 14,4, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,1, 16,9, 17,8, 18,0, 19,0, 20,4, 20,8, 21,3, 21,7, 23,6, 24,5, 25,2, 26,3, 26,9, 27,5, 27,9, 28,5, 28,9, 29,8, 30,6, 32,1, 32,8, 33,8, 34,5, 36,0, 36,4, 37,1, 38,0, 39,9, 40,7, 41,7, 43,0, e 44,0 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-Kα.

4. Forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I:



de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que apresenta a forma cristalina N, e apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) incluindo pelo menos três picos selecionados dentre 4,3, 5,0, 5,4, 6,1, 7,5, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 10,8, 11,4, 12,1, 12,5, 13,8, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 16,7, 17,4, 18,1, 19,2, 19,5, 20,1, 20,9, 21,4, 21,5, 22,1, 22,5, 23,9, 24,6, 25,3, 26,3, 26,7, 27,1, 27,6, 28,2, 29,0, 30,4, 30,9, 32,0, 32,9, 33,9, 34,7, 36,9, 38,3, 39,1, 39,6, 40,2, e 41,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-Kα.

5. Forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I:



de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que apresenta a forma cristalina T, e apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) compreendendo pelo menos três picos selecionados do grupo

consistindo em 6,9, 8,2, 8,4, 9,4, 11,6, 15,0, 15,1, 17,2, 17,8, 18,1, 20,5, 21,3, 21,9, 22,3, 23,5, 25,0, e $26,7 \pm 0,2^\circ 2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α , e apresenta os seguintes dados de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a Forma T: ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,87 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, $J_{AB} = 3,9$ Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, $J = 4,4, 3,9$ Hz), 3,68 (dd, 1H, $J = 4,9, 1,5$ Hz), 3,60 (dd, 1H, $J = 10,9$ Hz), 3,50 (m, 1H), 3,44 (dd, 1H, $J = 8,1, 1,7$ Hz), 3,41 (dd, 1H, $J = 10,8, 5,8$ Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, $J = 12,5, 3,8$ Hz), 2,84 (dd, 1H, $J = 11,3, 7,8$ Hz), 2,47 (s, 3H).

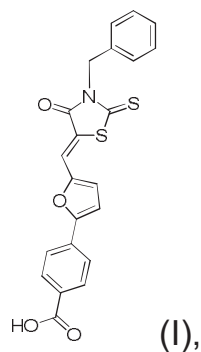
6. Forma cristalina de acordo com a reivindicação 1, que apresenta a forma cristalina H, caracterizada pelo fato de que apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) compreendendo pelo menos seis picos selecionados do grupo consistindo em 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e $27,2 \pm 0,2^\circ 2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

7. Forma cristalina de acordo com a reivindicação 1, que apresenta a forma cristalina H, caracterizada pelo fato de que apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) compreendendo pelo menos dez picos selecionados do grupo consistindo em 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9, e $27,2 \pm 0,2^\circ 2\theta$, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

8. Forma cristalina de acordo com a reivindicação 1, que apresenta a forma cristalina H, caracterizada pelo fato de que apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) que apresenta os seguintes picos (2-teta) a 5,334, 7,128, 9,221, 9,611, 10,716, 10,911, 11,847, 12,315, 14,109, 14,876, 16,085, 16,488, 17,047, 17,658, 18,477, 18,828, 19,166, 19,322, 19,725, 19,855, 20,31, 20,817, 20,856, 21,545, 22,078, 22,377, 23,092, 23,326, 23,56, 23,82, 23,859, 24,86, 25,302, 27,2, 28,019, 29,761, 30,021, 30,268, 30,359, 31,074,

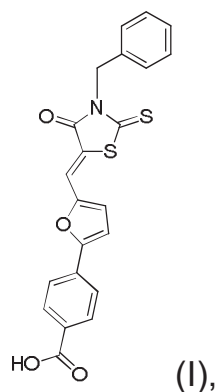
32,14, 33,141, 33,453, 33,713, 33,804, 34,181, 34,701, 35,715, 36,118, 36,287, 36,508, 38,419 e 38,536, com as respectivas intensidades relativas 1574, 3086, 985, 871, 2414, 2184, 1077, 995, 922, 804, 1271, 1653, 963, 1285, 1127, 837, 819, 994, 1062, 784, 1438, 852, 866, 726, 617, 640, 1135, 732, 1443, 787, 716, 1360, 795, 1554, 504, 511, 420, 419, 433, 685, 363, 291, 283, 436, 389, 298, 408, 318, 285, 337, 301, 372 e 343, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

9. Forma cristalina de um sal de trometamina de um composto que apresenta a Fórmula I:



que é caracterizada pelo fato de que apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a Figura 6C, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

10. Forma cristalina de um sal de trometamina de um composto que apresenta a Fórmula I:



que é caracterizada pelo fato de que apresenta um padrão de difração de pó de raio X (XRPD) de acordo com a Figura 6D, como determinado em um difratômetro usando radiação de Cu-K α .

11. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável e uma forma cristalina de um sal de meglumina de um composto que apresenta a Fórmula I, como definida em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

12. Uso de uma formulação farmacêutica como definida na reivindicação 11, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição mediada por $\beta 2$ integrina.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a condição mediada por $\beta 2$ integrina é selecionada do grupo consistindo em inflamação aguda, inflamação crônica, doença hepática crônica, espessamento neoíntimo associado com lesão vascular, lesão tecidual, peritonite, nefropatia diabética, uma doença autoimune, câncer, glaucoma, doença do enxerto versus hospedeiro, degeneração macular, e uveíte.

14. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a condição mediada por $\beta 2$ integrina é câncer.

Fig. 1

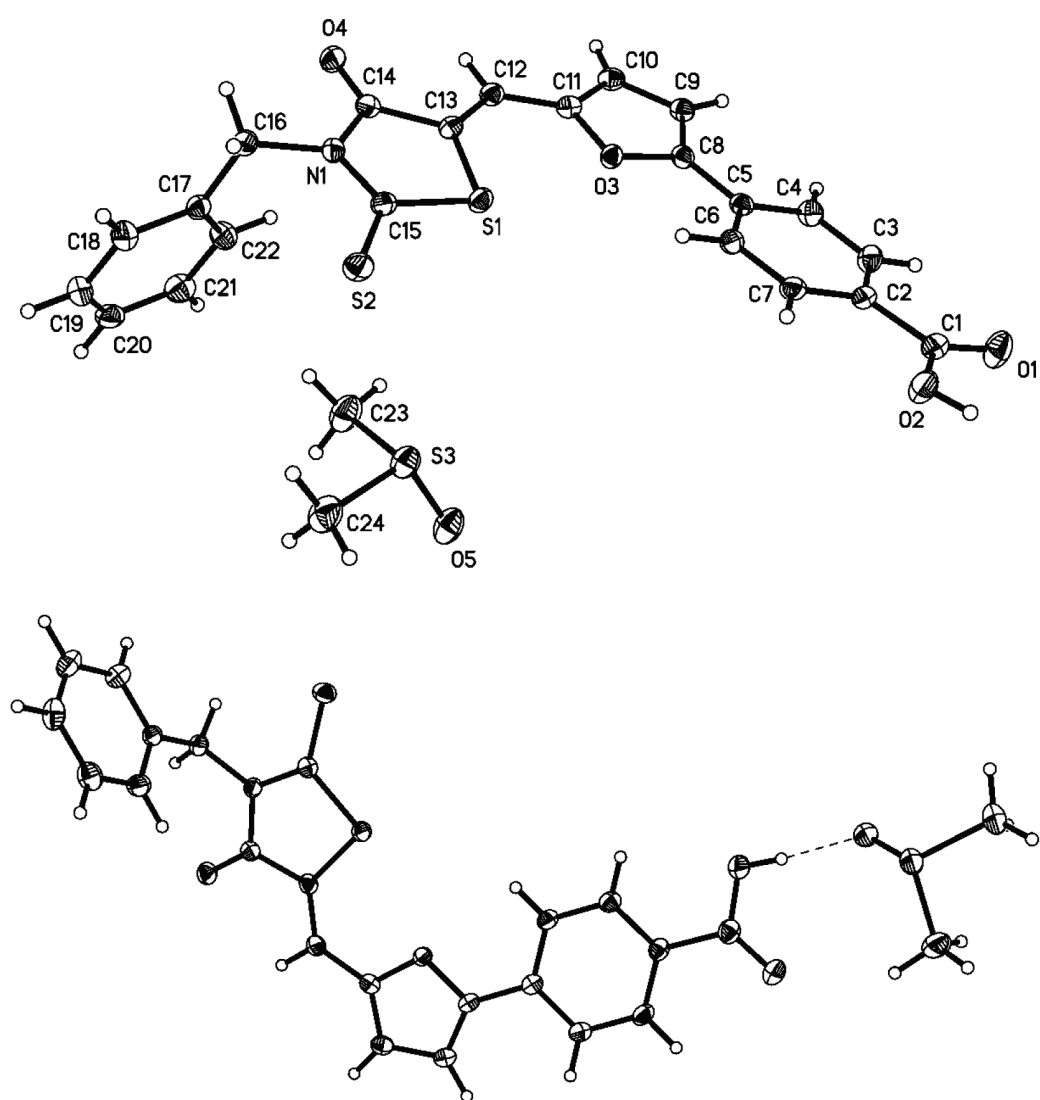


Fig. 2

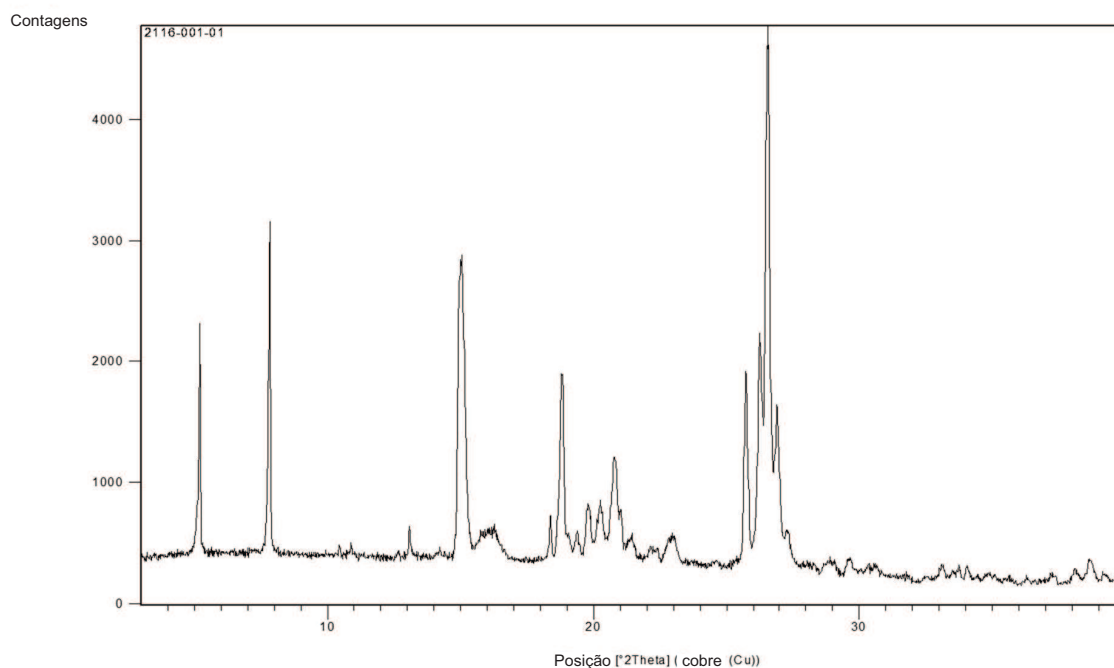


Fig. 3

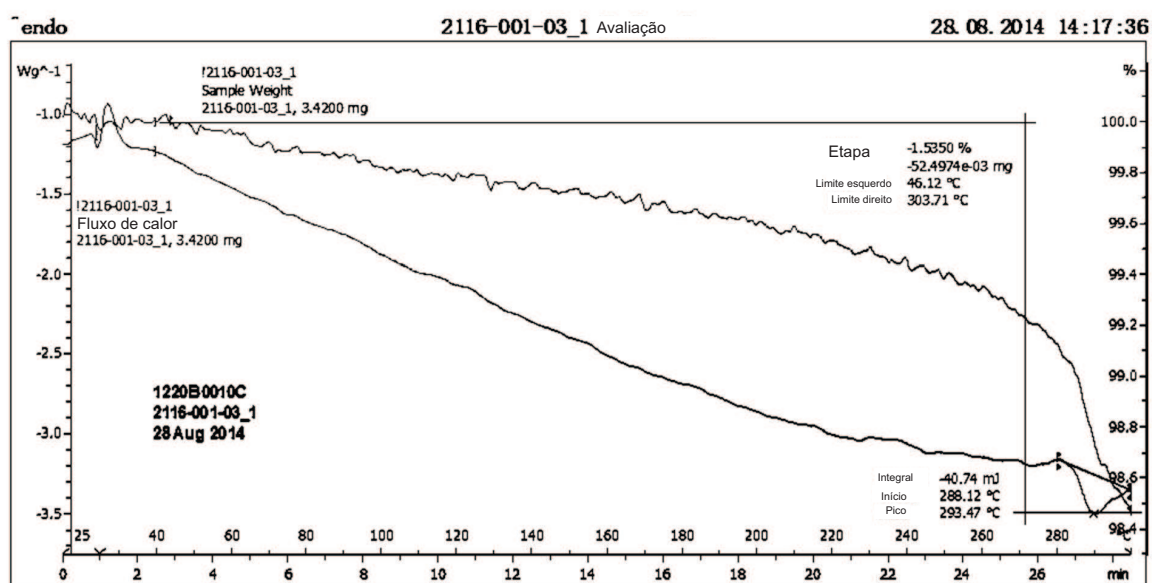


Fig. 4

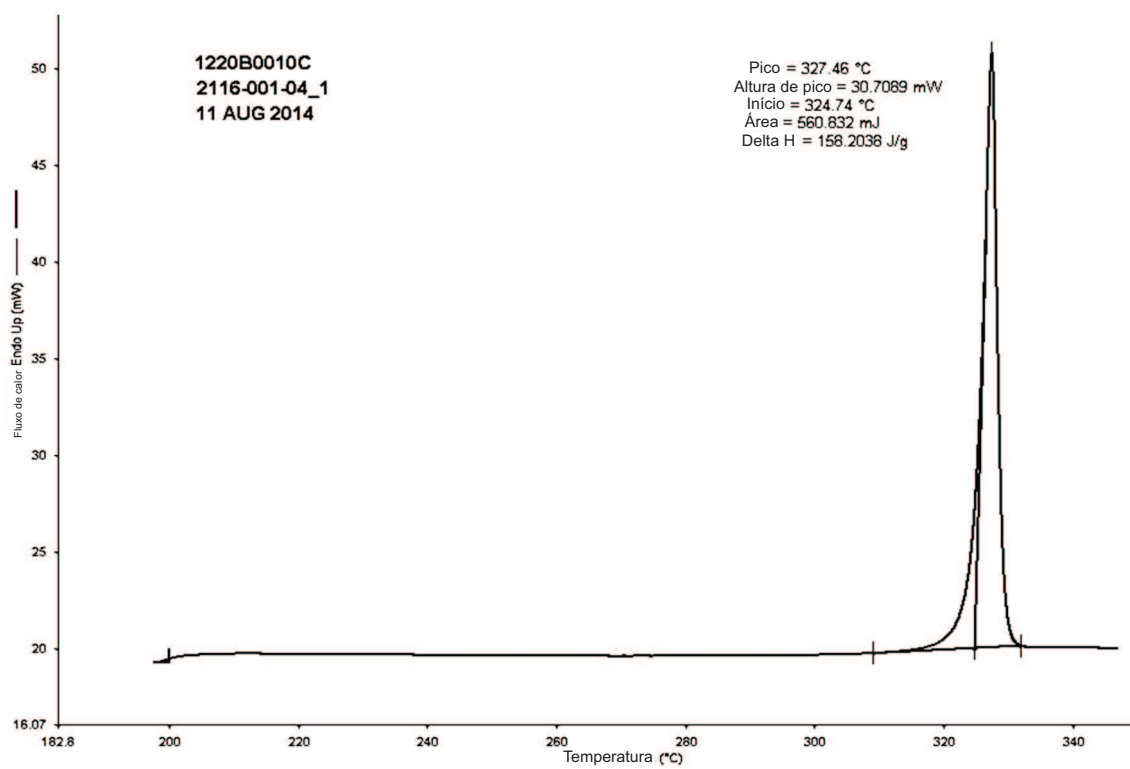


Fig. 5

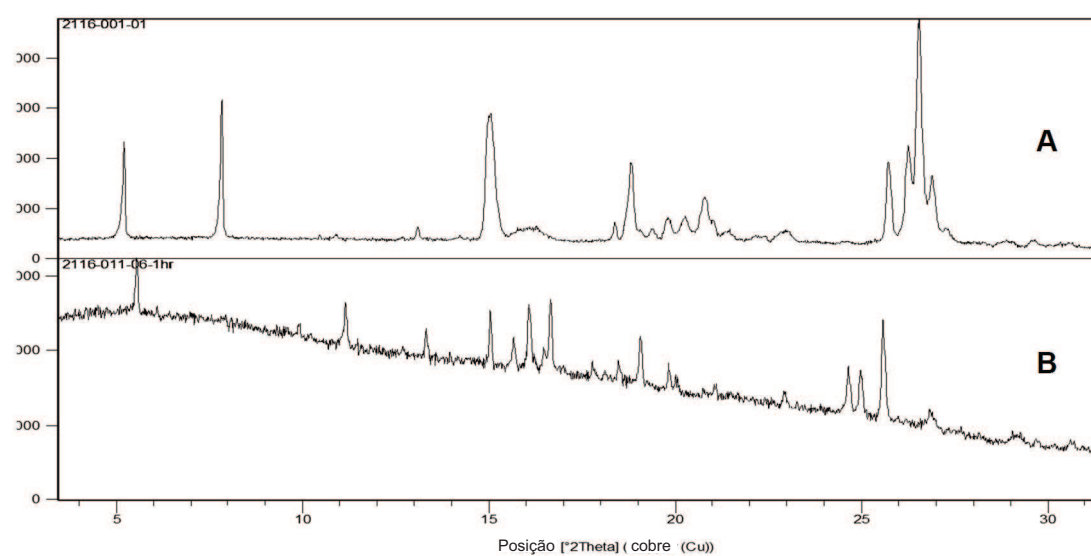


Fig. 6

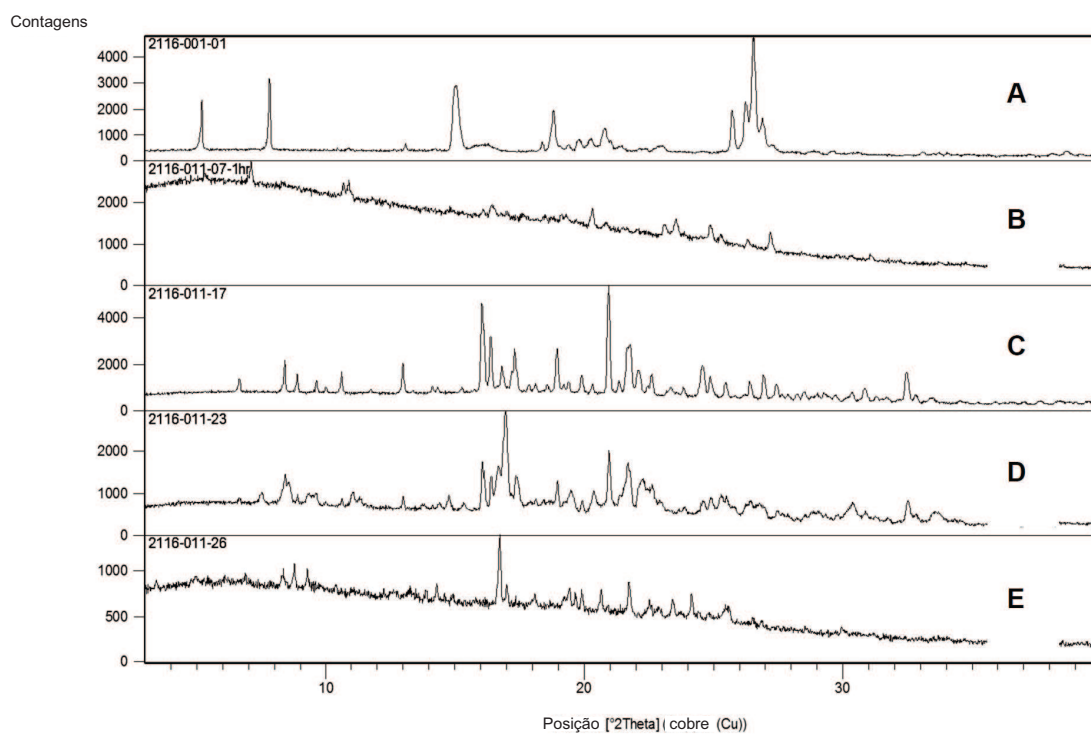


Fig. 7

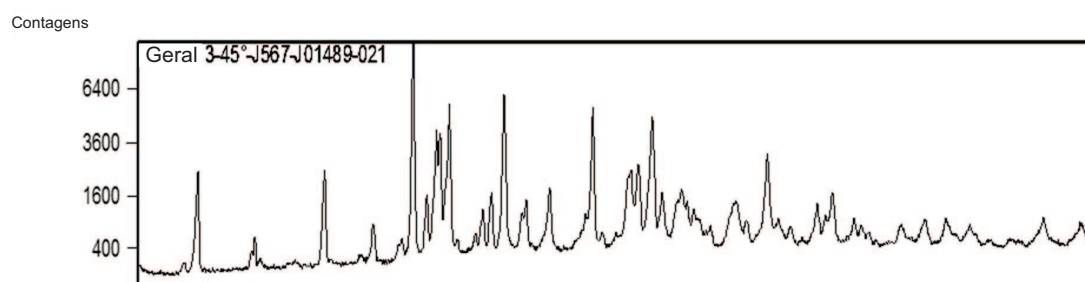


Fig. 8

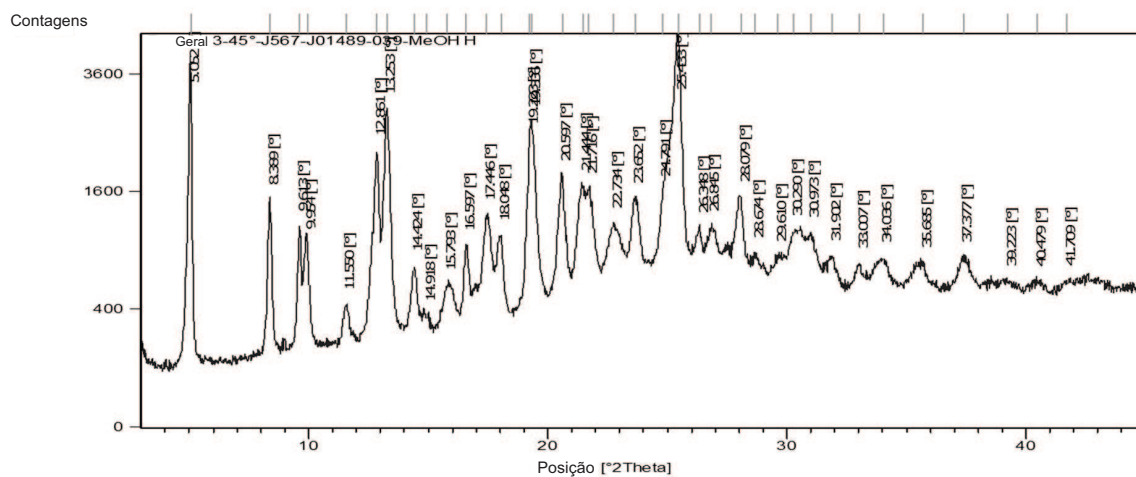


Fig. 9

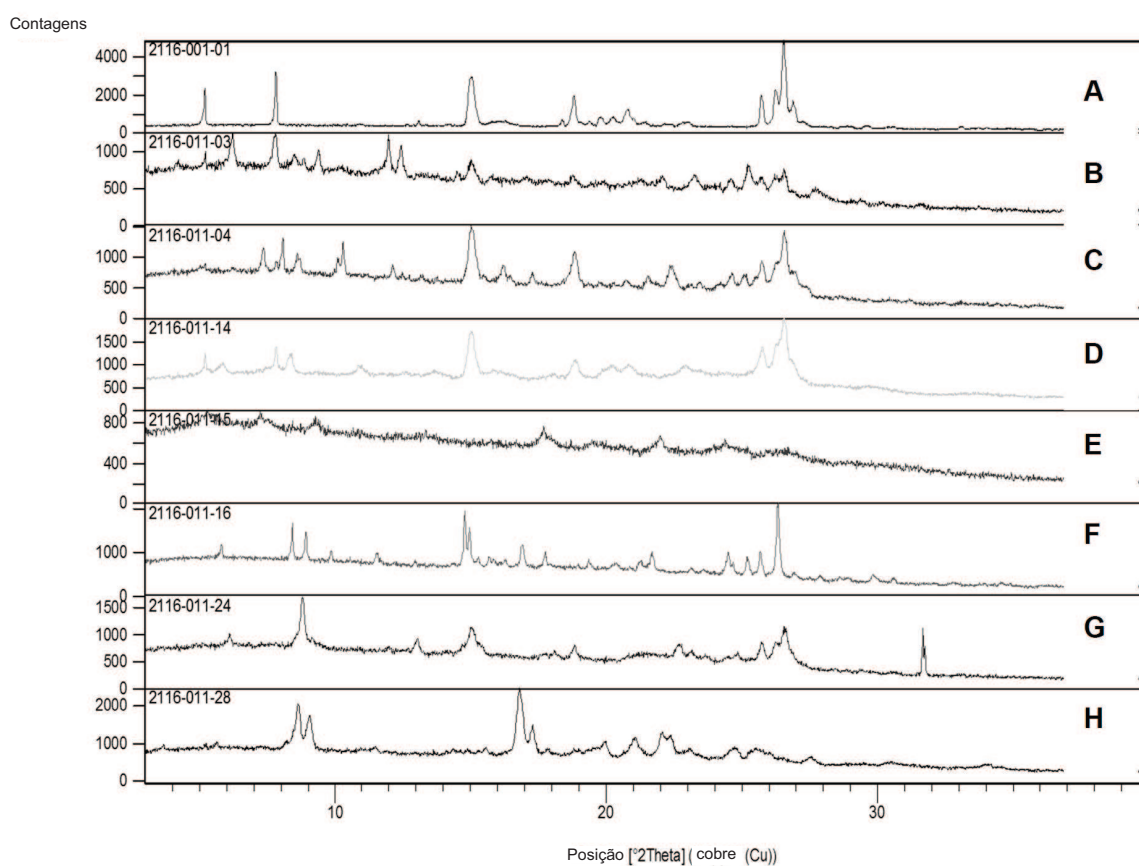


Fig. 10

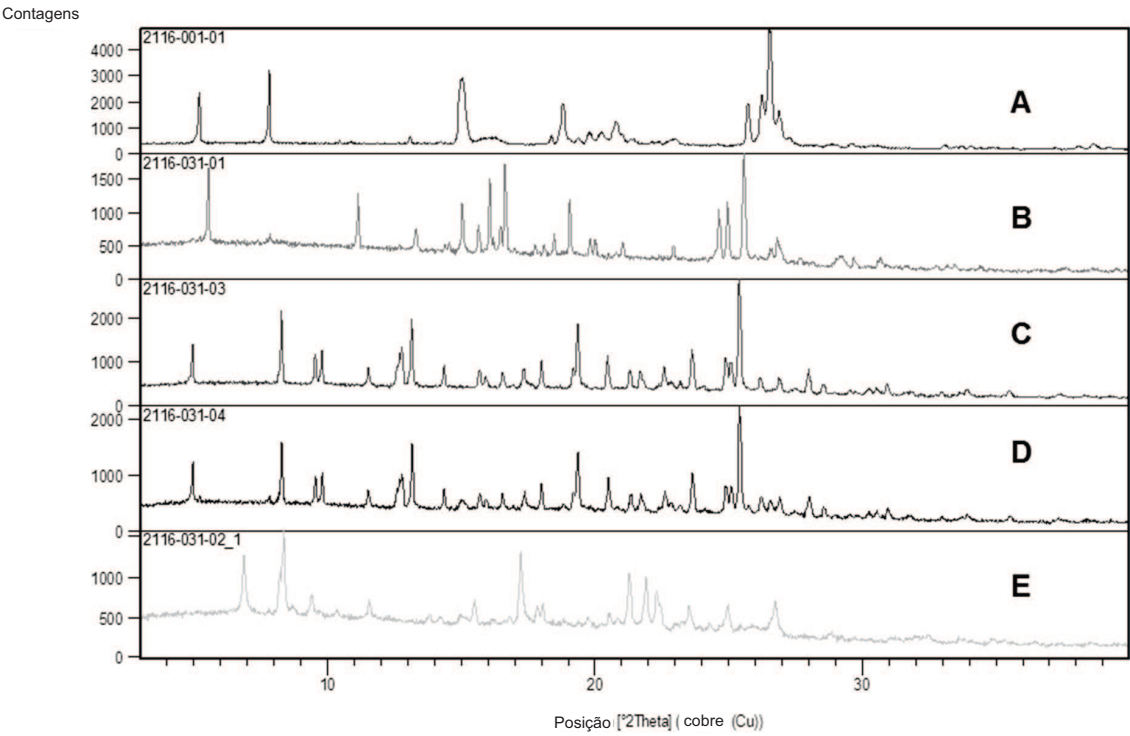


Fig. 11

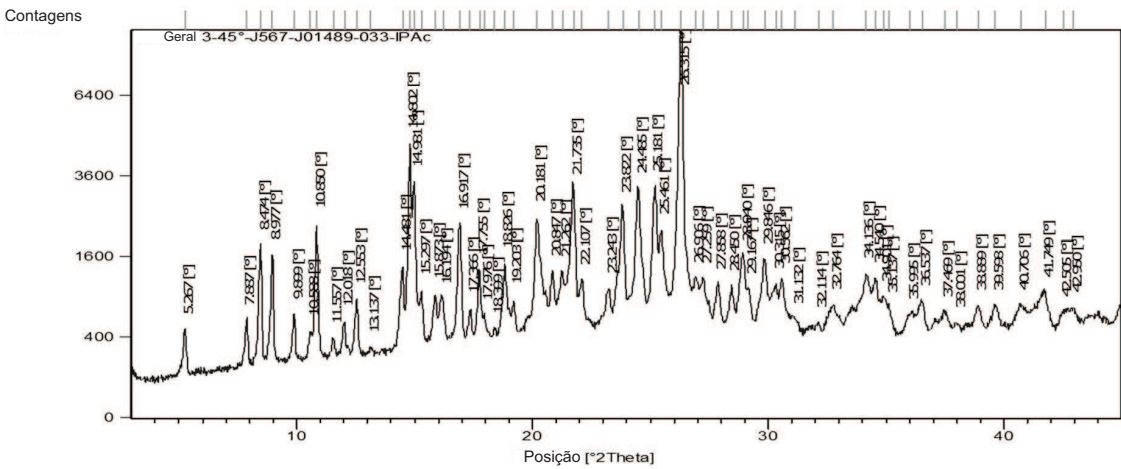


Fig. 12

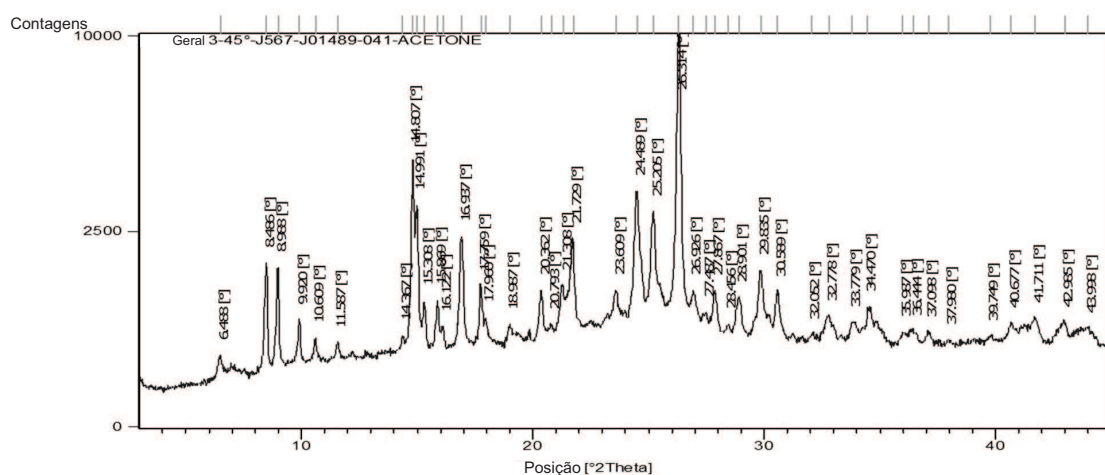


Fig. 13

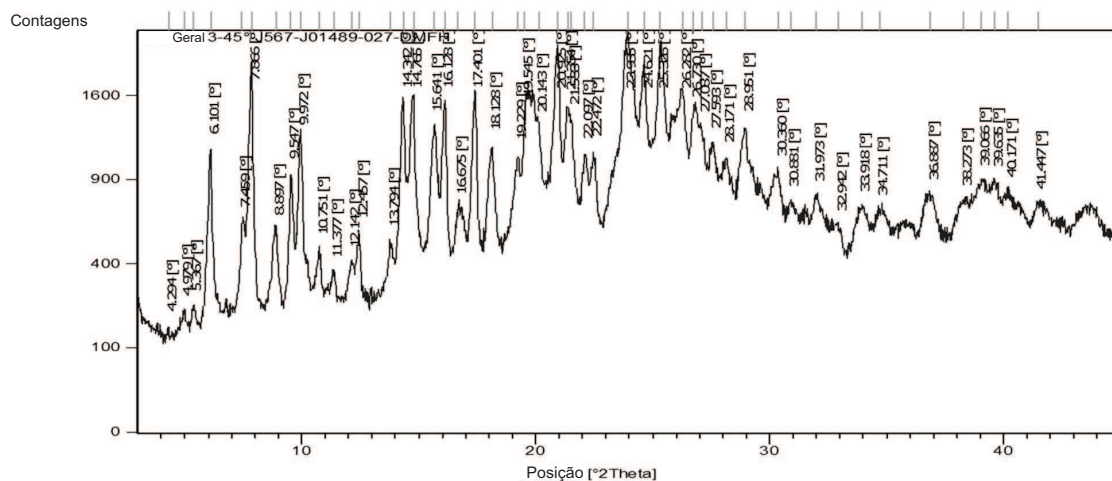


Fig. 14

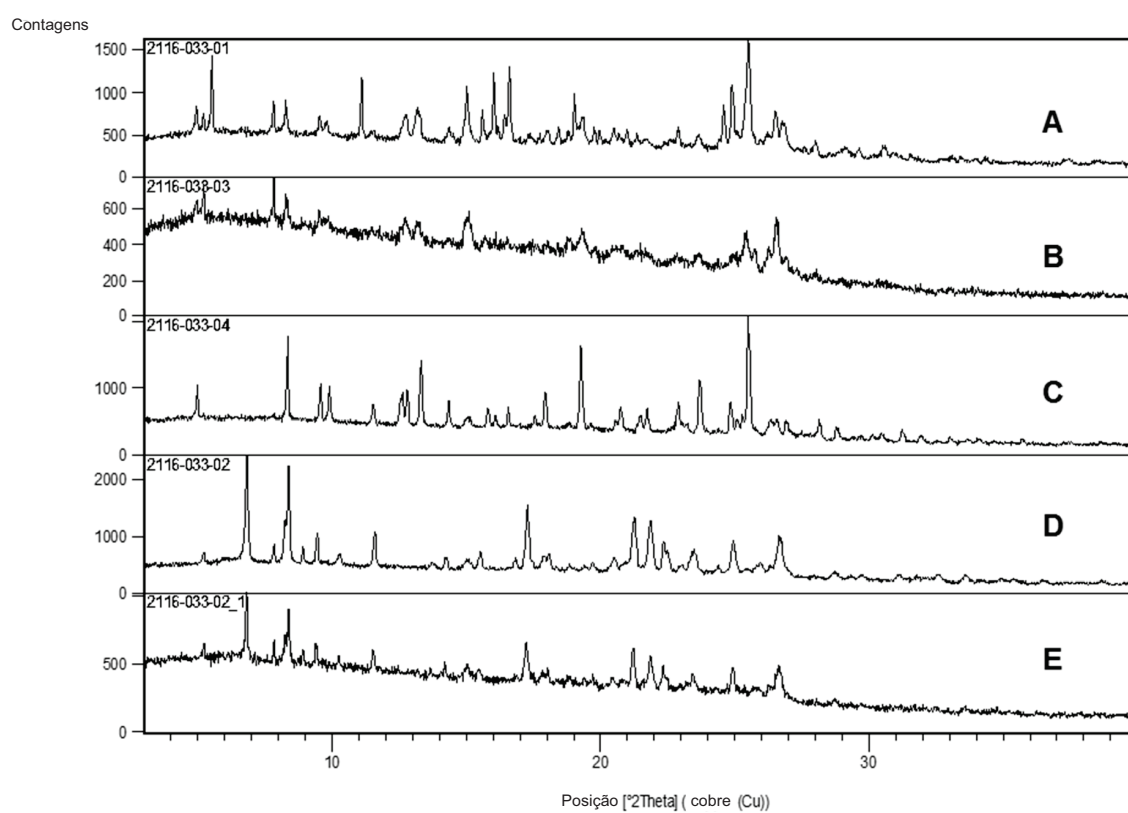


Fig. 15

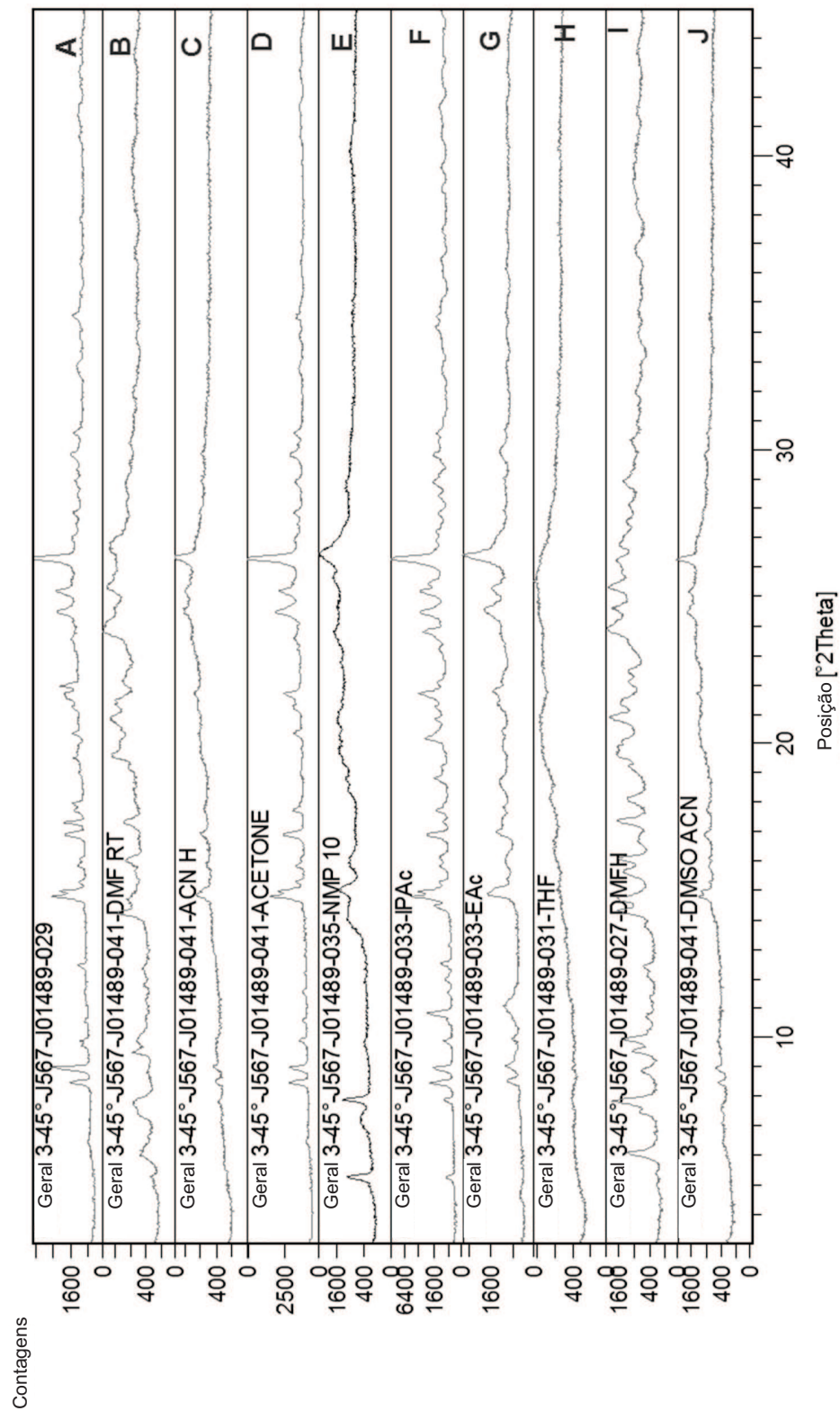


Fig. 16

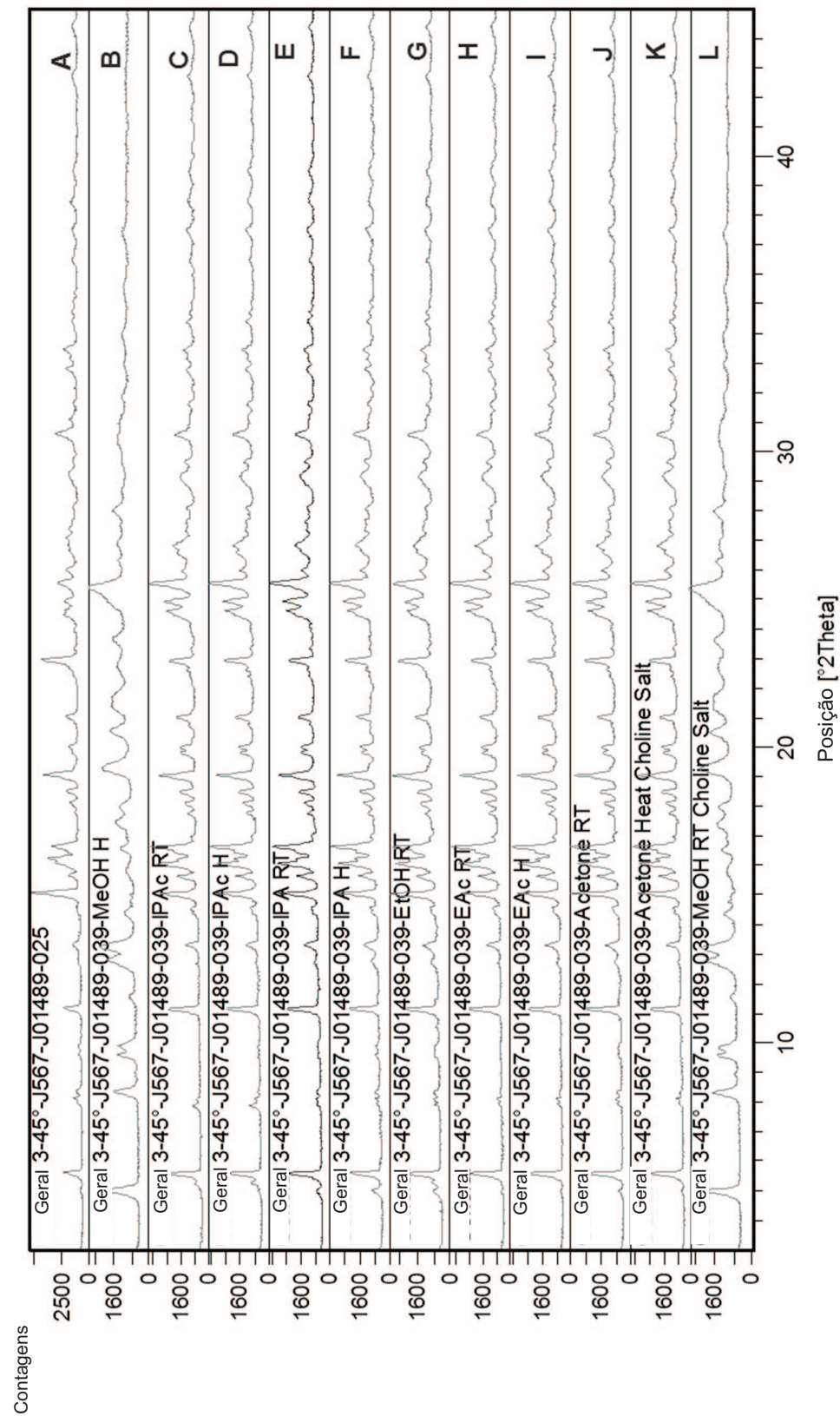


Fig. 17

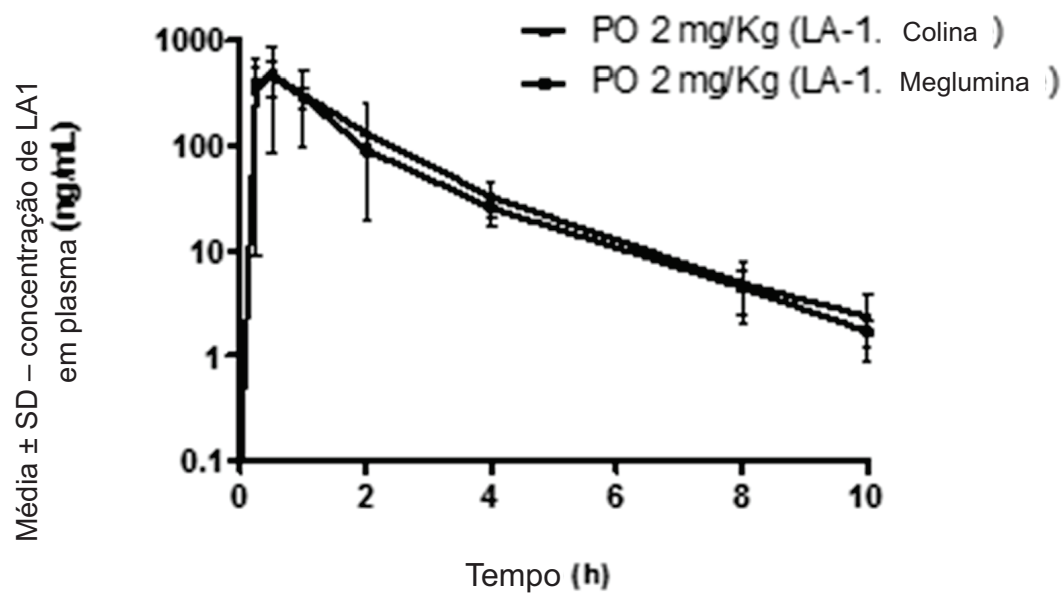


Fig. 18

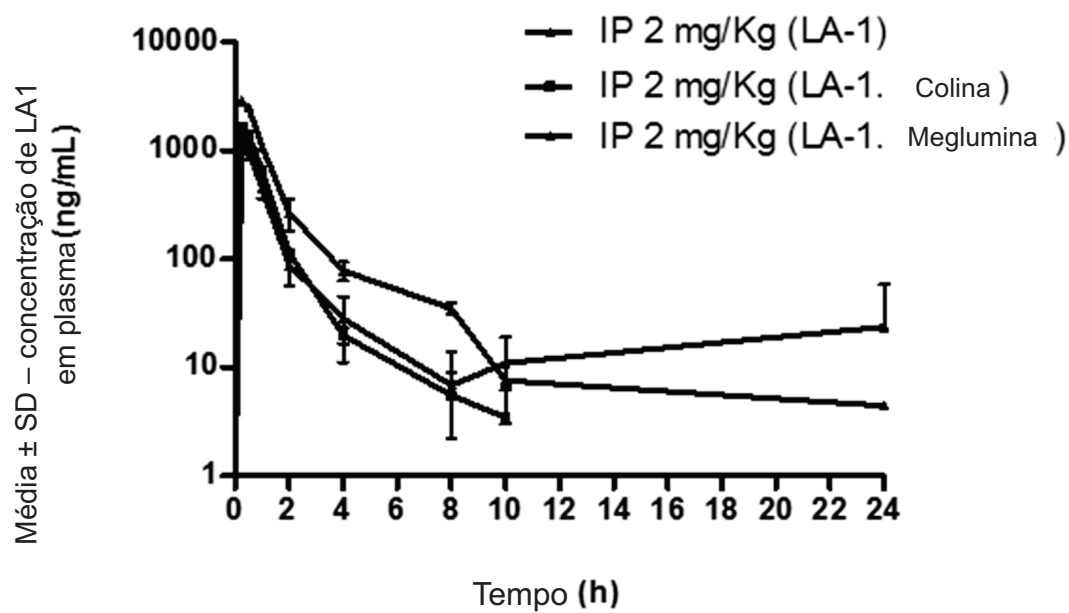


Fig. 19

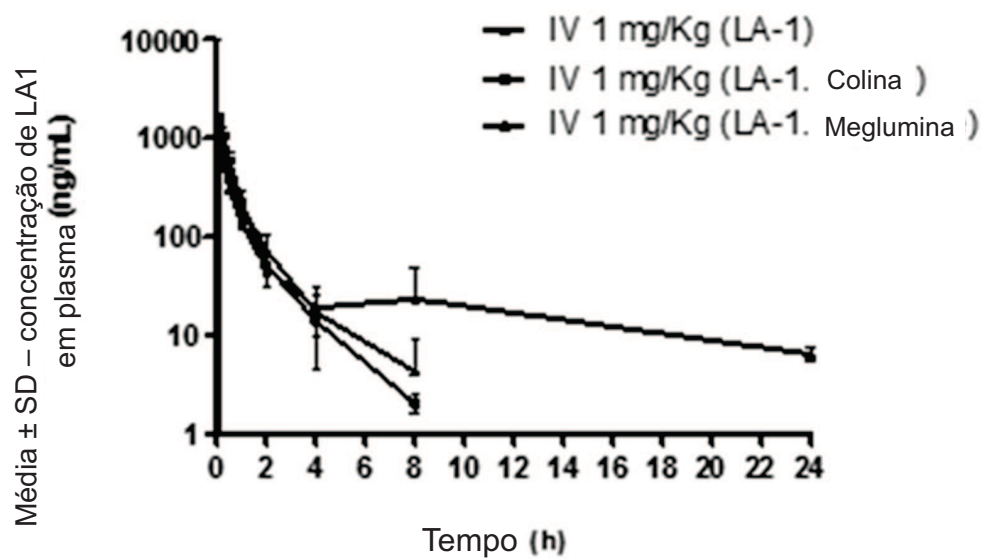


Fig. 20

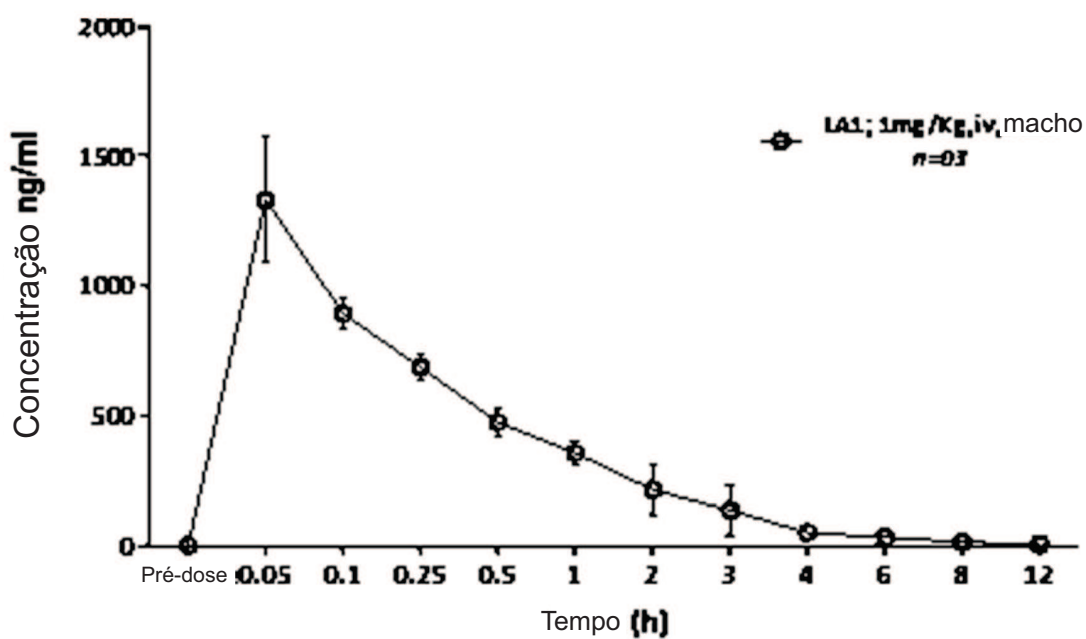


Fig. 21

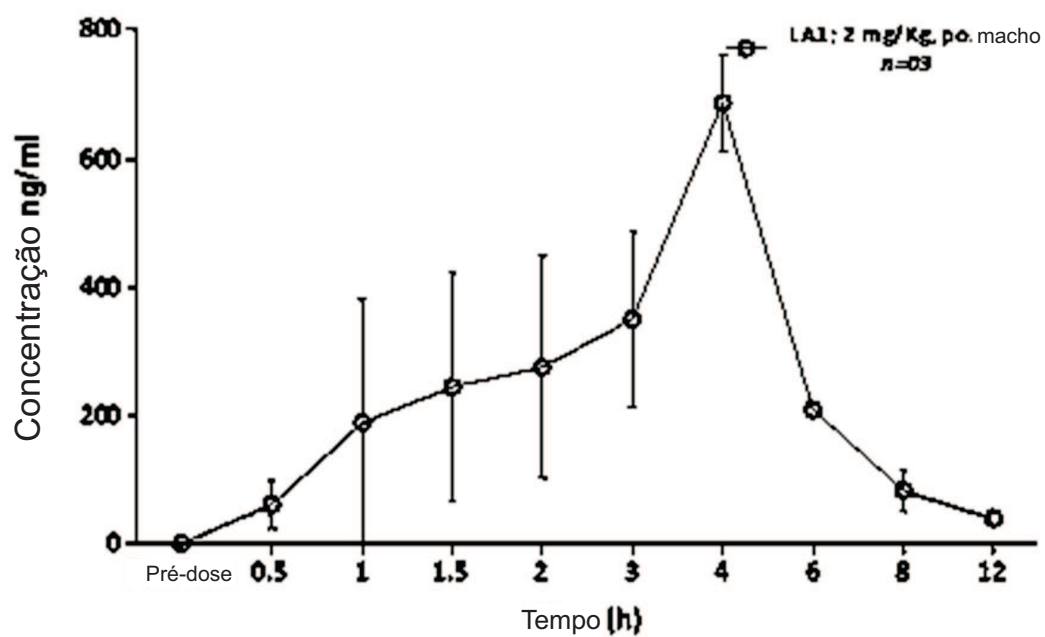


Fig. 22

Perfil de concentração de plasma versus tempo
de colina de LA1 em cachorros Beagle machos

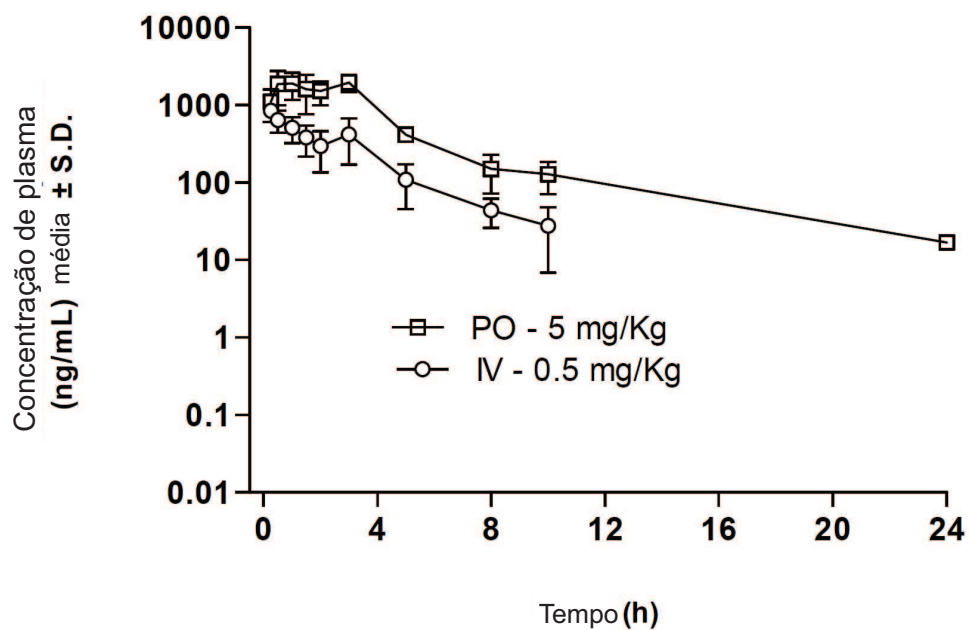


Fig. 23

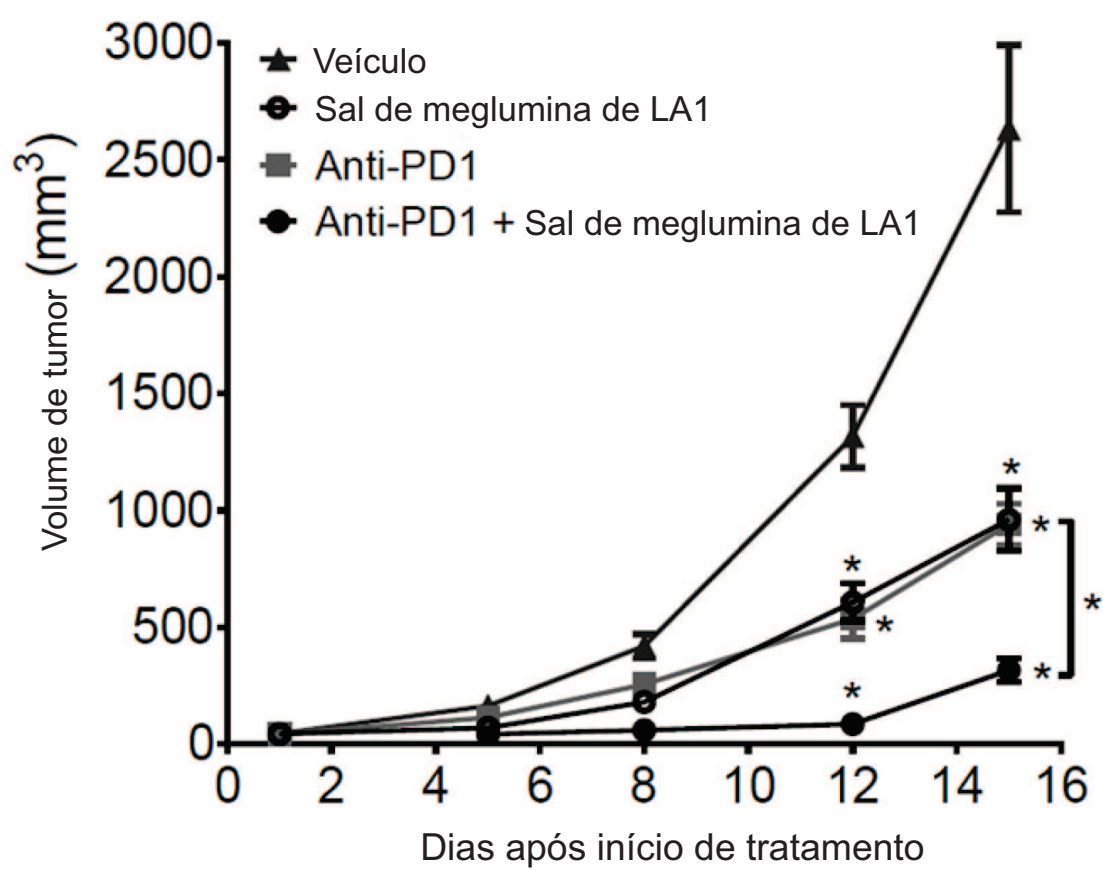


Fig. 24

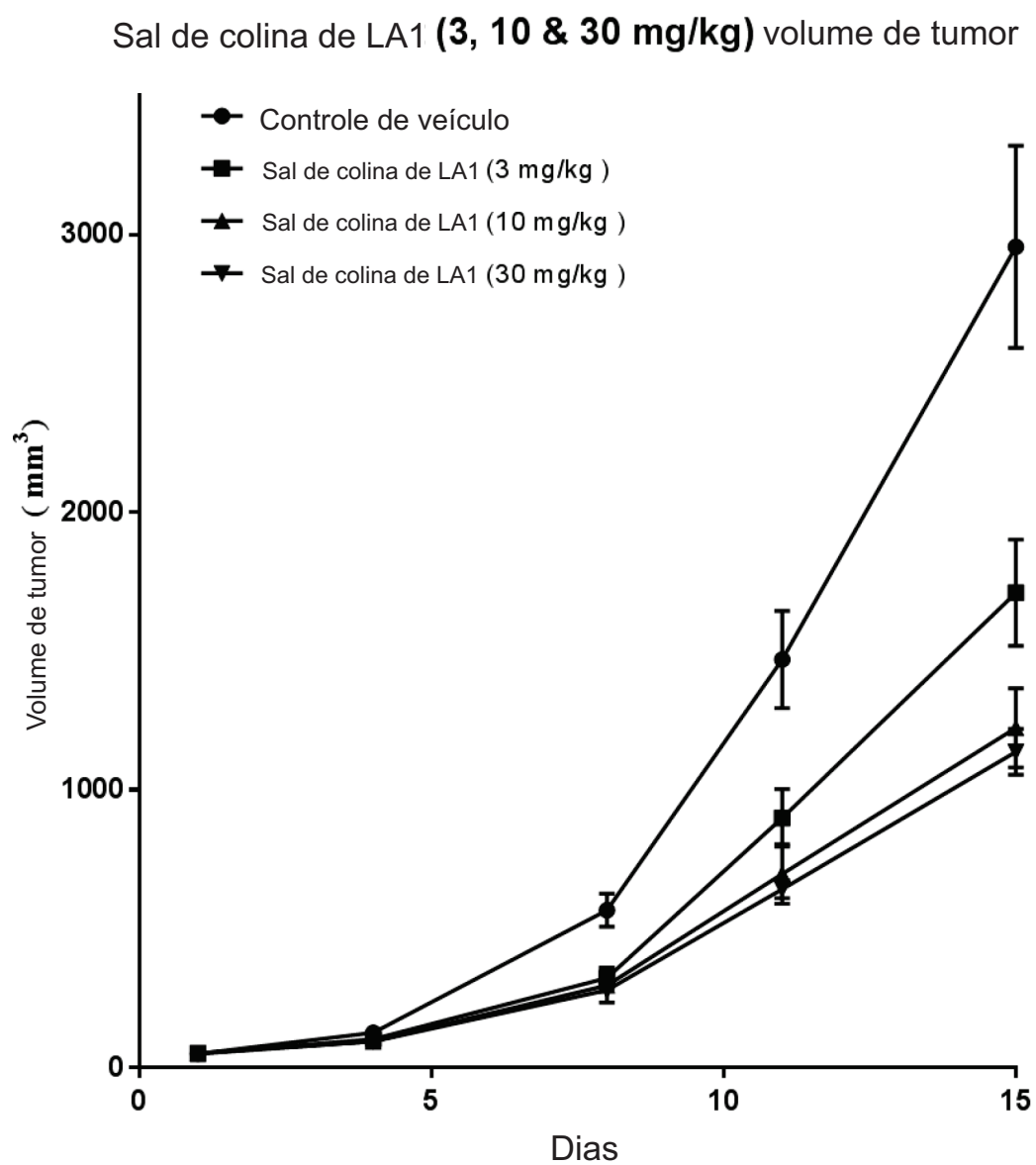


Fig. 25

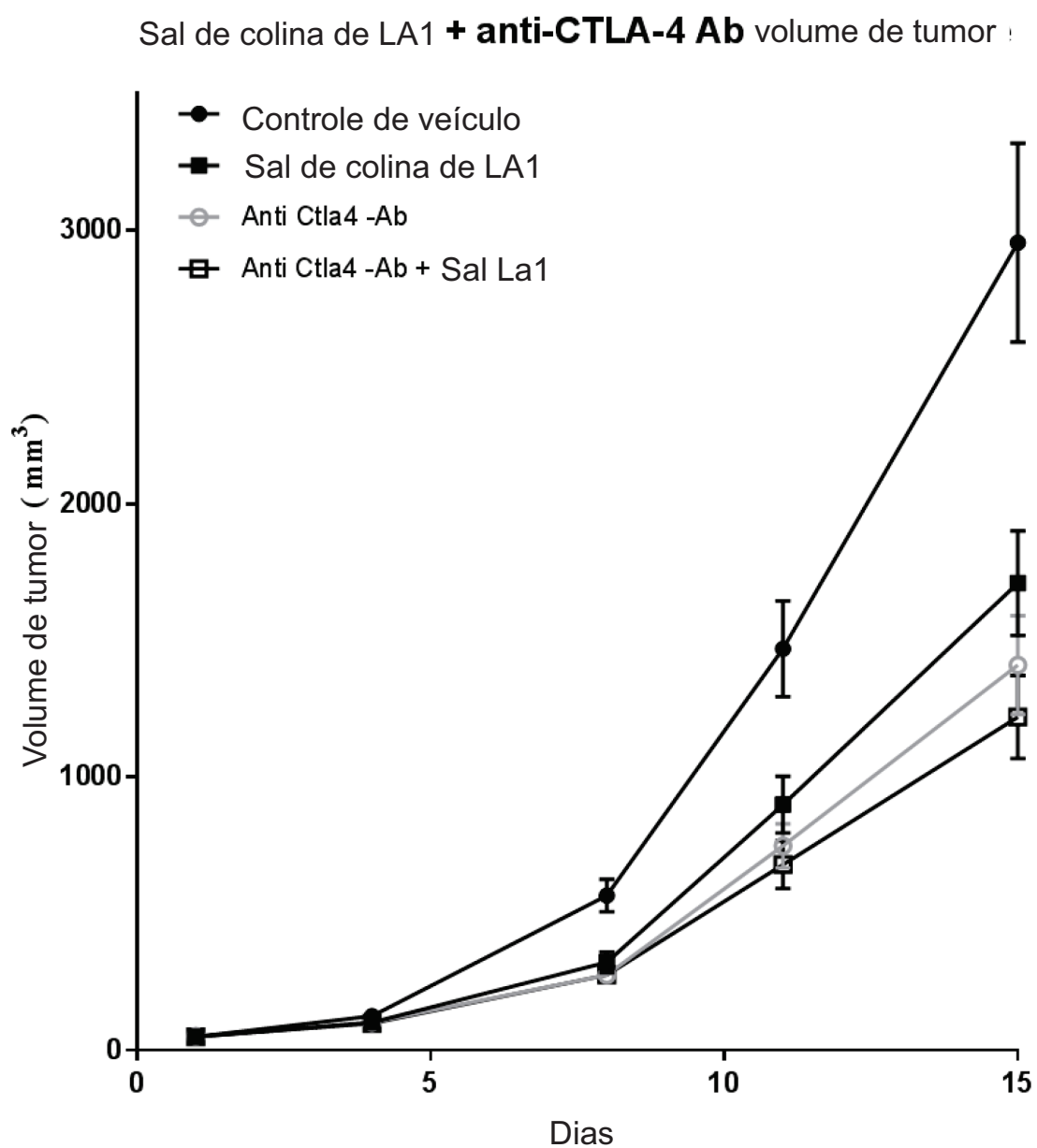
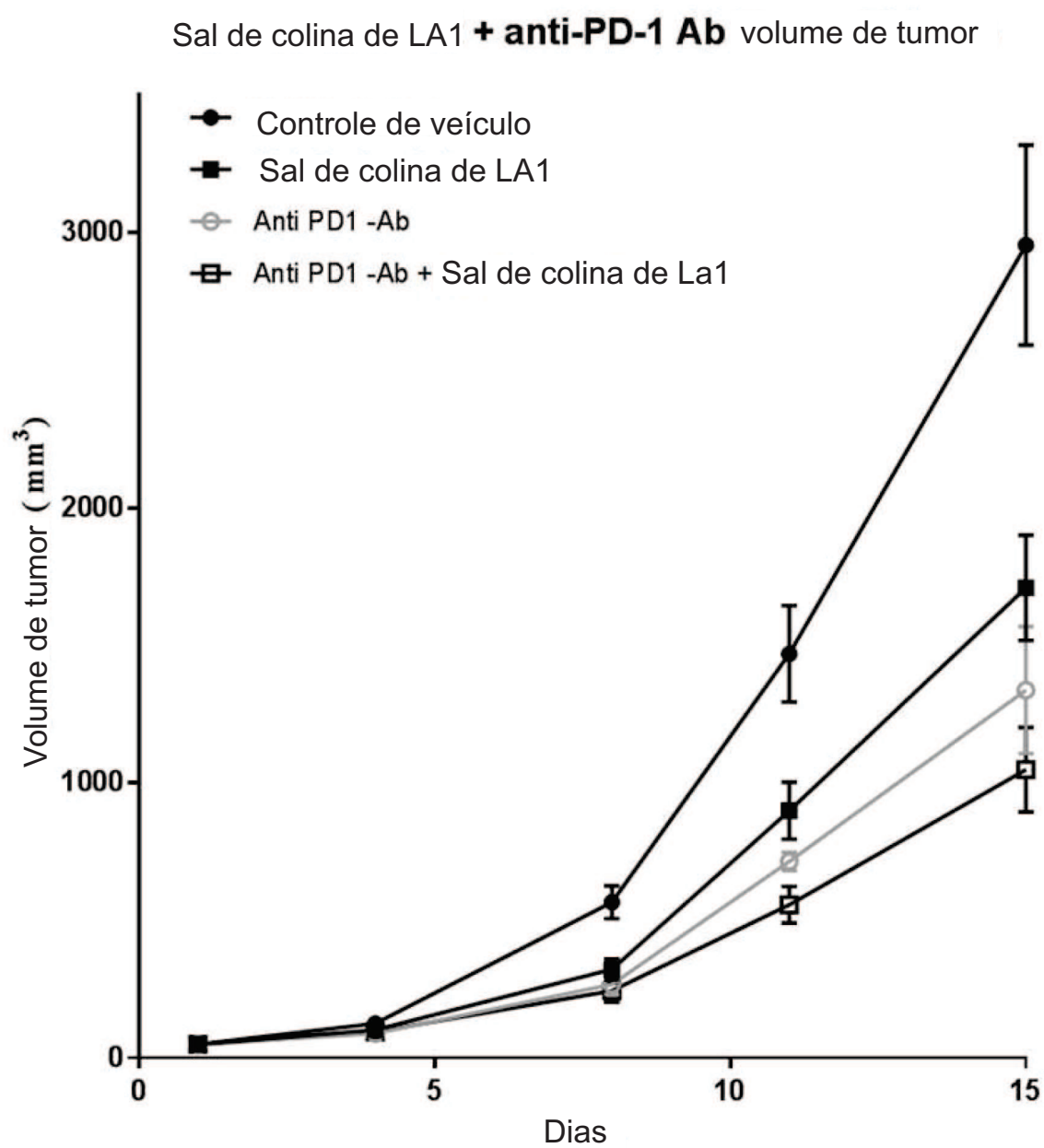


Fig. 26



RESUMO

Patente de Invenção: **"SAL DE MEGLUMINA OU TROMETAMINA DE UM COMPOSTO, FORMAS CRISTALINAS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DOS MESMOS E SEUS USOS".**

A presente invenção refere-se a novos sais e formas cristalinas de LA1 de leucaderina [ácido (Z)-4-(5-((3-benzil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ildeno)metil)furan-2-il)benzoico] de acordo com a fórmula I. Métodos para a preparação dos sais e formas cristalinas são também descritos, bem como métodos para o tratamento de doenças e condições mediadas por $\beta 2$ integrina usando os sais e formas cristalinas.