



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

(21) **PI0711646-2 A2**

(22) Data de Depósito: 16/05/2007
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/00
A61P 35/00
C07F 9/6561

(54) Título: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2006 US 60/800,983, 18/07/2006 US 60/831,805

(73) Titular(es): Gilead Sciences, Inc

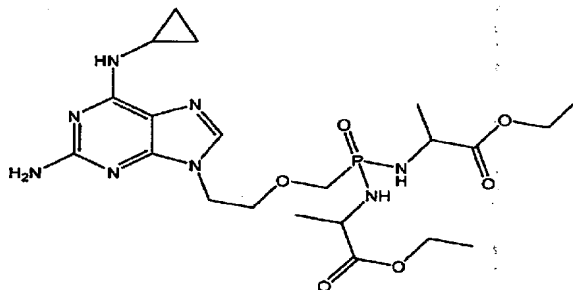
(72) Inventor(es): Adrian S. Ray, Daniel B. Tumas, Hans C. Reiser, Lee S. Chong, William A. Lee, William J. Watkins

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007011726 de 16/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/136650 de 29/11/2007

(57) Resumo: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS. Um composto de fórmula (1) e/ou seus sais, tautômeros e solvatos é usado para tratar neoplasias malignas hematológicas. Em uma modalidade, um sal de ácido orgânico do composto 1 é provido para uso geral no tratamento de neoplasmas, e em uma modalidade adicional o sal é estabilizado com carboidrato.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS**".

Antecedentes da Invenção

5 N-6 ciclopropilPMEDAP ("cpr-PMEDAP") tem demonstrado ser eficaz produzindo um efeito induzido antiproliferativo e diferenciação em cultura de células in vitro contra uma variedade de linhas de células de tumor (Naessens et al, "Biochem. Pharmacol. 1999 Jul 15;58(2):311-23). Entretanto, quando cpr- PMEDAP e outros compostos PMEDAP N β -substituídos foram empregados em um modelo in vivo de neoplasias malignas hematológicas de ratos endógamos Sprague-Dawley (Valerianova et al. "Anticancer Res. 2001 May-Jun;21(3B):2057-64), os autores concluíram que os "fosfonatos de nucleosídeo acíclico substituído na posição não parecem ser fármacos promissores para o trattamento de neoplasias malignas hematológicas" devido à "toxicidade alta".

Vários ésteres de amidato de bi- e mono-aminoácido de cpr-PMEDAP (e seu uso como agentes antiproliferativos) têm sido descritos. Veja WO 05/066189. WO 02/08241 descreve um método para triagem de pró-fármacos análogos de neucleotídeo metoxifosfonato que são úteis para tratar neoplasias malignas hematológicas malignas com toxicidade reduzida.

As neoplasias malignas hematológicas são amplamente definidas como distúrbios proliferativos das células sangüíneas e/ou seus progenitores, em que essas células proliferam de maneira descontrolada. Anatômica-mente, as neoplasias malignas hematológicas são divididas em dois grupos principais: os linfomas – massas malignas de células linfóides, que ocorrem primariamente, mas não exclusivamente, em linfonodos, e as leucemias – neoplasias que derivam tipicamente de células linfóides ou mielóides e que afetam primariamente a medula óssea e o sangue periférico. Os linfomas podem ser subdivididos em doença de Hodgkin e linfoma Não-Hodgkin (L-NH). Este último grupo compreende várias entidades distintas, que podem ser diferenciadas clinicamente (por exemplo, linfoma agressivo, linfoma indolente), em nível histológico (por exemplo, linfoma folicular, linfoma de células

do manto) ou com base na origem da célula maligna (por exemplo, linfócito B, linfócito T). As leucemias e neoplasias malignas relacionadas incluem a leucemia mielógena aguda (LMA), a leucemia mielógena crônica (LMC), a leucemia linfoblástica aguda (LLA) e a leucemia linfocítica crônica (LLC).

- 5 Outras neoplasias malignas hematológicas incluem as discrasias de plasmócitos, incluindo o mieloma múltiplo, e as síndromes mielodisplásicas.

Enquanto a introdução de novos agentes, tais como o imatinibe (Gleevec®), o bortezomibe (Velcade®) e o rituximabe (Rituxin®), melhorou o desfecho de várias neoplasias malignas hematológicas, continua havendo
10 uma necessidade médica não atendida de novos agentes terapêuticos eficazes. Por exemplo, existe uma necessidade médica não suprida para pacientes que sofrem de LNH refratário ao tratamento/recidivado, visto que a incidência de LNH aumentou substancialmente no decorrer dessas últimas cinco décadas nos Estados Unidos.

- 15 As leucemias acometem um número menor de pacientes. Entretanto, continua havendo uma necessidade médica substancial não atendida, como, por exemplo, para o tratamento da leucemia mielógena aguda (LMA) e da leucemia linfocítica crônica (LLC), como ilustram as taxas precárias de sobrevida de 5 anos.

20 Existe uma necessidade de agentes antimetabólicos multiespecíficos ou amplamente ativos, com melhor janela terapêutica em relação às modalidades de tratamento existentes, passíveis de serem usados como monoterapia, isoladamente, ou em associação com outros agentes terapêuticos. Os antimetabólitos interferem, em maioria, nas enzimas envolvidas na
25 síntese de DNA, tais como as enzimas relacionadas com a biossíntese de timidina ou de purina, e/ou são incorporados no DNA recém-sintetizado. Os análogos de nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos constituem uma importante classe de agentes citotóxicos eficazes, que são amplamente usados para o tratamento das leucemias e dos linfomas. Alguns desses agentes,
30 a 5-fluorouracila, a capecitabina e, especialmente, a gencitabina, também estão sendo usados para o tratamento de tumores sólidos. Três análogos da adenosina, a fludarabina, a cladribina e a clofarabina, estão indicados

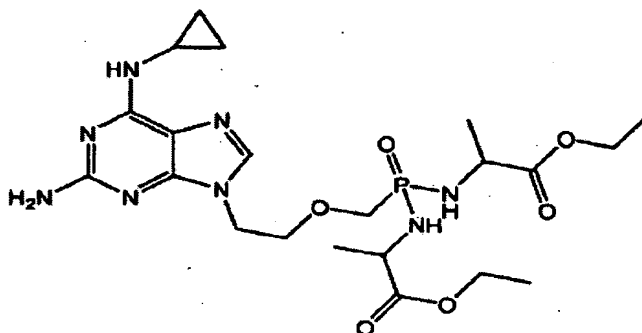
para a LLC, a leucemia de células pilosas e a LLA pediátrica, respectivamente. O análogo de purina, a pentostatina (2'-desoxicoformicina), um inibidor da adenosina desaminase, possui atividade clínica contra as neoplasias linfóides malignas. A nelarabina é um pró-fármaco do análogo da desoxiguanosina, ara-G, que é resistente ao catabolismo pela purina nucleosídeo fosforilase e que demonstrou ter atividade contra as neoplasias de células T. Entre os análogos da pirimidina, a citarabina (ara-C) foi avaliada; é ativa em diversas neoplasias malignas hematológicas e constitui um dos agentes usados no tratamento da leucemia mielógena aguda.

Todavia, as terapias existentes possuem limitações, por exemplo, quanto à sua segurança, eficácia e facilidade de uso. Não é incomum que os tratamentos sejam, no início, bem sucedidos; a seguir, as neoplasias malignas hematológicas freqüentemente sofrem recidiva com o decorrer do tempo.

Por conseguinte, continua havendo necessidade de novos nucleosídeos/nucleotídeos com melhor janela terapêutica e/ou utilidade complementar em relação aos compostos existentes dessa classe.

Os requerentes procuraram um composto apropriado para o tratamento de neoplasias malignas hematológicas com melhor PK e carga, melhor janela terapêutica e/ou menor resistência farmacológica. Em particular, desejava-se identificar um composto capaz de se concentrar nas células sangüíneas, em particular nas PBMC. Espera-se que a concentração do composto nessas células-alvo irá alargar a janela terapêutica ao reduzir a exposição dos outros tecidos do paciente ao composto.

WO 05/066189 descreve um composto tendo a estrutura 1:



(i)

Essa invenção relaciona-se com o composto 1. Relaciona-se também com o diastereômero do mesmo, em que o aminoácido bis substituído no átomo do fósforo é um L aminoácido, bem como esse diastereômero substancialmente desprovido de D aminoácido.

5 Até agora, os compostos de fórmula 1 têm sido empregados na forma da base livre. Entretanto, os requerentes determinaram que a base livre não é comercialmente ideal para formulação em uma forma posológica, visto a base livre é higroscópica. Por conseguinte, os requerentes procuraram uma forma do composto 1 que pudesse facilitar os processos de fabricação para formas posológicas terapêuticas.

Sumário da Invenção

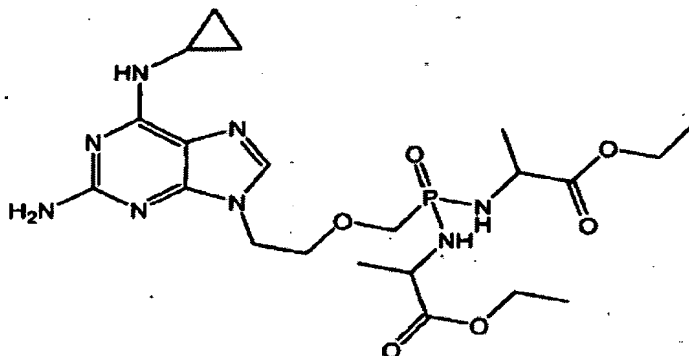
Os requerentes constataram que a natureza do alquil éster no grupo carboxila do éster de aminoácido da classe de cpr-PMEDAP bisamidato de compostos é fundamental na distribuição preferencial do composto nas PBMC. Inesperadamente, foi constatado que a administração do bis(etil) éster (isto é, composto 1) resultou em uma distribuição altamente preferencial de cpr- PMEDAP nas PBMC em relação o plasma. A distribuição foi bem superior àquela obtida com o bis(isopropil) éster estreitamente relacionado sob os demais aspectos. Além disso, foi determinado que os sais de ácidos orgânicos do composto 1 eram menos higroscópicos do que a base livre, facilitando, assim, a fabricação de produtos contendo o composto 1. Por fim, foi determinado que a estabilidade desses sais (particularmente em formulações por via parenteral) era intensificada ao incluir um carboidrato nas formulações.

25 Por conseguinte, uma modalidade da invenção é um sal de ácido orgânico do composto 1 e/ou seus tautômeros e solvatos.

Outra modalidade da invenção é uma composição que compreende (a) um sal de ácido orgânico do composto 1 e/ou seus tautômeros e solvatos e (b) um carboidrato, por meio do qual a estabilidade de armazenamento do sal é intensificada.

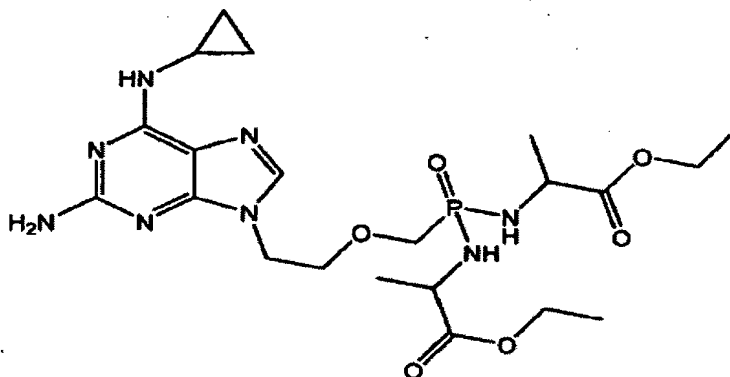
30 Outra modalidade da invenção é um método para o tratamento de um paciente que apresenta uma neoplasia maligna hematológica, que

compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto



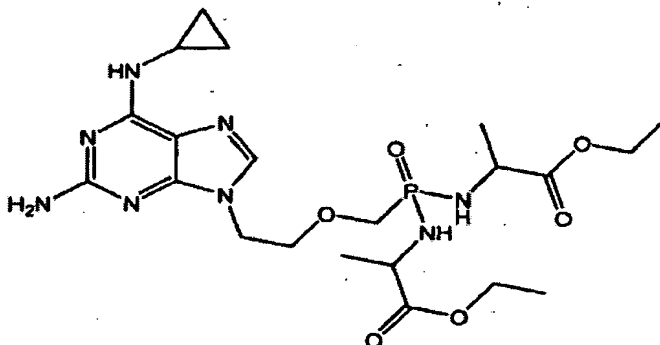
e/ou seus sais, tautômeros e solvatos.

- 5 Uma modalidade adicional da invenção é uma combinação que compreende o composto



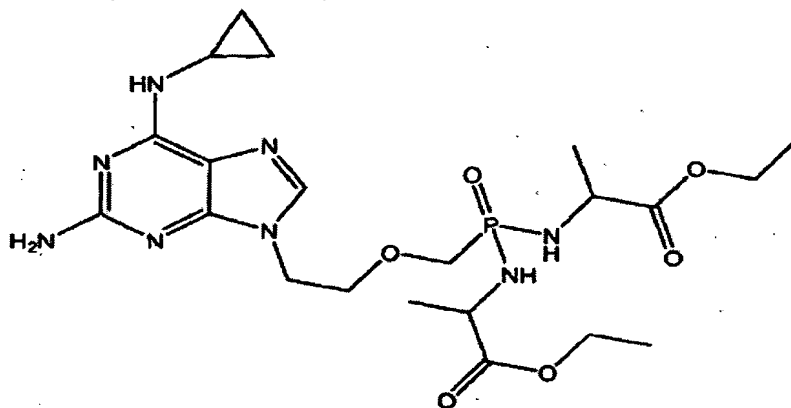
e/ou seus sais, tautômeros e solvatos em um recipiente apropriado para uso na administração parenteral do composto.

Uma modalidade adicional da invenção é um método que compreende a preparação de um sal de ácido orgânico do composto



- 10 e um carboidrato em uma solução aquosa estéril e o armazenamento de dita solução por um período que exceda cerca de 1 hora.

Uma modalidade adicional da invenção é uma composição embalada, que compreende uma solução aquosa estéril de um carboidrato e de um sal de ácido orgânico do composto



juntamente com uma descrição (por exemplo, nota inserida para pacientes)
 5 de que a solução é opcionalmente armazenada por um período de mais de cerca de 1 hora.

Os ácidos orgânicos apropriados para a preparação dos sais dessa invenção são tipicamente compostos que contêm pelo menos um grupo carboxila, incluindo aminoácidos (de ocorrência natural ou sintéticos), tais
 10 como ácido glutâmico e ácido aspártico, e ácidos C₁-16 alquil e C₆-16 aril and C₄-16 heteroaril carboxílicos, tais como os ácidos acético, glicólico, láctico, pirúvico, malônico, glutárico, tartárico, cítrico, fumárico, succínico, málico, maléico, hidroximaléico, benzóico, hidroxibenzóico, fenilacético, cinâmico, salicílico e 2-fenoxibenzóico. Juntamente com qualquer derivado (excluindo
 15 ésteres onde nenhuma carboxila permanece livre) dos mesmos apresentando a mesma raiz (por exemplo, "ácido acetoacético"), descritos na tabela "Constantes Físicas dos Compostos Orgânicos" páginas 3-12 a 3-523 do Índice Merck 74^a Edição, 1993. Os ácidos orgânicos dicarboxílicos são de interesse particular. Está dentro do escopo dessa invenção empregar mais
 20 de um ácido orgânico em combinação. Os sais são preparados em analogia ao procedimento apresentado no exemplo 1, adiante.

Tipicamente, a relação molar entre o ácido orgânico e o composto 1 é de cerca de 1:1.

Entretanto, a relação pode ser tão grande quanto 1 mol de com-

posto 1 para o número de grupos de ácido no caso de ácidos poliorgânicos, como, por exemplo, uma relação de 2:1 entre o composto 1 e o sal para um sal de ácido dicarboxílico. Todavia, a proporção é variável, variando de 1:1 ou menos, dependendo do enriquecimento da funcionalidade do ácido e de seu grau de substituição com funcionalidades ácidas.

As formulações apropriadas do composto 1, sejam elas para uso veterinário ou para uso em seres humanos, compreendem opcionalmente um ou mais transportadores aceitáveis. O(s) transportador(es) deve(m) ser "aceitáveis", no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e fisiologicamente inócuos para o paciente.

As formulações irão opcionalmente conter excipientes, tais como aqueles apresentados no "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Os excipientes incluem, opcionalmente, o ácido orgânico e outros antioxidantes, agentes quelantes, como o EDTA, carboidratos, tais como dextrina, manitol ou dextrose, tampões (por exemplo, citrato), sais de metais alcalinos, agentes de deslizamento, agentes de volume e outras substâncias convencionalmente encontradas em comprimidos, em cápsulas, em soluções ou em outras composições apropriadas ou destinadas para uso terapêutico. Tipicamente, as formulações não irão conter excipientes para comprimidos convencionais, visto que são habitualmente formuladas para uso parenteral. As formulações serão idealmente estéreis. Além disso, as preparações parenterais serão substancialmente isotônicas. O pH das formulações varia opcionalmente de cerca de 5 - 10, habitualmente de cerca de 6 - 9, tipicamente de cerca de 5 - 6.

As soluções parenterais (aquosas estéreis) dos sais de ácido orgânico do composto 1 compreendem opcionalmente uma quantidade estabilizadora de carboidrato, tipicamente um sacarídeo (mono, di ou polissacarídeos), glicosídeo ou álcool de açúcar (alditóis). Os polissacarídeos devem ser biodegradáveis com a sua injeção parenteral ou infusão e incluem dextrinas e amidos, tipicamente de 3 - 10 unidades. Os carboidratos representativos incluem hexoses, aldoses, aldo-hexoses, aldotrioses (por exemplo, gliceraldeído), aldotetroses (por exemplo, eritrose), aldopentoses (por

exemplo, arabinose), cetoses, ceto-hexoses (por exemplo, frutose), cetopentoses (por exemplo, ribulose), maltose, sacarose, lactose, ribose, xilose, lixose, alose, altrose, glicose, manose, gulose, idose, galactose e talose. De particular interesse são os carboidratos usados convencionalmente em formulações parenterais, como, por exemplo, manitol ou dextrose. O caráter óptico do carboidrato não é crítico, porém é desejável que, para a configuração, seja de tal modo que o carboidrato seja biodegradável após a sua administração parenteral. Por exemplo, a dextrose a 5% (por peso de solução; pH de cerca de 4,2, não tamponado) permite o armazenamento do succinato de composto 1 a 40°C durante 60 horas sem degradação significativa. Por outro lado, o armazenamento em soluções tamponadas em pH de 2, 7 e 9 sob as mesmas condições leva a uma degradação substancial do composto 1: Cerca de 100%, 18% e 76% por peso, respectivamente.

A quantidade estabilizante de carboidrato é variável e irá depender das condições esperadas de armazenamento e do prazo de validade desejado, da escolha do tampão, do pH, da quantidade de composto 1, e de outros fatores que irão ser apreciados por aquele versado na técnica. Em geral, serão usados cerca de 0,5% a 5% por peso de solução. Tipicamente, a quantidade ideal de carboidratos será determinada por experimentação de rotina, porém a quantidade geralmente não irá exceder (juntamente com os tampões, o cloreto de sódio e similares) uma quantidade que proporcione isotonicidade à solução. Entretanto, os concentrados hiperisotônicos são aceitáveis, quando se espera a diluição da composição parenteral antes ou durante a sua infusão. A solução parenteral é opcionalmente tamponada (tipicamente com tampão de citrato) em um pH de cerca de 4 a 6.

A presença de carboidrato estabiliza os sais do composto 1 em solução aquosa para armazenamento (incluindo tempo de administração) durante pelo menos cerca de 60 horas, até 1 semana, 1 mês ou 1 ano, ou qualquer período intermediário, dependendo dos fatores assinalados acima para a concentração de carboidrato, como, por exemplo, a temperatura de armazenamento e similares.

As composições terapêuticas são opcionalmente administradas

por vias parenterais (incluindo as vias subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural), visto que são as mais convenientes para o tratamento de neoplasias malignas. As infusões intravenosas constituem, em geral, o método de administração de escolha.

5 As formulações são apresentadas em recipientes de dose unitária ou múltiplas doses, como, por exemplo, ampolas, frascos ou bolsas de infusão flexíveis. Os recipientes serão opcionalmente de vidro ou de plástico rígido, porém tipicamente serão recipientes semi-rígidos ou flexíveis fabricados com poliolefinas (polietileno) ou polivinilcloreto plastificado. O recipiente
10 é tipicamente de uma única câmara. Esses recipientes apresentam pelo menos um orifício estéril integral para facilitar a entrada estéril de um dispositivo no recipiente para ter acesso ao conteúdo (habitualmente seringas ou uma agulha de equipo intravenoso). O orifício proporciona um acesso estéril para a solução solubilizante (se necessária) e saída da solução parenteral. Uma
15 sobrebolsa (habitualmente de poliolefina) é opcionalmente fornecida para recipiente.

 A formulação está presente no recipiente na forma de uma solução ou em forma seca. Se for armazenada em uma forma substancialmente anidra, por exemplo, liofilizada, a formulação irá apenas necessitar da adição
20 do transportador líquido estéril, como, por exemplo, água, para injeção, imediatamente antes do uso. As soluções incluem agentes de estabilização de tonicidade, como cloreto de sódio ou um açúcar, tais como manitol ou dextrose. Uma vantagem inesperada do carboidrato ou açúcar é um aumento na estabilidade do sal do composto 1 em soluções aquosas armazenadas. Os
25 recipientes são preenchidos com solução estéril ou são preenchidos e, a seguir, esterilizados, por exemplo, pelo calor ou por agentes químicos, de acordo com processos conhecidos. Em geral, uma solução estéril da formulação é colocada esterilizada em um recipiente flexível e, depois disso, opcionalmente liofilizada. A tecnologia apropriada para a produção dos produtos do recipiente dessa invenção é encontrada em Avis et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications vols. 1 e 3 (1984).
30

Os recipientes parenterais irão conter uma dose diária ou uma

subdose diária unitária do composto 1, de modo descrito abaixo, ou uma fração apropriada da mesma.

O composto 1, os sais de ácido orgânico do Composto 1, ou soluções aquosas dos mesmos estabilizadas com carboidrato, são opcionalmente empregados para o tratamento de qualquer neoplasia, incluindo não apenas neoplasias malignas hematológicas, mas também tumores sólidos de todos os tipos, como, por exemplo, câncer da cabeça e pescoço, de pulmão, rim, fígado, osso, cérebro e outros, particularmente câncer e displasia uterinas e cervicais, melanoma, e cânceres de mama, de cólon, de próstata, pulmonares (de células pequenas e de células não-pequenas) e do pâncreas.

As formulações dessa invenção são administradas na forma de monoterapia ou em associação com outros agentes para o tratamento de neoplasias malignas hematológicas. A formulação dessa invenção é opcionalmente administrada ao paciente substancialmente ao mesmo tempo que outro(s) agente(s) antineoplásico(s), ou o(s) agente(s) são combinados com a formulação dessa invenção e, a seguir, administrados simultaneamente ao paciente. Os agentes antineoplásicos típicos úteis com o composto 1 (seja combinados com ele em quantidades terapeuticamente eficazes ou administrados concomitantemente) incluem qualquer um dos agentes terapêuticos atualmente empregados no tratamento de neoplasias malignas, incluindo aqueles usados para neoplasias malignas hematológicas que são mencionados acima, nas considerações básicas. Esses agentes associados são administrados (a) substancialmente ao mesmo tempo, porém por diferentes vias de administração, (b) são combinados com a formulação dessa invenção e administrados concomitantemente, ou (c) são administrados em períodos alternativos (por exemplo, durante um período de repouso do tratamento com o composto 1). Em geral, In general, se for usada em combinação, a formulação dessa invenção é terapeuticamente combinada com outro agente antineoplásico selecionado a partir de uma classe distinta, como, por exemplo, um anticorpo monoclonal.

O tratamento do LNH inclui tipicamente a ciclofosfamida, a do-

xorrubicina, a vincristina, a prednisona e o rituximabe. Quando usado em combinação, o Composto 1, é administrado em um ciclo de terapia juntamente com, ou na forma de reposição de, um ou mais dos agentes precedentes. O Composto 1 também pode ser administrado em combinação com o rituximabe. Para a terapia da LLC, administrar o Composto 1 na forma de monoterapia ou em associação com outros agentes, tais como ciclofosfamida e/ou rituximabe. Outros agentes terapêuticos apropriados para uso com o composto 1 incluem etoposídeo, melfalano, nitrosuréia, bussulfano, complexos de platina, agentes alquilantes não-clássicos, tais como procarbazina, antimetabólitos tais como folato, purinas, análogos da adenosina, análogos da pirimidina, alcalóides da vinca, e similares.

Com base em observações sobre a toxicologia de uma dose única em cães, é razoável assumir que uma dose do composto 1 entre 1 mg/kg/dia e 3 mg/kg ou mais, até cerca de 10 mg/kg por dia, seria eficaz em cães (com o uso de um sal de ácido orgânico do composto 1, a dose seria ajustada para levar em conta o peso adicional do sal). Pressupondo que o perfil de PK do composto nos seres humanos seja semelhante àqueles observado em cães, os achados até o momento sugerem que uma dose eficaz do composto 1 (corrigida para a área de superfície por um fator de 0,54) entre 0,54 mg/kg por via IV e 1,62 mg/kg por via IV ou mais, administrada em dose única, com dose repetida a intervalos de aproximadamente 1 a 14 dias, em geral, semanalmente ou a cada 2 semanas, tipicamente semanalmente para 2 doses, dependendo da condição do paciente e da tolerância à infusão, entre outros fatores. Como se deve esperar uma considerável variação nas doses apropriadas, devido à natureza singular de cada câncer individual, à condição do paciente, à tolerância do paciente e outras questões conhecidas do oncologista, a faixa de doses eficazes será maior do que o modelo experimental central. Por conseguinte, espera-se que uma faixa de doses de cerca de 0,5 a 5,4 mg/kg/dia seja apropriada. Uma dose única é apropriada, porém são antecipados múltiplos ciclos de doses como típicos, com um período de repouso de cerca de 10-30, habitualmente 23 dias entre os ciclos, dependendo, novamente, da condição do paciente e da tolerância ao agente

terapêutico, como será aparente para aquele normalmente versado na técnica.

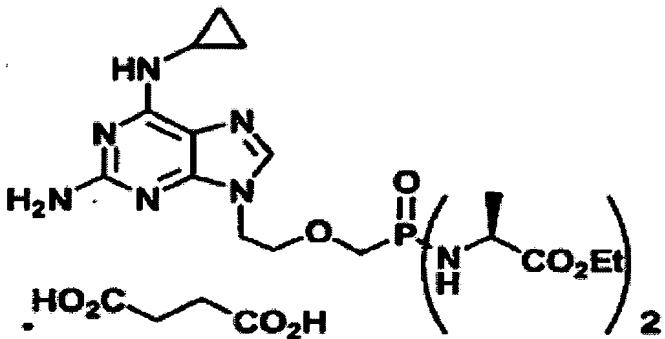
A literatura AU e as citações de patentes acima são aqui expressamente incorporadas por referência. A invenção tem sido descrita com detalhes suficientes para permitir que aquele normalmente versado na técnica faça e utilize o assunto das seguintes reivindicações. Os exemplos que se seguem exemplificam a presente invenção, e não devem ser inferidos para limitar a presente invenção.

Exemplo 1

Uma mistura de cPrPMEDAP (1,64 g, 5 mmol), Ala-etil éster HCl (4,62 g 30 mmol) e TEA (8,36 mL, 60 mmol) foi tratada com 10 mL de piridina anidra e aquecida a 60°C para atingir uma solução homogênea. Foi adicionada uma solução de Aldritol-2 (7,78 g, 35 mmol) e trifenilfosfina (9,18 g, 35 mmol) em 10 mL de piridina anidra. A mistura resultante foi aquecida a 60°C durante a noite. Após resfriamento, a solução de cor amarelo brilhante foi despejada em bicarbonato de sódio aquoso saturados e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com salmoura, em seguida secada em sulfato de sódio. Após a remoção do solvente, o resíduo bruto foi purificado por cromatografia instantânea usando 100% de acetato de etila, em seguida deslocada por 10-15% de MeOH/DCM para eluir o produto desejado (1,12 g, rendimento de 43%).

Formação do sal succinato:

O pró-fármaco neutro (2,60 g) foi dissolvido em uma solução de ácido succínico (583 mg) em etanol (15 mL). Após a adição de 50% por v/v de n- heptano/etanol (20 mL), o sal desejado foi isolado por filtração (2,26 g; M.P. 130°C).

Estrutura Química	
Fórmula Molecular	$C_{21}H_{35}N_8O_6P \cdot C_4H_6O_4$
Peso Molecular	526,53
Peso da Fórmula	644,61
Aparência Física	Pó Branco
Ponto de Fusão	130°C
Solubilidade	>39 mg/ml (pH 4,2 – 4,7)

Exemplo 2

A Tabela 1 mostra a EC_{50} de antiproliferação do composto 1 e de seus metabólitos, cpr-PMEDAP (9-(2-fosfonilmetoxietil)-N*-ciclopropil 1-2,6-diaminopurina), PMEG (9-(2-fosfonilmetoxietil) guanina), E PMEDAP (9-(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina). Uma variedade de compostos usados para o tratamento de neoplasias malignas hematológicas também foram testados, incluindo um inibidor da DNA polimerase (ara-C), inibidores da DNA polimerase/ribonucleotídeo redutase (cladribina, clofarabina, fludarabina, gencitabina), um inibidor da adenosina desaminase (desoxicoformicina), um inibidor da metilação do DNA (decitabina), um alquilante do DNA (doxorubicina), e um inibidor da mitose (vincristina). Os compostos AU, à exceção da doxorubicina e da vincristina, são análogos de nucleosídeos; a ara-C, a gencitabina, e a decitabina são análogos da citosina, e o restante consiste em análogos da adenosina. A cpr-PMEDAP e a PMEG podem ser consideradas, respectivamente, análogos da adenosina e da guanosina. Os compostos foram testados usando linfoblastos humanos e caninos (estimulados com um mitógeno de células T, a fitoemaglutinina (PHA), ou um mitógeno de células B, o mitógeno da erva-dos-cancros (pokeweed) (PWM)), duas linhagens de células linfóides T derivadas de pacientes com leucemia linfocítica

aguda (CEM e Molt- 4), duas linhagens de células mielóides derivadas de pacientes com leucemia mielógena aguda (KG-I e HL-60), duas linhagens de células linfóides B derivadas do linfoma de Burkitt (Daudi e Raji), uma linhagem de células linfóides B do linfoma não-Hodgkin (RL), uma linhagem de células linfóides T do linfoma T cutâneo (PM-I), e uma linhagem de células monocíticas do linfoma histiocítico (U937).

O composto 1 exibiu atividade antiproliferativa em uma variedade de linfoblastos e linhagens celulares de leucemia/linfoma. A faixa de EC_{50} foi entre 27 e 1043 nM, semelhante àsquelas da clofarabina (25 - 418 nM) e ara-C (23 - 1820 nM), dois análogos de nucleosídeos comumente usados no tratamento de neoplasias malignas hematológicas. Entre outros nucleosídeos, a gencitabina foi o mais potente (3,4 - 18 nM), enquanto a desoxicoformicina foi a menos potente (> 200.000 nM). Entre todos os compostos, a vincristina (0,6 – 5,3 nM) foi a que exibiu maior potência. Não houve diferença significativa na atividade do composto 1 em células humanas e caninas. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre blastos com PHA (predominantemente células T) e blastos com PWM (predominantemente células B) ou entre linhagens de células linfóides T e células linfóides B. Por conseguinte, ao contrário de outro análogo da guanossina, a nelarabina, que é apenas eficaz contra linfomas de células T, o composto 1 pode ser eficaz nos linfomas tanto de células T quanto de células B

Na maioria dos tipos celulares testados, a cpr-PMEDAP, que é o produto hidrolisado do composto 1, foi significativamente menos potente do que o composto 1, sugerindo que o pró-fármaco fosforamidato intensificou a entrada do fármaco nas células, e que o componente pró-fármaco foi clivado no interior das células. A PMEG, o produto desaminado da cpr-PMEDAP, foi significativamente mais potente do que produto desalquilado PMEDAP, compatível com a hipótese de que a molécula ativa para a atividade antiproliferativa do composto 1 é PMEGpp.

Tabela 1: EC_{50} (nM) para Antiproliferação em Linfoblastos Humanos, Linfoblastos Caninos e Linhagens Celulares Humanas Derivadas de Pacientes com Leucemia /Linfoma

	PHA-blast (Células-T Humanas)	PWM-blast (Células-B Humano)	PHA-blast (Células-T Eaninas)	PWM-blast (Células-B eaninas)	CEM (Linfóide-T)	Molt 4 (Linfóide-T)	KG-1 (Mielóide)
Composto 1	135	42	30	14	156	27,3	1043
GS-8369 (cpr-PMEDAP)	2348	N.D.	N.D.	N.D.	2217	1473	1109
PMEG	1679	N.D.	N.D.	N.D.	5195	1739	2928
PMEDAP	8953	N.D.	N.D.	N.D.	19874	27896	7633
Ara-C (citarabina)	1820	N.D.	N.D.	N.D.	143	23	56
Gencitabina	9,6	N.D.	N.D.	N.D.	21	8,5	5,7
Clofarabina	62	126	146	93	418	25	60
Cladribina	296	N.D.	N.D.	N.D.	1167	74	89
Fludarabina Desfosfatada	1102	N.D.	N.D.	N.D.	> 40,000	1550	4518
Deoxi coformicina (pentostasina)	> 200,000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	> 200,000	> 200,000
Decitabina	204	N.D.	N.D.	N.D.	3004	580	83
Dexorubicina	7,6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,2	28
Vincristina	2,4	0,9	0,9	0,9*	2	0,4	3,2

	HL-60 (miclóide)	RL (B-linfoide)	Daudi (B-linfoide)	Raji (B-linfoide)	PM-1 (T-linfoide)	U937 (monocítico)
Composto 1	214	78	27	89*	125	394
GS-8369 (cpr-PMEDAP)	1608	N.D.	1838	N.D.	6725	4478
PMEG	3918	N.D.	994	2724	4022	4009
PMEDAP	21667	N.D.	14045	24899	22732	24445
Ara-C (citarabina)	212	610	209	23	194	38
Gencitabina	8,6	18	6	3,4	16	31
Clofarabina	73	49,5	221	19,4	145	37
Cladribina	50*	4	525	12	40	20
Fludarabina desfosfatada	1768	N.D.	N.D.	N.D.	12857	300
Deoxi Cofornicina (pentostasin)	< 200,00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	< 200,000
Decitabine	3831	N.D.	N.D.	N.D.	< 20,000	77
Doxorrubicina	24	25	3,8	8,6	29,5	13
Vincristina	2	1,4	0,6	2,5	5,3	2,8

Os linfoblastos estimulados por PHA foram gerados pela incubação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com o mitógeno de células T PHA, (1 µg/mL) durante 3 dias, seguida de incubação com 10 U/mL de interleucina-2 por 4 dias. Os linfoblastos estimulados por PWM foram gerados pela incubação de células B (purificadas de PBMC usando esferas magnéticas conjugadas com CD19) com PWM (20 µg/mL), durante 7 dias.

Os linfoblastos (150.000 células por cavidade de microtítulo) e as linhagens celulares de leucemia/linfoma (30.000 células por cavidade) foram incubados com diluições 5 vezes seriadas de compostos durante 3 dias. O ensaio para BrdU foi realizado da seguinte maneira: Os linfoblastos foram incubados com diluições 5 seriadas de compostos em placas de microtítulo (150.000 células por cavidade) durante 3 dias. No Dia 3, as células foram marcadas com 10 µM de BrdU durante 3 horas, e a quantidade de BrdU incorporada no DNA celular foi quantificada pelo ensaio Imunoabsorvente ligado a Enzima 5 (ELISA). Alternativamente, as células foram incubadas com 1 mg/mL de reagente XTT (ácido sódico 3,3'-[[[fenilamino) carbonil]-3,4- tetrazólio]-bis(4-metoxi-6-nitro) benzeno sulfônico hidratado) e 1% de PMS (metossulfato de fenazina) durante 2 horas, e a mudança de cor (a desidrogenase mitocondrial reduz o reagente XTT de cor amarela em sal de formazana de cor laranja) foi quantificada. Os dados experimentais foram usados para gerar curvas de dose-resposta sigmoidais, e os valores de concentração eficaz de 50% (EC₅₀) foram calculados usando o software GraphPad Prism versão 4,00 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA). Os ensaios foram repetidos 2 - 20 vezes, até o erro padrão da média (SEM) se tornar menos de 50 % do valor médio.

Na maioria dos casos, os ensaios foram repetidos 2- 20 vezes até o SEM se tornar menor do que 50% do valor médio.

* Dados variáveis (SEM > 0,5 EC₅₀ média). N.D; não efetuado.

30 Exemplo 3

Distribuição de Pró-Fármacos Entre PBMC e o Plasma em Cães

Foram administrados a cães vários pró-fármacos de cpr-

PMEDAP, na forma de infusões de 0,2 mg/kg por via IV durante 30 minutos. Os pró-fármacos 1-4 foram monoamidatos (o fósforo também foi substituído com fenoxi), enquanto os últimos dois 25 compostos eram bis(amidatos). Os compostos A e B foram enantiômeros substancialmente isolados no centro quiral do átomo de fósforo, enquanto o monoAlatBU foi o racemato nesse sítio. A alanina foi o L isômero.

- Uma amostra de sangue foi colhida em EDTA potássio e separada por centrifugação. As células mononucleares sangüíneas primárias (PBMC) foram coletadas utilizando tubos CPT (citrato de sódio).

- Para análise, as amostras de plasma foram precipitadas pela adição de 100 µL de acetonitrila contendo padrões internos (D4AP e TDF) a 100 µL de plasma para análise dos pró-fármacos. Após precipitação das proteínas por centrifugação, 100 µL foram transferidos em outro tubo para secagem e, a seguir, foram reconstituídos em 100 µL de água com 0,2% de ácido fórmico.

Uma alíquota de 20 µL foi injetada na coluna para análise LC/MS/MS. A análise foi efetuada usando uma coluna Synergi Fusion-RP 8OA de 150 x 2,0 mm, 4 µm (Phenomenex) e um gradiente linear de múltiplo estágio de 0,5 a 99% de acetonitrila na presença de 0,2% de ácido fórmico, em 0,25 mL/min. Os analitos foram detectados usando um espectômetro de massa Sciex API-4000, utilizando ionização por electrospray em modo MRM positivo. As amostras foram analisadas para GS-327260, -8369, -0573, e -0438.

- As amostras de PBMC foram lisadas em 70% de MeOH. Alíquotas separadas de células de cada ponto de tempo re-suspensas em 100% de soro foram usadas para estabelecer as quantidades de células em cada amostra.

As amostras de células foram normalizadas para 15×10^6 células por amostra. Foram observados graus variáveis de hemólise. O material celular extraído contendo 70% de MeOH foi dividido de duas maneiras para análises diretas e desfosforilação e secados separadamente.

- Após secagem, as amostras para análises diretas foram re-suspensas em 20% de acetonitrila contendo padrões internos (TDF e D4AP) e analisadas para GS-327260, -8369. Foram injetados 20 µL para análise LC/MS/MS usando uma coluna Synergi Hydro-RP 8OA de 50 x 2,0 mm, 4 µm (Phenome-

nex) e um gradiente linear de múltiplo estágio de 0 a 95% de acetonitrila na presença de 0,2% de ácido fórmico em 1,0 mL/min. Os analitos foram detectados usando um espectômetro de massa Sciex API-4000 utilizando a ionização por electrospray em modo MRM positivo.

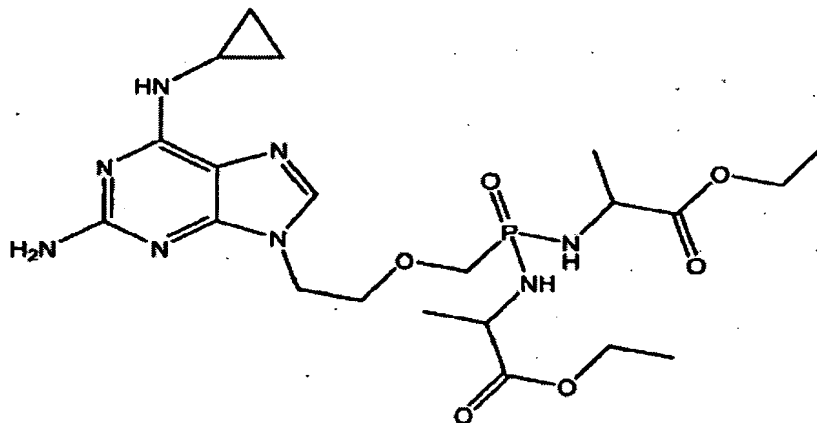
- 5 Após secagem, as amostras para desfosforilação foram tratadas com 1 U de fosfatase intestinal de bezerro (fosfatase alcalina, Sigma) durante 2 horas em tampão fornecido pelo fabricante. A seguir, as amostras foram ajustadas para 60% de acetonitrila, secadas e re-suspensas em 60% de acetonitrila contendo padrões internos (TDF e D4AP) e analisadas para cpr-PMEDAP conforme descrito para análise direta de PBMC.
- 10

Tabela: Comparação da Exposição de Plasma e PBMC ao cpr-PMEDAP (CPMEDAP) seguindo a administração de pró-fármaco ao cachorro Beagle por 30 minutos de infusão intravenosa.

Composto N°	Pró-fármaco	Plasma CPMEDAP AUC ₀₋₂₄ (nM hr)	PBMC CPMEDAP AUC ₀₋₂₄ (nM hr)	Razão de PBMC no Plasma
1	MonoAlaiPr	538 ± 181	9,170 ± 450	17
2	MonoAlatBu	144 ± 77	1,790 ± 468	12
3	MonoAlatBu(A)	78 ± 34	1,453 ± 1412	19
4	MonoAlatBu(B)	BLOQ ^a	ND ^b	N.D.
5	BisAlaiPr	4,470 ± 2,040	5,380 ± 1,320	1,2
CPMEDAP	BisAlaEth	59 ± 38	7,550 ± 3,450	130
^a BLOQ = Abaixo do limite inferior de quantificação. Para o CPMEDAP no plasma este valor foi de DONM ^b ND = Não determinado. Amostras de PBMC não coletadas para administração do composto 4.				

REIVINDICAÇÕES

1. Sal de ácido orgânico do composto



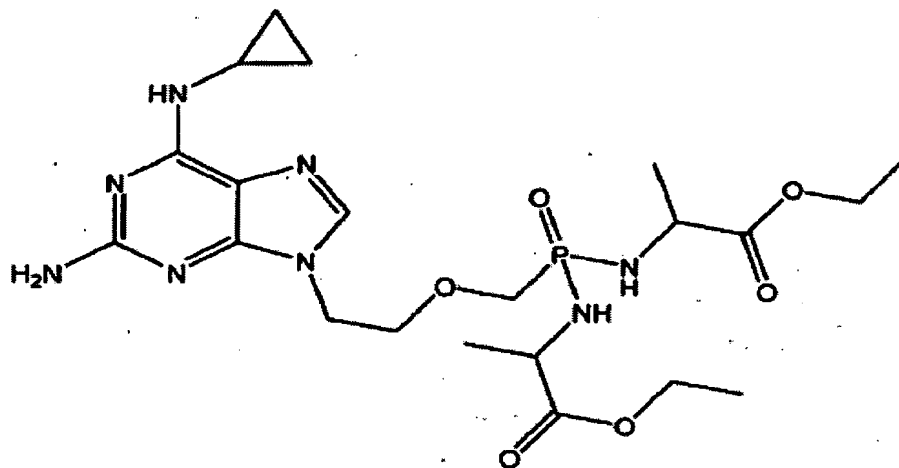
e/ou seus tautômeros and solvatos.

2. Sal da reivindicação 1, em que o ácido orgânico é o ácido succínico.

3. Solução aquosa estéril compreendendo o sal da reivindicação 1 e um carboidrato.

4. Método compreendendo a administração a um paciente com neoplasia de uma dose terapêutica eficaz do sal da reivindicação 1.

5. Combinação compreendendo (a) um recipiente apropriado para o produto farmacêutico por via parenteral e disposto nesse particular (b) uma dose terapeuticamente eficaz do composto



e/ou de seus sais, tautômeros e solvatos.

6. Combinação da reivindicação 5 em que o composto está em uma solução aquosa substancialmente isotônica.

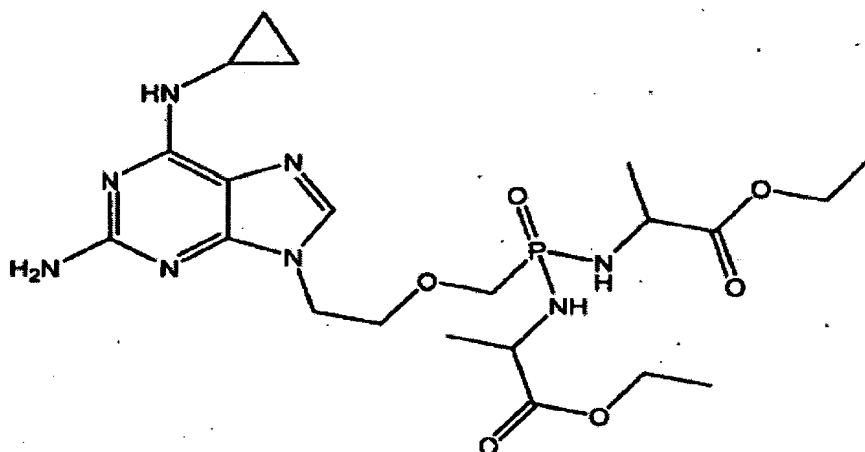
7. Combinação da reivindicação 5 em que o composto é um sal com pelo menos um ácido orgânico.

8. Combinação da reivindicação 7 em que o ácido orgânico é o ácido succínico.

5 9. Combinação da reivindicação 5 em que o recipiente compreende um orifício estéril.

10. Combinação da reivindicação 5 em que o recipiente é um frasco ou uma bolsa flexível.

11. Método para o tratamento de um paciente que apresenta uma neoplasia maligna hematológica, compreendo a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto



e/ou de seus sais, tautômeros e solvatos.

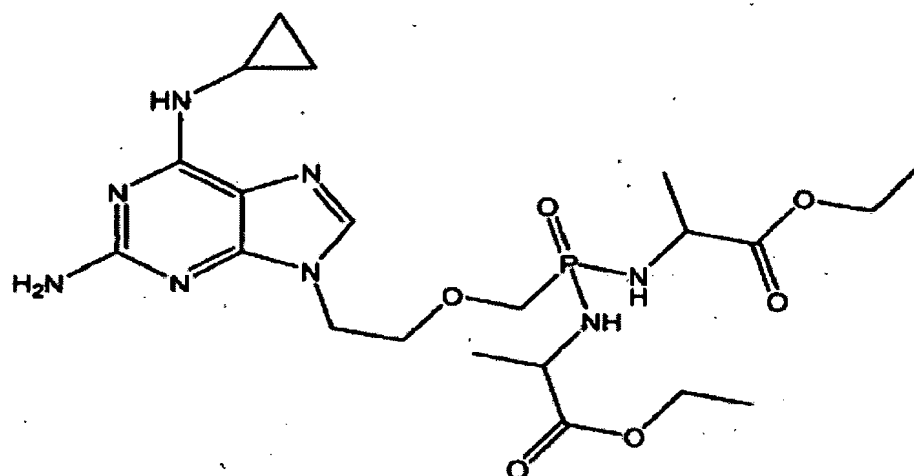
12. Método da reivindicação 11 em que a neoplasia maligna hematológica é o mieloma múltiplo ou a síndrome mielodisplásica.

15 13. Método da reivindicação 11 em que a neoplasia maligna hematológica é uma leucemia ou linfoma.

14. Método da reivindicação 11 em que um sal de ácido orgânico do composto é administrado.

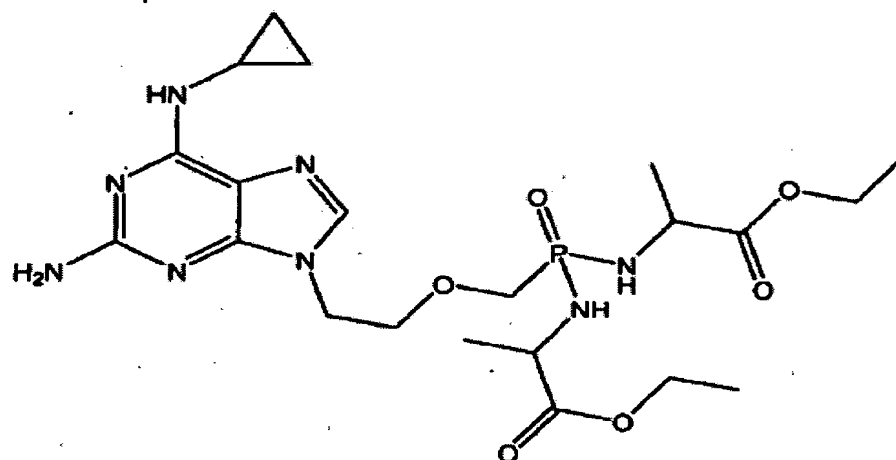
20 15. Método da reivindicação 11 em que o composto é administrado por via parenteral.

16. Composto compreendendo o composto



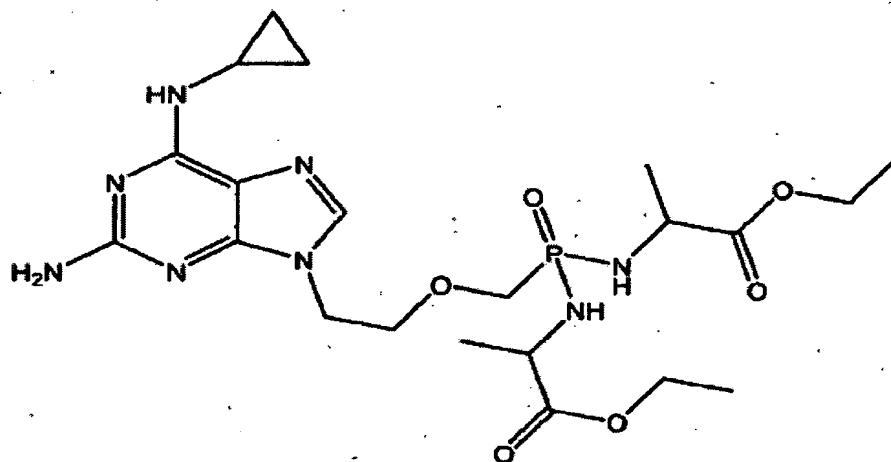
e/ou seus sais, tautômeros e solvatos, e pelo menos outro agente útil para o tratamento de uma neoplasia maligna hematológica.

17. Método compreendendo a preparação de um sal de ácido orgânico do composto



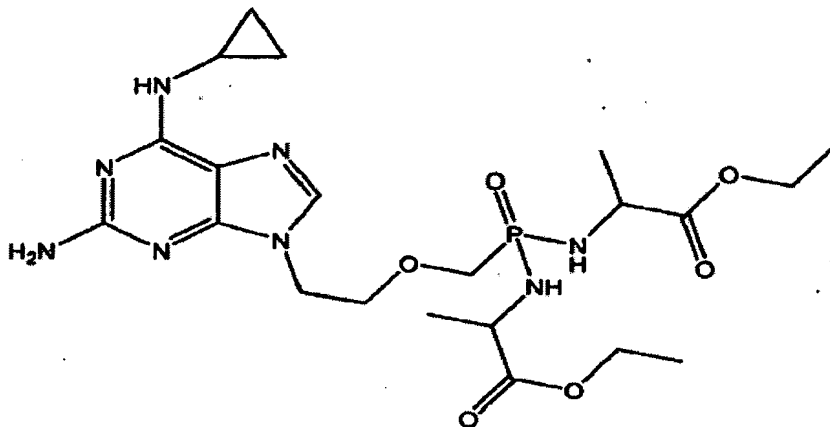
5 e um carboidrato em uma solução aquosa estéril, e o armazenamento de dita solução por um período excedendo cerca de 1 hora.

18. Composição embalada compreendendo uma solução aquosa estéril de (a) um carboidrato e (b) um sal de ácido orgânico do composto



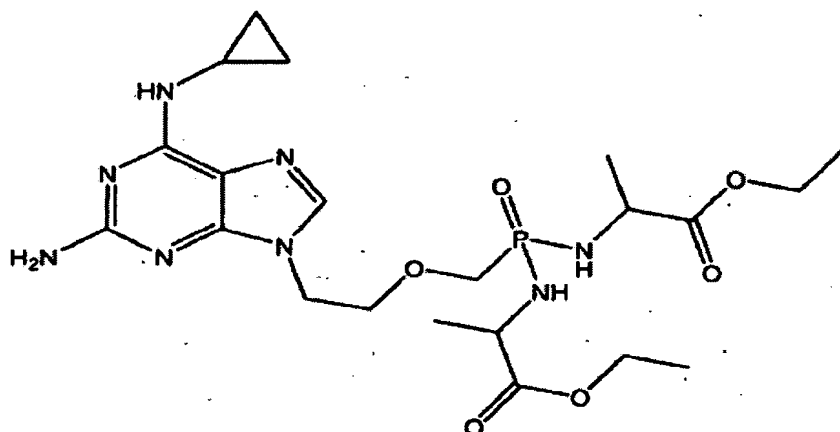
e/ou seus tautômeros e solvatos, juntamente com a descrição de que a solução é opcionalmente armazenada por um período de mais de cerca de 1 hora.

19. Kit compreendendo (a) um recipiente apropriado para um produto farmacêutico por via parenteral, (b) uma dose terapeuticamente eficaz do composto



e/ou seus sais, tautômeros e solvatos; e (c) instruções para o uso do composto e do recipiente.

20. Uso de um composto tendo a estrutura



e/ou seus sais, tautômeros e solvatos, na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma neoplasia maligna hematológica.

21. Composto ou método conforme descrito aqui.

RESUMO

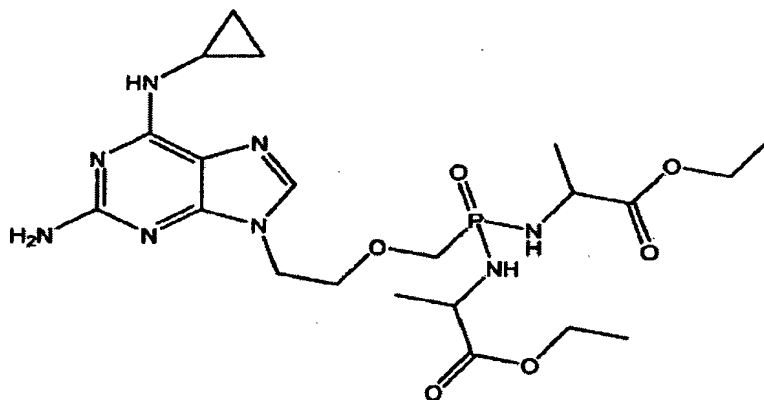
Patente de Invenção "MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS".

Um composto de fórmula (1) e/ou seus sais, tautômeros e solvatos é usado para tratar neoplasias malignas hematológicas. Em uma modalidade, um sal de ácido orgânico do composto 1 é provido para uso geral no tratamento de neoplasmas, e em uma modalidade adicional o sal é estabilizado com carboidrato.

Novo quadro reivindicatório (total de 20 reivindicações), incorporando as emendas às reivindicações, conforme relatório exame preliminar.

REIVINDICAÇÕES

1. Sal de ácido orgânico do composto e/ou seus tautômeros e solvatos.



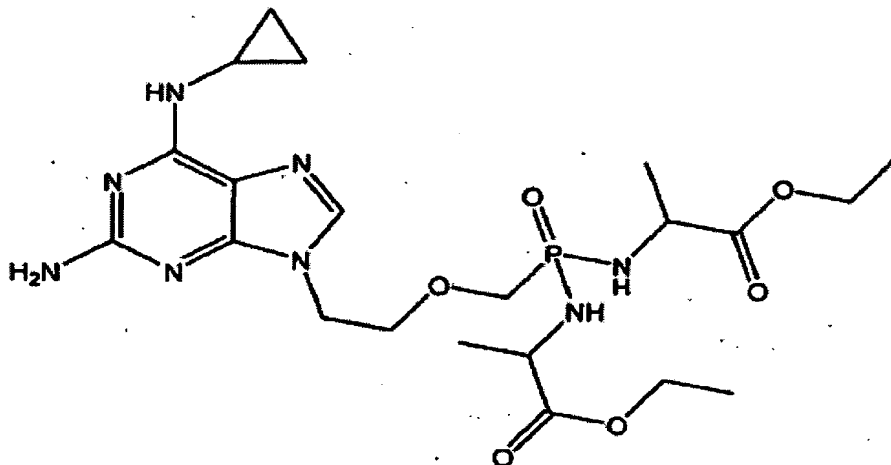
e/ou seus tautômeros e solvatos

5 2. Sal da reivindicação 1, em que o ácido orgânico é o ácido succínico.

3. Solução aquosa estéril compreendendo o sal da reivindicação 1 e um carboidrato.

10 4. Método compreendendo a administração a um paciente com neoplasia de uma dose terapêutica eficaz do sal da reivindicação 1.

5. Combinação compreendendo (a) um recipiente apropriado para um produto farmacêutico por via parenteral e disposto nesse particular (b) uma dose terapeuticamente eficaz de um sal com pelo menos um ácido orgânico do composto.



15 e/ou de seus sais, tautômeros e solvatos.

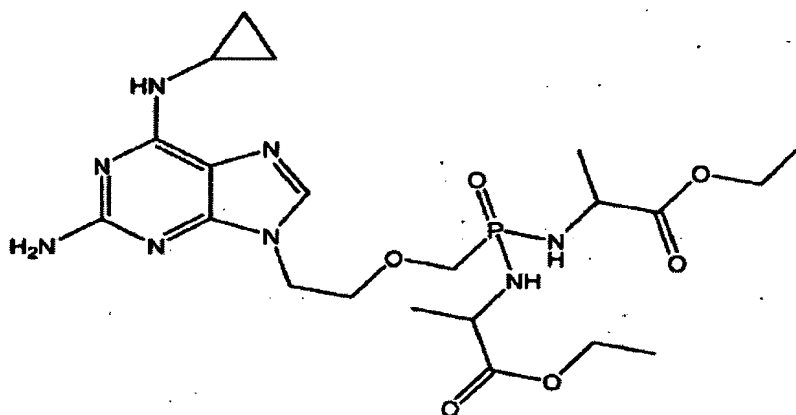
6. Combinação da reivindicação 5 em que o composto está em uma solução aquosa substancialmente isotônica.

7. Combinação da reivindicação 5 em que o ácido orgânico é um ácido succínico.

5 8. Combinação da reivindicação 5 em que o recipiente compreende uma parte estéril.

9. Combinação da reivindicação 5 em que o recipiente é um frasco ou bolsa flexível.

10 10. Método para o tratamento de um paciente que apresenta uma neoplasia maligna hematológica, compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto



e/ou de seus sais, tautômeros e solvatos.

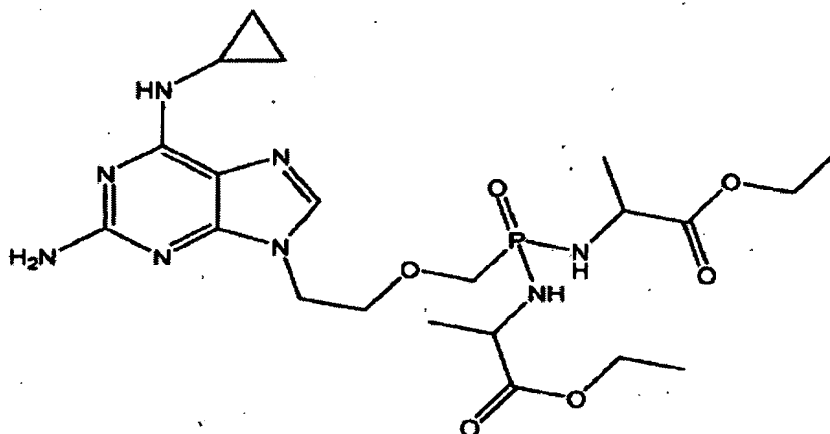
11. Método da reivindicação 11 em que a neoplasia maligna hematológica é o mieloma múltiplo ou a síndrome mielodisplásica.

15 12. Método da reivindicação 11 em que a neoplasia maligna hematológica é uma leucemia ou linfoma.

13. Método da reivindicação 11 em que um sal de ácido orgânico do composto é administrado.

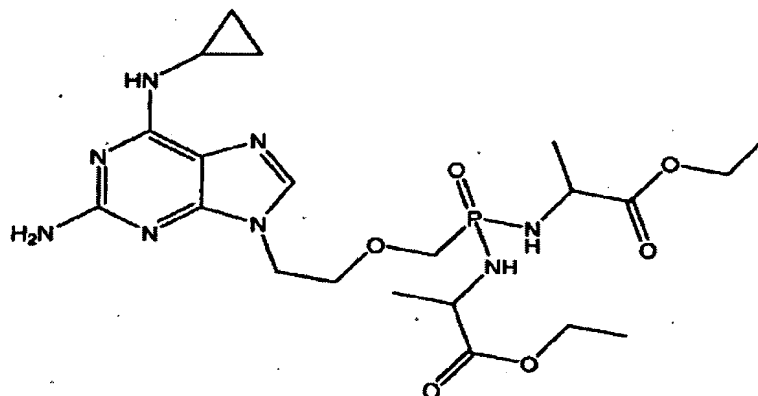
20 14. Método da reivindicação 11 em que o composto é administrado por via parenteral.

15. Composição compreendendo o composto



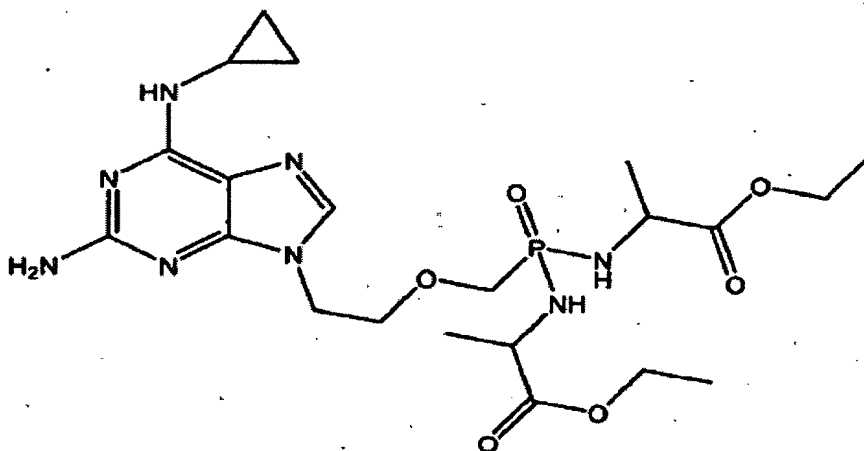
e/ou seus sais, tautômeros e solvatos, e pelo menos um outro agente útil para o tratamento da neoplasia maligna hematológica.

16. Método compreendendo preparar um sal de ácido orgânico do composto



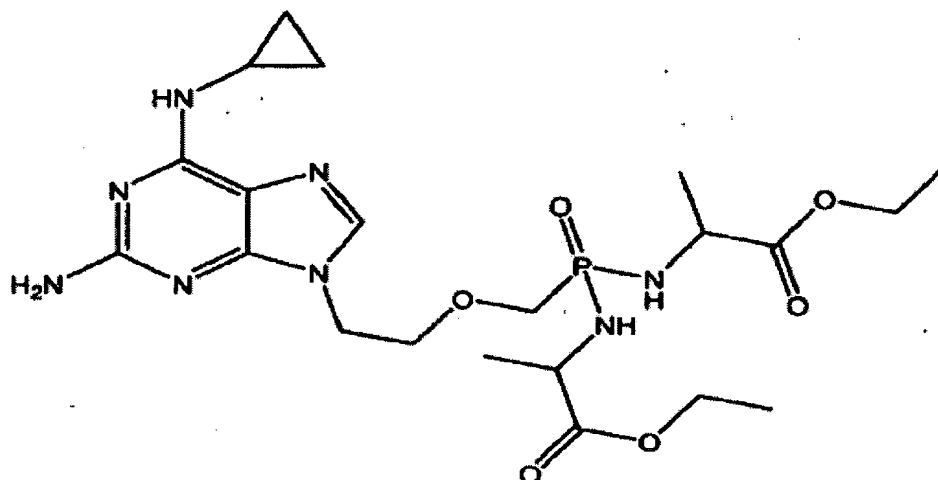
5 e um carboxidrato em uma solução aquosa estéril, e armazenar a dita solução por um período excedendo cerca de 1 hora.

17. Composição embalada compreendendo uma solução aquosa estéril de (a) um carboidrato e (b) um sal de ácido orgânico do composto



e/ou seus tautômeros e solvatos, junto com a descrição de que a solução opcionalmente é armazenada por um período superior a cerca de 1 hora.

18. Uso de um composto tendo a estrutura



5 e/ou seus sais, tautômeros e solvatos, na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma neoplasia maligna hematológica.

19. Uso de um sal de ácido orgânico como descrito na reivindicação 1 para tratar um neoplasma.

20. Uso de um sal de ácido orgânico como descrito na reivindicação 1 para tratar uma neoplasia maligna hematológica.