



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0515533-9 B1



(22) Data do Depósito: 20/09/2005

(45) Data de Concessão: 08/12/2020

(54) Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ESTÁVEL PARA INIBIR UROCINASE

(51) Int.Cl.: A61K 47/10; A61K 47/12; A61K 31/495; A61K 31/18.

(30) Prioridade Unionista: 21/09/2004 DE 10 2004 045 720.4.

(73) Titular(es): WILEX AG.

(72) Inventor(es): WOLFGANG SCHMALIX; MARKUS BÜRGLE; KLAUS KOCH.

(86) Pedido PCT: PCT EP2005010143 de 20/09/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/032461 de 30/03/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/03/2007

(57) Resumo: FORMA DE DOSAGEM ESTÁVEL DE DERIVADOS DE FENILALANINA. A presente refere-se às formulações farmacêuticas aperfeiçoadas e estáveis de derivados de fenilalanina e ao uso das mesmas como inibidores da urocinase, particularmente para o tratamento de tumores malignos e metástases tumorais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ESTÁVEL PARA INIBIR UROCINASE"**.

[0001] A presente invenção se refere a formulações farmacêuticas aperfeiçoadas e estáveis de derivados de fenilalanina e ao seu uso como inibidores de urocinase, em particular para o tratamento de tumores malignos e metástases tumorais.

[0002] A capacidade dos tumores sólidos em propagar e metastatizar no tecido circundante se correlaciona com a degradação ou modificação da matriz extracelular (estroma do tumor) nas adjacências da célula tumoral com sua capacidade de penetrar na membrana basal. Embora as interconexões biológicas (patológicas) não tenham sido ainda definitivamente esclarecidas, o ativador da urocinase plasminogênio (uPA) e o receptor de urocinase (uPAR) desempenham um papel central. O uPA media a clivagem proteolítica do plasminogênio para a plasmina. Por sua vez, a plasmina é uma protease com um espectro amplo de ação que é capaz de diretamente destruir os componentes da matriz extracelular tais como fibrina, fibronectina, laminina e o esqueleto da proteína dos proteoglicanos. A plasmina é além do mais capaz de ativar as metaloproteases "latentes" e a proenzima inativa de uPA, pro-uPA.

[0003] As células tumorais e células não malignas do estroma de tumor sintetizam e secretam a proenzima enzimaticamente inativa pro-uPA. As proteases, tais como, por exemplo, plasmina ou catepsina B e L, clivam o pro-uPA mediante a proteólise limitada para produzir a serina protease ativa HMW-uPA (HMW = peso molecular elevado). O pro-uPA e a protease ativa HMW-uPA se ligam ao receptor da superfície celular uPAR (CD87). Plasmin(ôgenio) da mesma maneira se liga aos receptores específicos sobre a membrana plasmática da célula tumoral, desse modo focalizando e amplificando a ativação do plasminogênio nas adjacências imediatas da célula tumoral. As células inva-

sivas são assim capazes de destruir a matriz extracelular sem remover pela proteólise do suporte que requerem para o movimento direto.

[0004] Foi possível demonstrar em vários estudos biológicos celulares que o sistema ativador de plasminogênio associado com a célula é de particular importância dentro dos caminhos de reação semelhantes a cascata de sistemas de proteólise associados com o tumor (Wilhelm et al., The urokinase/urokinase receptor system: A. new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H., Kindermann G. (eds.): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier (1994) pp. 145-156). Foi observado nas culturas de células de carcinoma do cólon humano que sua capacidade em migrar através de uma matriz extracelular depende do grau a qual os receptores de uPA são saturados com uPA ativo (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991) 3690-3695). Mais uma vez em um modelo de cultura celular, uma redução no potencial invasivo das células foi observada se a atividade proteolítica de uPA tiver sido inibida por PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 6939-6943) ou PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990) 4676-4684). Um efeito comparável foi obtido sobre a inibição de uPA que se liga à superfície celular mediante o bloqueio do receptor por meio das variantes de uPA proteoliticamente inativas (Cohen et al., Blood 78 (1991) 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993) 537-544). As células de carcinoma epidermoidais de transfecção com um plasmídeo que expressa um transcrito anti-sentido contra parte de uPAR também levam, pela supressão da síntese de uPAR, a uma redução na invasividade destas células (Kook, EMBO J. 13 (1994) 3983-3991). Os anticorpos direcionados contra uPA e PAI-1 reduziram o potencial invasivo das células de câncer do pulmão *in vitro* (Liu et al., Intermediários. J. Câncer 60 (1995) 501-506).

[0005] Foi possível demonstrar a influência do sistema ativador de

plasminogênio no processo de metastatização em modelos animais de tumor. Por exemplo, a formação de metástase do pulmão em embriões de galinha foi quase completamente inibida pela adição de anticorpos contra o uPA (Ossowski and Reich, Cell 35 (1983) 611-619). As células de carcinoma humanas formadoras de metástase foram transfectadas com um plasmídeo de expressão que codifica um mutante de uPA proteoliticamente inativo, mas de ligação a uPAR. Em um modelo de camundongo, foi observado que, após a injeção, as células de carcinoma que sintetizaram o uPA inativo formaram um número significativamente menor de metástases em comparação com as células não transfectadas (Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 90 (1993) 5021-5025). Após administração de oligonucleotídeos anti-sentidos de uPA, a propagação intraperitoneal de células do carcinoma ovariano humano foi além disso observada ser inibida em camundongos desprotegidos (Wilhelm et al., Clin. Exp. Metast. 13 (1995) 296-302).

[0006] Nos últimos anos houve investigação intensiva da importância clínica dos fatores do sistema ativador de plasminogênio (uPA, uPAR, PAI-1 e PAI-2) para o prognóstico de pacientes com tumores malignos sólidos. Nestas investigações, o conteúdo de antígeno de uPA em vários tumores (por exemplo, mama, ovário, estômago, pulmões, rins etc.) foi observado ser um preditor forte tanto da sobrevivência livre de reincidência quanto da morte (ver, por exemplo, Schmitt et al., J. Obstet. Gynaecol. 21 (1995) 151-165 Jaenicke et al., Breast Cancer Res. Treat. 24 (1993) 195-208; Kuhn et al. Gynecol. Oncol. 55 (1994) 401-409; Nekarda et al., Lancet 343 (1994) 117 Pedersen et al., Cancer Res. 54 (1994) 4671-4675). Concentrações elevadas de uPAR no tecido de câncer de pulmão (Pedersen et al., acima) e mama (Duggan et al., Int. J. Cancer 61 (1995) 597-600; Ronne et al., Breast Cancer Res. Treat. 33 (1995) 199-207) e câncer do estômago tanto no próprio tecido tumoral (Heiss et al., J. Clin. Oncol. 13 (1995) 2084-

2093) quanto nas células tumorais espalhadas na medula óssea (Heis: et al., Nature Medicine 1 (1995) 1035-1039) da mesma maneira se correlacionam com um prognóstico fraco.

[0007] Também foi observado que os derivados de 3-amidinofenilalanina substituídos na posição 2 com um resíduo de fenila são inibidores de uPA seletivos que são ativos *in vivo* (EP 1 098 651). Na experiência com animal, estes compostos são administrados na forma de soluções aquosas.

[0008] Os WO 02/074756 e WO 03/103644 apresentam o uso de outros inibidores da urocinase com base em fenilalanina assim como o uso de derivados de 3-guanidinofenilalanina como inibidores da urocinase.

[0009] Foi observado no curso das primeiras provas clínicas dos compostos mencionados acima que a administração na forma de um manitol aquoso, por exemplo, D-manitol, sem a adição de soluções contendo solventes orgânicos e propileno glicol/etanol e sal comum, está associada com as desvantagens. Por exemplo, não é possível produzir uma solução de ingrediente ativo concentrada estável, quer em soluções salinas quer usando o agente de isotonização manitol, que não possui uma tendência de precipitar e formar os depósitos. Desta maneira, por exemplo, em soluções de manitol a cinco (5) por cento, um precipitado consistindo no ingrediente ativo adicionado se forma após a armazenagem prolongada. As formulações consistindo em solventes puramente orgânicos têm se revelado igualmente inadequadas, quando o ingrediente ativo não apresenta a estabilidade química necessária nesse particular e possui uma tendência a se decompor. Conseqüentemente, após aproximadamente 1,5 mês, o ingrediente ativo começa a se destruir mediante a formação de amida para produzir o éster, desse modo tornando a solução de ingrediente ativo inutilizável.

[00010] O WO 2004/011004 apresenta um método para a estabilização de soluções aquosas contendo inibidor de urocinase com base em fenilalanina na forma de "lipossomas", micelas misturadas consistindo em vários fosfolipídeos. Este tipo de estabilização é, no entanto, não adequado para todas as aplicações, a estabilidade química da formulação lipossômica não mais sendo adequadamente garantida em particular após a reconstituição com tampões fisiológicos.

[00011] Testes preliminares para o desenvolvimento de uma nova formulação revelaram solubilidade muito boa do ingrediente ativo N α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-amidino-(L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-UK1) em polióis, por exemplo, dióis, e em misturas de polioliol/álcool e água (tabela 1).

[00012] Estes dados revelaram que as misturas de polioliol e álcool, tais como, por exemplo, propileno glicol (PG) e etanol (EtOH), são bons solventes para uma formulação líquida. Ambos os solventes são adicionalmente adequados para a administração parenteral de ingredientes ativos.

[00013] A armazenagem de formulações diferentes, por exemplo,

- a) WX-UK1 60 mg/mL em PG/EtOH/água 40/10/50
- b) WX-UK1 50 mg/mL em PG/EtOH/água 40/10/50
- c) WX-UK1 40 mg/mL em PG/EtOH/água 40/10/50
- d) WX-UK1 20 mg/mL em PG/EtOH/água 10/10/80
- e) WX-UK1 4 mg/mL em água (controle)
- f) WX-UK1 4 mg/mL em 5% D-manitol (controle)

em dois a oito graus Celsius (2 a 8°C) mostrou que um precipitado cristalino acicular se forma após exatamente algumas horas na formulação (e) e (f). Após quatro (4) horas em dois a oito graus Celsius (2 a 8°C) um precipitado de aparência similar também se forma na formulação (d).

[00014] Nas formulações (a) e (b), nenhum precipitado é observado

após 16 ou 22 dias de armazenagem em dois a oito graus Celsius (2 a 8°C).

[00015] Em estudos de estabilidade em 2 a 8°C, 25°C/60% RH (umidade relativa) e 40°C/75% RH, sob as condições de 40°C, a formulação (c) apresenta um teor de impurezas de aproximadamente 4% após exatamente 6 semanas, de aproximadamente 23% após 8 semanas e de aproximadamente 38% após 12 semanas, em comparação com um teor de aproximadamente 0,5% no começo da investigação. Ao mesmo tempo, o valor de pH da formulação se elevaria de 5,1 para 8,7 durante um período de 12 semanas (figura 1).

[00016] A elevação no valor do pH é provavelmente atribuível à decomposição química de WX-UK1. A Figura 2 mostra uma possível reação de decomposição química do ingrediente ativo WX-UK1 em meio aquoso: WX-UK1 se decompõe na primeira etapa na amida correspondente de WX-UK1, amônia sendo liberada, porém na forma de cloreto de amônio porque a WX-UK1 está presente como o cloridrato. Na segunda etapa de decomposição química, a amida de WX-UK1 reage com álcool para liberar mais amônia para formar a éster correspondente de WX-UK1. A liberação de amônia é provavelmente responsável pela elevação no valor do pH.

[00017] Na base das descobertas com respeito ao processo de decomposição química, preferivelmente as formulações anídricas foram levadas em consideração de modo a evitar a decomposição do ingrediente ativo efetuada pela água. A viscosidade relativamente elevada dos solventes puramente orgânicos, no entanto, complica a manipulação dos concentrados de viscosidade elevada no dia a dia da prática clínica. Além do mais, as propriedades fortemente higroscópicas de polióis levam à absorção de água, desse modo recomeçando o processo de decomposição química do ingrediente ativo. O tamponamento com tampões orgânicos, tais como, por exemplo, trietanolami-

na/HCl, piperazina/HCl, ácido propiônico/propionato, nem todos dos quais são fisiologicamente aceitáveis, é também problemático.

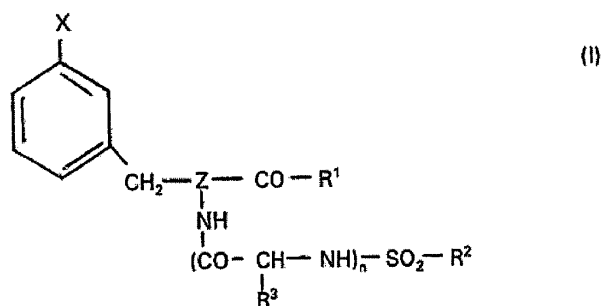
[00018] Esforços para estabilizar as soluções aquosas mediante a adição de agentes tensoativos, tais como, por exemplo, Pluronic F68 ou Tween 80, ou estabilizantes, tais como albumina de soro humano, foram infrutíferos. A adição de co-solventes, tais como polietileno glicóis, e formulação do ingrediente ativo em micelas misturadas contendo sal de bÍlis glicocolato, monidrato e o fosfolípídeo fosfatidil colina de ovo, também fracassou em fornecer estabilidade adequada.

[00019] Existe conseqüentemente uma necessidade em fornecer novas formulações farmacêuticas para ingredientes ativos compreendendo grupos amidino e/ou guanidino, em que as formulações são, por um lado, tanto física quanto quimicamente estáveis e apresentam boas propriedades de manipulação e armazenagem em partes e/ou como um concentrado, de modo a preparar, quando requerido, preparações farmacêuticas estáveis, por exemplo, soluções de infusão fisiológicas estáveis com agentes de isotonização adequados, cujas preparações são aceitáveis e apresentam atividade elevada.

[00020] Dito objetivo é alcançado como definido em a invenção por uma formulação farmacêutica como definido em a reivindicação 1, que compreende (i) um derivado de amidino-, hidroxiamidino-, guanidino- e/ou hidroxiguanidinofenilalanina como o ingrediente ativo, (ii) um álcool, ou um poliol ou uma mistura destes e (iii) uma fase aquosa compreendendo um tampão.

[00021] O ingrediente ativo usado é preferivelmente um derivado de fenilalanina tendo uma ação inibidora de serina protease, em particular ação inibidora de urocinase. Os ingredientes ativos preferidos são os compostos de amidinofenilalanina ou guanidinofenilalanina apresentados na EP-A-1 098 651, WO 02/074756 e WO 03/103644. Compostos de hidroxiamidinofenilalanina ou hidroxiguanidinofenilala-

nina, como apresentados na PCT/EP2004/005682, são igualmente preferidos. Os ingredientes ativos adequados da formulação farmacêutica como definido em a invenção são em particular os novos inibidores de urocinase, derivados de 3-amidinofenilalanina ou 3-guanidinofenilalanina, da fórmula geral I,



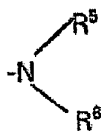
que assumem a forma não apenas de racematos, mas também de compostos configurados L ou D e em que

X é um grupo amidino ou guanidino ou grupo hidroxiamidino ou hidroxiguanidino,

R¹

(a) é OH ou OR⁴, em que R⁴ é uma alquila C₁-C₈, cicloalquila C₃-C₈ ou aralquila ramificada ou não ramificada, por exemplo, benzila ou feniletila, que é opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio.

(b) representa um grupo da fórmula



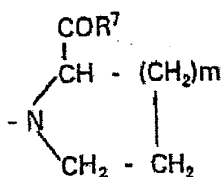
em que R⁵ e R⁶ são quaisquer resíduos desejados compatíveis com a estrutura total, em que em particular

(i) R⁵ e R⁶ são H,

(ii) R⁵ é H e R⁶ é uma alquila C₁-C₈, aralquila ramificada ou não ramificada, por exemplo benzila ou feniletila, ou cicloalquila C₅-C₈, que é opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio,

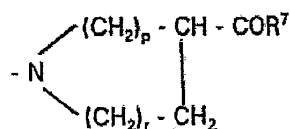
- (iii) R^5 e R^6 são em cada caso independentemente uma alquila C_1 - C_4 não ramificada ou ramificada opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila e/ou halogênio ou
- (iv) R^5 é H e R^6 é $-NH_2$ ou um grupo amino em particular substituído com arila ou heteroarila,
- (v) R^5 é H ou alquila C_1 - C_4 não ramificada ou ramificada que é opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila e/ou halogênio, e R^6 é o resíduo de um aminoácido, por exemplo, um ácido α -, β - ou ω -aminocarboxílico ou aminossulfônico, ou o resíduo de um peptídeo, por exemplo, com um comprimento de até 50 aminoácidos ou de um polipeptídeo, por exemplo, com um comprimento de mais do que 50 aminoácidos a 1.000 aminoácidos,

(c) representa um grupo da fórmula



em que m significa o número 1 ou 2, e em que um ou mais dos grupos de metileno são opcionalmente substituídos, por exemplo, com um resíduo de hidroxila, carboxila, alquila C_1 - C_4 ou aralquila, por exemplo, benzila ou feniletila, em que o grupo (c) é racêmico ou configurados D ou L, e R^7 possui o significado de R^1 nos parágrafos (a), (b) e (f),

(d) representa um grupo de fórmula



em que $p = r = 1$, $p = 1$ e $r = 2$ ou $p = 2$ e $r = 1$ e em que um ou mais dos grupos de metileno são opcionalmente substituídos, por exemplo, com um resíduo de hidroxila, carboxila, alquila C_1 - C_4 ou aralquila, por exemplo, benzila ou feniletila, e R^7 possui o significado de R^1 nos pa-

rágrafos (a), (b) e (f),

(e) representa um grupo piperidila, que é opcionalmente substituído em uma das posições 2, 3 e 4, por exemplo, com um resíduo de alquila C₁-C₄, alcóxi C₁-C₃ ou hidroxila, em que um outro anel aromático ou cicloalifático, preferivelmente fenila ou cicloexila, é opcionalmente fundido na posição 2,3 ou 3,4, em relação ao heteroátomo, nos anéis heterocicloalifáticos das fórmulas (c), (d), (e),

(f) representa um grupo da fórmula



em que R⁸

- (i) significa um resíduo de alquila C₁-C₆, tal como por exemplo etoxicarbonila, ou resíduo de arila, tal como por exemplo fenila, p-halofenila, naftila, que é opcionalmente substituída, por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio,
- (ii) significa um resíduo de alcóxi C₁-C₆ saturado ou insaturado, ramificado ou não ramificado ou
- (iii) significa um resíduo de fenóxi- ou benziloxicarbonila que é opcionalmente substituído, por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio,

(g) representa um resíduo de acila da fórmula -COX, em que X

- (i) significa H, um resíduo de alquila não ramificado ou ramificado, preferivelmente um resíduo de alquila C₁-C₆, em particular metila, que é opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio,
- (ii) significa um resíduo de arila ou heteroarila, tal como por exemplo fenila, p-halofenila, tienila, que é opcionalmente substituída por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxi-

la, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio ou

(iii) significa um resíduo de cicloalquila, preferivelmente um resíduo de cicloalquila C₃-C₁₀, que é opcionalmente substituído, por exemplo, com hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio,

(h) representa um resíduo de aralquila, por exemplo, benzila ou feniletila, em que o resíduo aromático é opcionalmente substituído, por exemplo, com um átomo de halogênio, um grupo alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidróxi, ciano, carboxila, sulfonila ou nitro,

(i) representa um resíduo de carboxamida da fórmula -CONR'R", um resíduo de tiocarboxamida -CSNR'R" ou um resíduo de acetamida -CH₂-CONR'R", em que

- (i) R' e R" são H,
- (ii) R' e R" são em cada caso independentemente alquila C₁-C₄,
- (iii) R' é H e R" é alquila C₁-C₄,
- (iv) R" é H e R' é arila, por exemplo, fenila, ou
- (v) R' e R" formam, com o átomo de nitrogênio, um anel heterocicloalifático com 5 a 7 membros do anel, que podem carregar um outro heteroátomo, por exemplo, N, O e/ou S,

(j) representa um resíduo de SO₂-Y, em que Y

- (i) é uma alquila C₁-C₈ que é opcionalmente substituída, por exemplo, com hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio, preferivelmente metila, trifluorometila, triclorometila,
- (ii) é uma arila ou heteroarila que é opcionalmente substituída, por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio, tal como por exemplo fenila, 4-metilfenila, 2,4,6-trimetilfenila, 2,4,6-triisopropilfenila, 4-metóxi-2,3,6-trimetilfenila, 2,2-dimetil-6-metóxi-cromanila, 2,2,5,7,8-pentametilcromanila, antraquinonila, naftila ou quinoli-

la, ou O-arila, preferivelmente O-fenila, ou O-heteroarila ou
(iii) é $-NRR''$, em que R' e R'' em cada caso independentemente significam H ou alquila C₁-C₃,

(k) representa um anel cicloalifático com 5 a 8 átomos de C, que é opcionalmente substituído, por exemplo, com um grupo alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, halogênio, hidróxi e/ou oxo,

(l) representa um resíduo de heteroarila, que é opcionalmente substituído, por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio, tal como por exemplo piridila ou pirimidila, ou resíduo heterocicloalifático, por exemplo, N-metilpiperidila,

(m) representa um resíduo de alquila funcionalizado da fórmula $-(CH_2)_n-X$, em que a cadeia de alquila é não ramificada ou ramificada, n significa de 1 a 8 e o resíduo funcional X

(i) representa um grupo hidroxila, o átomo de H do qual é opcionalmente substituído por um grupo alquila C₁-C₄, aralquila, por exemplo, benzila ou feniletila, arila, por exemplo, fenila, hidroxialquila C₁-C₄ ou acila, CO-alquila (C₁-C₆),

(ii) significa um átomo de halogênio,

(iii) representa um grupo amino terciário da fórmula $-N(alq)_2$, em que os grupos alquila possuem de 1 a 3 átomos de C e preferivelmente possuem o mesmo significado e o átomo de nitrogênio pertence a um anel heterocicloalifático com 5 a 7 membros do anel, que pode carregar um outro heteroátomo, por exemplo, N, O e/ou S,

R² representa um resíduo de fenila que é opcionalmente substituído, por exemplo, com alquila C₁-C₆, alcóxi C₁-C₃, hidroxila, carboxila, sulfonila, nitro, ciano, oxo e/ou halogênio, tal como, por exemplo, fenila, 4-metilfenila, 2,4,6-trimetilfenila, 2,4,6-triisopropilfenila, 4-metóxi-2,3,6-trimetilfenila,

R^3 é H ou alquila C_1 - C_4 ramificada ou não ramificada e n significa 0 ou 1,

Z significa N ou CR^9 , em que R^9 é H ou alquila C_1 - C_4 ramificada ou não ramificada.

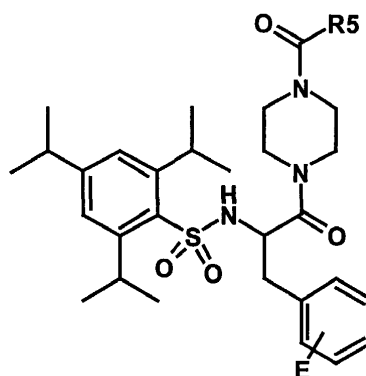
[00022] Os compostos podem também estar presentes como sais, preferivelmente como sais de ácido fisiologicamente aceitáveis, por exemplo, como sais de ácidos minerais, de forma particular preferivelmente como cloridratos, hidrogenossulfatos, sulfatos ou como sais de ácidos orgânicos adequados.

[00023] Dos compostos definidos nas reivindicações gerais, aqueles que são de importância particular são aqueles em que R^1 corresponde a um grupo das fórmulas (b), (d) e (f), R^2 representa um resíduo de fenila mono-, di- ou trissubstituído por alquila, em particular um resíduo de fenila 2,4,6-substituída, por exemplo, um resíduo de 2,4,6-triisopropilfenila, e $n = 0$. Outros compostos preferidos são aqueles em que Z é CH ou N.

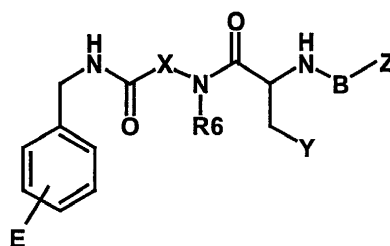
[00024] O composto da fórmula (I) particularmente preferível compreende $N\alpha$ -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida, $N\alpha$ -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-guanidino-(D,L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida ou os seus L-enantiômeros ou um sal farmacologicamente aceitável destes compostos.

[00025] Como mencionado acima, os compostos de hidróxi correspondentes dos derivados de amidino- e guanidinofenilalanina são também adequados como ingredientes ativos, por exemplo, aqueles como são apresentados na PCT/EP2004/005682, em particular compostos da formulam geral II e/ou III

II

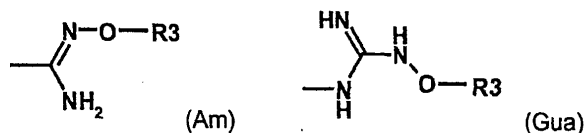


III



em que

E significa um grupo de

B significa $-\text{SO}_2-$ ou $-\text{CO}-$,X significa $-\text{NR}^1$ ou $-\text{CHR}^1$,Z significa $-\text{R}^4$, $-\text{OR}^4$ ou $-\text{NH}-\text{R}^4$,Y significa $-\text{OR}^2$ ou $-\text{NHR}^2$,

R^1 em cada caso independentemente significa $-\text{H}$, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ ou alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$, não substituída ou substituída, R^2 significa $-\text{H}$, $-\text{OR}^1$, $-\text{COR}^1$, $-\text{COOR}^1$ ou $-\text{CON}(\text{R}^1)_2$,

R^3 significa $-\text{H}$, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ ou alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$, não substituída ou substituída, ou $-\text{COR}^6$ ou $-\text{COOR}^6$ ou um resíduo de oligo- ou polialquilenooxi que compreende, por exemplo, 2 a 50 resíduos de alquilenooxi $\text{C}_2\text{-C}_4$, por exemplo, etilenoóxi,

R^4 significa -H, alquila C_1-C_6 , alquenila C_2-C_6 ou alquinila C_2-C_6 , não substituída ou substituída, ou um resíduo cíclico e

R^5 significa $-OR^6$, $-N(R^6)_2$, alquila C_1-C_6 , alquenila C_2-C_6 ou alquinila C_2-C_6 , não substituída ou substituída, e

R^6 significa -H, alquila C_1-C_6 , alquenila C_2-C_6 ou alquinila C_2-C_6 , não substituída ou substituída, ou um resíduo cíclico,

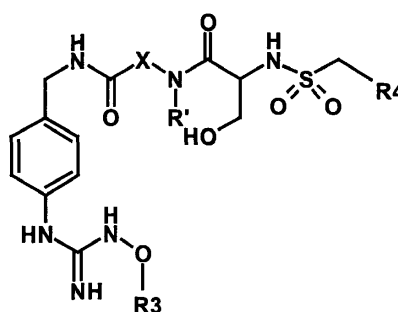
em que cada resíduo cíclico pode carregar um ou mais substituintes, por exemplo, selecionados entre alquila C_1-C_3 , $-OR^6$ (por exemplo, -OH ou alcóxi C_1-C_3), halogênio, =O, $-NO_2$, -CN, $-COOR^6$, $-N(R^6)_2$, $-NR^6COR^6$, $-NR^6CON(R^6)_2$ e $-OCOR^6$,

e em que cada alquila, alquenila e alquinila pode ser linear ou ramificada e pode carregar um ou mais substituintes, por exemplo, selecionados de halogênio (F, Cl, Br, I), $-OR^6$, $-OCOR^6$, $-N(R^6)_2$, $-NR^6COR^6$, $COOR^6$, $-NR^6COR^6$ ou um resíduo cíclico,

ou sais destes compostos e opcionalmente veículos, diluentes e/ou auxiliares farmacêuticamente convencionais.

[00026] Compostos preferidos são aqueles da fórmula geral IV

IV



em que

X , R^1 , R^3 , R^4 e R^6 são definidos como acima,

ou os seus sais.

[00027] O grupo E é preferivelmente localizado na posição para do anel de fenila nos compostos I e II. Os compostos particularmente preferidos são aqueles da fórmula geral I em que E é Am.

[00028] Os compostos como definido em a invenção compreendem uma função amidino ou guanidino modificada E, preferivelmente uma função de hidroxiguanidino ou hidroxiamidino. Tais modificações têm sido apenas conhecidas como intermediários de síntese na produção de inibidores da urocinase do tipo guanidino ou amidino. A atividade farmacêutica não foi até agora suspeita.

[00029] Os compostos podem estar presentes como sais, preferivelmente como sais de ácido fisiologicamente aceitáveis, por exemplo, sais de ácidos minerais, particularmente preferível como cloridratos ou hidrogenossulfatos, ou como sais de ácidos orgânicos adequados, por exemplo, de ácidos carboxílicos ou sulfônicos orgânicos, tais como, por exemplo, tartaratos, mesilatos ou besilatos. Hidrogenossulfatos são particularmente preferidos. Os compostos podem estar presentes como compostos opticamente puros ou como misturas de enantiômeros e/ou diastereômeros.

[00030] Os resíduos cíclicos podem conter um ou mais anéis saturados, insaturados ou aromáticos. Exemplos preferidos de resíduos cíclicos são resíduos de cicloalquila, resíduos de arila, resíduos de heteroarila e resíduos bicíclicos. Os resíduos mono- ou bicíclicos são particularmente preferidos. Os resíduos cíclicos contêm preferivelmente de 4 a 30, em particular, de 5 a 10 átomos de carbono e heteroátomos como átomos de anel, e opcionalmente um ou mais substituintes como anteriormente mencionado. Os sistemas heterocíclicos preferivelmente contêm um ou mais átomos de O, S e/ou N. Os sistemas de anel bicíclicos preferíveis são aqueles com um resíduo de -CO-.

[00031] Grupos alquila, alquenila e alquinila preferivelmente contêm até 4 átomos de carbono. R¹ é preferivelmente H ou um resíduo de alquila C₁-C₄ opcionalmente substituída, por exemplo, -CH₃ ou um resíduo de alquilarila C₁-C₆, tal que -CO-X-NR¹ possa, por exemplo, representar um resíduo de glicila, alanila, fenilalanila ou homofenilalanila.

R^2 é particularmente preferível H ou um resíduo de alquila C_1-C_3 , tal que Y possa, por exemplo, representar um OH ou resíduo de alquila $O-C_1-C_3$. R^3 é particularmente preferível H. Nos compostos I, R^5 preferivelmente significa $-NHR^6$, particularmente preferível $-NH$ -alquila (C_1-C_5), não substituída ou substituída, por exemplo, $-NHC_2H_5$ ou $-OR^6$, particularmente preferível $-O$ -alquila (C_1-C_3), não substituída ou substituída, por exemplo, etilóxi ou benzilóxi, ou $-O$ -arila, por exemplo, fenilóxi. Nos compostos II e III, R^6 é preferivelmente $-H$ ou alquila C_1-C_3 .

[00032] Os compostos preferidos são aqueles em que o elemento estrutural Z significa R^4 , em que R^4 significa um resíduo de alquila com um substituinte cíclico, por exemplo, um resíduo de fenila opcionalmente substituído ou um resíduo bicíclico, tal como, por exemplo,



[00033] Os compostos particularmente preferidos são aqueles em que R^4 significa um resíduo de alquilarila C_1-C_3 não substituída, quer dizer, por exemplo, um resíduo de benzila, que pode opcionalmente ser substituído na posição meta ou para com halogênio e/ou $-NO_2$, em que o halogênio é selecionado de F, Cl, Br e I, particularmente preferível Cl e Br.

[00034] Os compostos mais altamente preferidos são:

N - α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiimidino-(L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-671),

N - α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiimidino-(D)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida,

N - α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxiimidino-(D,L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida,

N - α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(L)-

fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida (WX-683),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D)-

fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-

fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(L)-

fenilalanina-4-etilaminocarbonilpiperazida (WX-685),

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D)-

fenilalanina-4-etilaminocarbonilpiperazida,

N- α -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonil)-3-hidroxi guanidino-(D,L)-

fenilalanina-4-etilaminocarbonilpiperazida,

benzilsulfonil-(D)-Ser-Gli-(4-hidroxi guanidinobenzil)amida

(WX-678),

4-clorobenzilsulfonil-(D)-Ser-N-Me-Ala-(4-

hidroxi guanidinobenzil) amida,

4-clorobenzilsulfonil-(D)-Ser-Gli-(4-

hidroxi guanidinobenzil)amida,

benzilsulfonil-(D)-Ser-N-Me-Gli-(4-

hidroxi guanidinobenzil)amida,

4-clorobenzilsulfonil-(D)-Ser-Ala-(4-

hidroxi guanidinobenzil)amida

e os seus sais, por exemplo, os hidrogenossulfatos, tais como, por exemplo, WX-671 · HSO₄.

[00035] As formulações como definido em a invenção contêm uma quantidade terapeuticamente ativa do ingrediente ativo com base em um derivado de fenilalanina, uma quantidade fisiologicamente aceitável do álcool e/ou poliol, uma fase aquosa com constituintes tampões e opcionalmente agentes de isotonização e outras substâncias auxiliares individualmente ou em misturas ou combinações destes.

[00036] As formulações como definido em a invenção preferivel-

mente contêm o ingrediente ativo em uma proporção em peso de 0,5 a 10%, preferivelmente de 1 a 9%, particularmente preferível de 2 a 5%, em relação ao peso total da formulação.

[00037] O ingrediente ativo está preferivelmente presente em uma concentração de até 100 mg/mL, preferivelmente até 80 mg/mL, preferivelmente até 60 mg/mL, preferivelmente até 50 mg/mL, mais preferivelmente até 40 mg/mL, ainda mais preferível aproximadamente 30 mg/mL, ainda mais preferível aproximadamente 20 mg/mL, ainda mais preferível aproximadamente 10 mg/mL, ainda mais preferível aproximadamente 4 mg/mL, ainda mais preferivelmente aproximadamente 1 mg/mL, de forma preferida até aproximadamente 0,1 mg/mL. A formulação pode opcionalmente ser ainda diluída antes do uso.

[00038] O álcool ou o poliol para os propósitos da presente invenção compreendem álcoois mono- e poliídricos fisiologicamente aceitáveis. Um poliol é aqui adotado para significar um álcool poliídrico. Em particular, pode ser um álcool diídrico (diol) ou um álcool tídrico (triol), ou também um álcool poliídrico.

[00039] Etanol é, por exemplo, preferível como um álcool monoídrico. Outros álcoois fisiologicamente aceitáveis podem, no entanto, também ser usados.

[00040] Os polióis que podem em particular ser considerados são dióis e trióis fisiologicamente aceitáveis, um exemplo de um triol preferido sendo glicerol. Os glicóis são também adequados como definido em a invenção. Exemplos de glicóis são glicol, propileno glicol, polietileno glicol.

[00041] O álcool e/ou poliol estão preferivelmente presentes na formulação farmacêutica como definido em a invenção em uma tal quantidade que este componente constitui aproximadamente de 20 a 60%, preferivelmente de 40 a 60%, mais preferivelmente de 45 a 55%, o mais preferível aproximadamente 50% em relação ao volume da for-

mulação inteira.

[00042] Uma mistura de poliol e álcool é particularmente preferida. A razão de poliol:álcool é aqui preferivelmente de 2:1 a 10:1, mais preferivelmente de 3:1 a 8:1, ainda mais preferivelmente de 4:1 a 6:1 e o mais preferível 4:1.

[00043] A mistura preferivelmente compreende uma mistura de um glicol e etanol. Uma mistura de propileno glicol e etanol e de polietileno glicol e etanol é particularmente preferível.

[00044] A fase aquosa, compreendendo um tampão, é preferivelmente selecionada de um grupo de tampões fisiologicamente aceitáveis, em particular tampão de acetato, tampão de citrato, tampão de fosfato e similares mais; o componente tampão preferivelmente compreendendo um tampão de acetato de sódio. Outros tampões de acetato são, no entanto, também adequados, por exemplo, tampão de acetato de potássio, tampão de acetato de cálcio. A pessoa versada na técnica é capaz de selecionar um tampão adequado entre os tampões fisiologicamente adequados, em particular tampões de acetato.

[00045] A fase aquosa está preferivelmente presente em uma quantidade de até 70% em relação ao volume da formulação inteira, preferivelmente de até 60%, mais preferível de até aproximadamente 50%. Naturalmente, a formulação farmacêutica pode, se necessário, ser diluída antes do uso. A formulação é preferivelmente diluída imediatamente antes do uso, preferivelmente com um agente de isotonização ou um líquido isotônico, tal que uma solução isotônica adequada para infusão ou injeção seja preferivelmente produzida.

[00046] O tampão está preferivelmente presente em uma concentração de até 1000 mM, preferivelmente até 500 mM, mais preferivelmente até 250 mM, mais preferivelmente até 200 mM, ainda mais preferível de aproximadamente 100 mM.

[00047] A formulação de acordo em a invenção pode adicionalmen-

te compreender um agente de isotonização e/ou outras substâncias auxiliares adicionais, que são familiares à pessoa versada na técnica.

[00048] O agente de isotonização é preferivelmente um açúcar ou preferivelmente selecionado entre, por exemplo, glicose, ribose, sacarose, sorbitol, manitol, lactose, dextrose, trealose, glicerol e misturas dos mesmos. O agente de isotonização está preferivelmente presente na forma de uma solução. O agente de isotonização usado é preferivelmente uma solução de aproximadamente 1 a 10%, preferivelmente 2 a 7%, particularmente preferível 5%. Uma solução de glicose é particularmente preferida.

[00049] A formulação como definido em a invenção pode além disso conter substâncias auxiliares que a pessoa versada na técnica pode facilmente determinar.

[00050] É além disso preferível para a formulação como definido em a invenção, que pelo menos o componente aquoso desta, tenha um valor de pH na faixa de 3,5 a 9,0, preferivelmente um valor de pH na faixa de 4 a 7, e particularmente preferível um valor de pH na faixa de 4,5 a 5,5.

[00051] A formulação como definido em a invenção pode ser usada por várias vias de administração, por exemplo, como uma formulação líquida, parenteralmente, como uma infusão, intramuscular, intravenosa, subcutaneamente etc. A formulação é preferivelmente administrada intravenosa ou intramuscularmente. As substâncias auxiliares adequadas para este propósito podem facilmente ser determinadas pela pessoa versada na técnica.

[00052] A formulação como definido em a invenção pode opcionalmente ser usada em combinação com outros ingredientes ativos, por exemplo, agentes citostáticos ou citotóxicos, por exemplo, doxorrubicina, cisplatina, 5-fluoro-uracil ou anticorpos e peptídeos.

[00053] A formulação como definido em a invenção pode ser usada

para a administração parenteral, por exemplo, para injeção intravenosa ou intramuscular e/ou para infusão. A dose diária é preferivelmente de 5 a 250 mg, particularmente preferível de 20 a 120 mg no caso de administração subcutânea ou intramuscular e de 10 a 500 mg, particularmente preferível de 50 a 250 mg no caso de administração intravenosa, em cada caso em relação a um peso corporal médio de 70 kg. A administração procede preferivelmente uma vez ao dia a uma vez por semana.

[00054] A presente invenção também fornece um concentrado consistindo em uma formulação como definido em a invenção, em que o ingrediente ativo está presente em uma concentração de até 100 mg/mL, preferivelmente de até 80 mg/mL, mais preferivelmente de até 50 mg/mL, ainda mais preferível de aproximadamente 40 mg/mL. O tampão está preferivelmente presente em uma concentração de até 1000 mM, preferivelmente de até 500 mM, mais preferivelmente de até 250 mM, ainda mais preferível de aproximadamente 100 mM.

[00055] Um concentrado em que a concentração do ingrediente ativo é 40 mg/mL e a concentração do tampão 100 mM é particularmente preferível.

[00056] Os concentrados e formulações como definido em a invenção podem ser armazenados sem maiores perdas de pureza e ingrediente ativo durante um período prolongado, tipicamente em dois a oito (2 a 8°C), mas também na armazenagem em temperatura elevada, por exemplo, a 40°C.

[00057] Os compostos de ingrediente ativo são adequados para combater doenças que são associadas com a superexpressão patológica de uPA e/ou receptor do ativador de urocinase plasminogênio (uPAR). Eles são, por exemplo, capazes de altamente de modo eficaz inibir o desenvolvimento e/ou propagação de tumores malignos e a metastatização de tumores. Os inibidores de uPA podem aqui opcio-

nalmente ser usados juntamente com outros agentes antitumorais ou com outros tipos de tratamento, por exemplo, irradiação ou cirurgia. Os inibidores são além disso também ativos em outras doenças associadas com uPA e/ou associadas com uPAR.

[00058] Estes compostos são capazes de altamente de modo eficaz inibir o desenvolvimento e/ou propagação de tumores malignos, por exemplo, propagação de tumor no carcinoma pancreático, desenvolvimento de tumor no carcinoma mamário e a metastatização de tumores.

[00059] Os inibidores de acordo com a invenção são ademais também ativos em outras doenças associadas com uPA, por exemplo, para combater doenças, tais como, artrite, inflamação, osteoporose, retinopatia, por exemplo, degeneração macular relacionada com a idade, na prevenção de pêfigo vulgar que ocasiona bolhas cutâneas.

[00060] A administração preferivelmente procede conjuntamente, por exemplo, como um pré- e/ou pós-tratamento, e concorrentemente em associação com cirurgia, tratamento de radiação e/ou quimioterapia.

[00061] A presente invenção também fornece o uso de um concentrado como definido em a invenção para a produção de uma solução de ingrediente ativo adequada para injeção ou infusão mediante a diluição em agentes de isotonização adequados, em que uma solução de glicose a 5% é preferivelmente usada e a concentração de ingrediente ativo preferivelmente eleva-se a até 1 mg/mL.

[00062] A formulação como definido em a invenção é utilizada para combater doenças associadas com a urocinase, em particular combater tumores, por exemplo, para combater carcinoma mamário e carcinoma pancreático e/ou a metastatização.

[00063] A presente invenção também fornece um método para a estabilização de formulações farmacêuticas que compreendem um composto que compreende um grupo amidino, hidroxiamidino, guanidino e/ou hidroxiguanidino, preferivelmente derivados de amidino- e/ou

guanidino-fenilalanina ou os compostos de hidróxi dos mesmos, pela adição de uma quantidade adequada de um poliol ou um álcool ou uma mistura dos mesmos, e uma fase aquosa compreendendo um tampão. Um agente de isotonzificação é preferivelmente adicionalmente agregado.

[00064] O álcool, o poliol, o tampão e o agente de isotonzificação são como descritos acima.

[00065] O ingrediente ativo usado é preferivelmente um derivado de amidino- e/ou guanidino-fenilalanina tendo uma ação inibidora de urocinase, como descrito acima.

[00066] Os exemplos que seguem são destinados a ilustrar a invenção, mas sem limitá-la de qualquer maneira.

Descrição das Figuras

[00067] A tabela 1 mostra a solubilidade máxima de WX-UK1 em vários solventes e misturas de solvente.

Tabela 1

Solvente	Solubilidade de WX-UK1 [mg/mL]
Água	5,2
D-glicose 5%	6,6
Solução de NaCl 0,9%	1,3
Propileno glicol	>100
Polietileno glicol 400	>100
Propileno glicol 10% em água	16
Propileno glicol 40% em água	78
Etanol 10% em água	22
Propileno glicol/etanol/água 60/15/25	> 108
Propileno glicol/etanol/água 40/10/50	> 100
Propileno glicol/etanol/água 20/5/75	47
Propileno glicol/etanol/água 10/10/80	38

[00068] A Figura 1 mostra a variação na pureza de WX-UK1 e no valor do pH a 40°C em PG/EtOH/água (4/1/5).

[00069] A Figura 2 mostra o mecanismo de decomposição química potencial para WX-UK1 em solução aquosa.

[00070] A Figura 3 mostra a dependência do pH da decomposição química de WX-UK1 a 60°C observada durante 48 h.

[00071] A Figura 4 mostra a estabilidade das formulações de WX-UK1 individuais a 60°C.

[00072] A Figura 5 mostra a estabilidade das formulações de WX-UK1 tamponadas em comparação com a solução não-tamponada.

[00073] A Figura 6 mostra a pureza e teor das formulações de WX-UK1 a 40°C durante 5 meses.

Exemplos

Exemplo 1: Dependência do pH da decomposição química do ingrediente ativo

[00074] A dependência do pH da decomposição química do ingrediente ativo (WX-UK1) foi investigada em três diferentes valores do pH com tratamento térmico a 60°C por dissolver 2,5 mg de WX-UK1 em 1 mL de etanol/água (1:1 vol/vol). Esta solução foi dividida em alíquotas em três recipientes. Uma alíquota foi ajustada para pH 2 mediante a adição de 20 µL de ácido clorídrico 1 N, uma segunda alíquota foi ajustada para o pH 11 mediante a adição de 20 µL de solução de hidróxido de sódio 2 N e a terceira alíquota foi deixada em um pH neutro. Após incubação, as soluções foram analisadas em pontos definidos no tempo (0, 5, 12 e 48 h) por meio de um método de HPLC indicador da estabilidade. Foi observado que WX-UK1 permaneceu estável em um pH ácido durante o período investigado. Em um pH neutro ou básico, no entanto, decomposição química moderada a rápida de WX-UK1 foi observada (figura 3).

Exemplo 2: Estabilidade do ingrediente ativo na formulação de poli-

ol/etanol

[00075] 0,4 mL de propileno glicol (PG) e 0,1 mL de etanol foram adicionados em sucessão à 40 mg de WX-UK1. Esta solução foi preparada com 0,3 mL de água e agitada até que WX-UK1 entrasse na solução e a solução apresentasse opalescência leve. A água remanescente (aproximadamente 0,2 mL) foi então adicionada. A solução foi depois tamponada a 40°C e o valor do pH e a pureza da solução foram em cada caso analisados após um período de 2, 4, 6, 8 e 12 semanas. Para esta finalidade, 250 µl da solução de WX-UK1 foram transferidos para dentro de um frasco de medição de 100 mL e preparados com água/acetonitrila (50:50 vol/vol) até a marca de graduação (concentração: aproximadamente 0,1 mg/mL de WX-UK1). 20 µl desta diluição foram depois analisados por meio de um método de HPLC indicador da estabilidade analisado (ver anexo). A análise do valor do pH da solução de WX-UK1 foi realizada por meio de um método potenciométrico a 20 a 25°C. Foi observado (figura 1) que quanto mais elevado for o valor do pH da solução, mais rápido a WX-UK1 se decompõe.

Exemplo 3: Formulações de WX-UK1 tamponadas alternativas

[00076] Em cada caso 5 mL das seguintes soluções de (a) a (e) foram produzidas. As soluções foram depois tamponadas a 60°C e o valor do pH e pureza da solução foram em cada caso analisados após um período de 0, 12, 24, 48 horas. Para esta finalidade, 250 µl da solução de WX-UK1 foram transferidos para dentro de um frasco de medição de 100 mL e preparados com água/acetonitrila (50:50 vol/vol) até a marca de graduação (a concentração é aproximadamente 0,1 mg/mL de WX-UK1). 20 µl desta diluição da solução de WX-UK1 foram depois analisados por meio de um método de HPLC indicador da estabilidade (ver Anexo).

a) 1 mg/mL de WX-UK1 em água (valor do pH medido)

b) 40 mg/mL de WX-UK1 em PG/etanol/água, 4:1:5 (valor do pH medido)

- c) 40 mg/mL de WX-UK1 em 1,2-propanodiol/etanol, anidro
- d) 40 mg/mL de WX-UK1 em PG/etanol/citrato de sódio 40 mM, 4:1:5 (ajustar o valor do pH para aquele da solução (b))
- e) 40 mg/mL de WX-UK1 em PG/etanol/tampão de acetato de sódio 40 mM, 4:1:5 (ajustar o valor do pH para aquele da solução (b))

[00077] De modo a produzir de tampão de citrato de sódio 80 mM (valor do pH como acima), 1,68 g de monoidrato de ácido cítrico foi dissolvido em 8 mL de hidróxido de sódio 1 N e preparado com água até 100 mL. O valor do pH foi ajustado com hidróxido de sódio 80 nM. Tampão 1 mM foi obtido por diluição 1/80 e subsequente ajuste do pH.

[00078] O acetato de sódio e citrato de sódio em pH 5 foram selecionados como um sistema parenteralmente aceitável para o tamponamento da formulação de WX-UK1 e a estabilidade química e física foi testada em relação à formulação não-tamponada e uma formulação anidra. Um tampão de fosfato não foi utilizado porque foi sabido a partir de investigações mais antigas que a adição de tampão de fosfato resulta na formação de um precipitado nas soluções de WX-UK1. O estudo de estabilidade foi realizado a 60°C de modo a obter decomposição química mais rápida de WX-UK1. A solução de WX-UK1 tamponada por citrato muito rapidamente projetou um precipitado, que, semelhante ao sobrenadante da solução, foi testado com relação à pureza da WX-UK1. Devido à estabilidade física inadequada da solução tamponada por citrato de sódio e a estabilidade química inadequada da formulação investigada, o estudo de estabilidade destas formulações foi concluído após quatro dias. A formulação de WX-UK1 tamponada por acetato de sódio apresentou a maior estabilidade física e química. A porcentagem de área de pico da WX-UK1, determinada por um método de HPLC indicador da estabilidade, foi avaliada (figura 4).

Exemplo 4: Estabilidade das soluções tamponadas por acetato de só-

dio

[00079] Na base destes resultados, o acetato de sódio em várias molaridades em pH 5 foi selecionado como um sistema parenteralmente aceitável para o tamponamento da formulação de WX-UK1 e estabilidade química em relação à formulação não-tamponada foi adicionalmente testada. O estudo de estabilidade foi realizado a 60°C de modo a obter decomposição química acelerada de WX-UK1 (figura 5). A porcentagem de área de pico de WX-UK1, determinada por um método de HPLC indicador da estabilidade, foi avaliada.

[00080] Resultado: Uma considerável redução na taxa de decomposição química de WX-UK1 pode ser obtida mediante o armazenamento da formulação.

Exemplo 5: Estudo de estabilidade durante vários meses com uma formulação tamponada com acetato de sódio

[00081] Produção de um tampão de acetato de sódio 200 mM:

821 mg de acetato de sódio foram dissolvidos em 50 mL de água e ajustados para pH 5 com ácido acético concentrado e a solução tamponada finalizada foi filtrada através de um filtro de seringa Millipore Millex GV 0,22.

[00082] Produção da formulação de WX-UK1 tamponada com acetato de sódio 100 mM:

960 mg de WX-UK1 foram pesados em um recipiente e 9,6 mL de propileno glicol foram adicionados, seguido por 2,4 mL de etanol. Esta solução foi preparada com 7 mL de tampão de acetato de sódio 200 mM e agitada até que a WX-UK1 entrasse na solução e a solução apresentasse opalescência leve. O tampão de acetato de sódio remanescente (5 mL) foi depois adicionado. As soluções foram divididas em alíquotas de 1 mL e depois tamponadas a 40°C: a pureza e o teor de WX-UK1 da solução foram em cada caso analisados após um período de 2, 4, 6, 8 e 12 semanas. Para esta finalidade, 250 µl da

solução de WX-UK1 foram transferidos para dentro de um frasco de medição de 100 mL e preparados com água/acetonitrila (50:50 vol/vol) até a marca de graduação (concentração: aproximadamente 0,1 mg/mL de WX-UK1). 20 µl desta diluição da solução de WX-UK1 foram depois analisados por meio de um método de HPLC indicador da estabilidade (ver anexo).

[00083] O teor de WX-UK1 foi avaliado em relação às duas soluções padrão de WX-UK1 usando a seguinte fórmula:

$$\text{WX-UK1 [mg/mL]} = \frac{\text{Área}_{\text{PL}} \times (W_{\text{st1}} + W_{\text{st2}}) \times C_{\text{st}}}{(\text{Área}_{\text{st1}} + \text{Área}_{\text{st2}}) \times 100 \times V_{\text{PL}}}$$

Área_{PL} = Área da solução de teste (pico de WX-UK1) [mAU*s]

Área_{st1} = Área padrão I (pico de WX-UK1) [mAU*s]

Área_{st2} = Área padrão II (pico de WX-UK1) [mAU*s]

W_{st1} = Peso de padrão I [mg]

W_{st2} = Peso de padrão II [mg]

C_{st} = Teor de padrão [%]

V_{PL} = Volume da solução de injeção usada [mL]

[00084] A Figura 6 mostra a variação durante um tempo tanto da pureza das formulações quanto do teor de WX-UK1. Fica claro que tanto a pureza quanto o teor da formulação de WX-UK1 tamponada permanecem muito estáveis, ao contrário da formulação não-tamponada (Figura 6).

[00085] Exemplo 6: A formulação de WX-UK1 (40 mg/mL) é produzida usando o seguinte método:

WX-UK1	40 mg
Propileno glicol	0,4 mL
Etanol absoluto	0,1 mL
Água	preparar para 1 mL

[00086] A WX-UK1 foi pesada em um recipiente e propileno glicol foi

adicionado, seguido por etanol. Esta solução foi preparada com 0,3 mL de água e agitada até que a WX-UK1 entrasse na solução ou a solução apresentasse opalescência leve. A água remanescente foi depois adicionada.

Exemplo 7: A formulação de WX-UK1 tamponada por acetato de sódio (40 mg/mL) foi produzida usando o seguinte método:

WX-UK1	40 mg
Propileno glicol	0,4 mL
Etanol absoluto	0,1 mL
Tampão de acetato de sódio (200 mM)	preparar para 1 mL

[00087] A WX-UK1 foi pesada em um recipiente e propileno glicol foi adicionado, seguido por etanol. Esta solução foi preparada com 0,3 mL de acetato de sódio 200 mM e agitada até que a WX-UK1 entrasse na solução ou a solução apresentasse opalescência leve. O tampão de acetato remanescente foi depois adicionado.

Exemplo 8: Método de HPLC indicador da estabilidade para a verificação da estabilidade das formulações de WX-UK1:

Aparelho e Sistema de HPLC:	Agilent 1100
Condições: Tipo de coluna:	LUNA C8(2) 5 µm, 250 mm, 4,6 mm ID ou Kromasil 100 C18 5 µm, 250 mm, 4 mmID
Comprimento de onda de detecção:	UV 205 nm
Temperatura do injetor: de amostra:	4°C
Temperatura da coluna:	40°C
Volume de injeção:	20 µl
Tipo de sistema:	Sistema gradiente
Taxa de fluxo:	1 mL/min

Tempo de operação: 44 min
 Solventes móveis: A: pH do tampão = $5,00 \pm 0,05$ (25 mM fosfato de Na) B: acetonitrila

Gradiente:	Tempo [min]	A [%]	B [%]	
	0	75	25	
	30	28	72	
	31	10	90	
	36	10	90	
	37	75	25	
	44	75	25	Final

Materialis a serem

usados: Água para cromatografia (grau gradiente)
 Acetonitrila para cromatografia
 Ácido ortofosfórico, 85% Suprapur
 Hidrogenfosfato de dissódio de grau analítico (>99,99%)
 tampão de fosfato de sódio 25 mM pH = $5,00 \pm 0,05$ (3,55 g de Na_2HPO_4 foram preparados com água para 1000 mL. O valor do pH foi ajustado para pH = $5,00 \pm 0,05$ com H_3PO_4).

Preparação da amostra:

[00088] Solução de teste de WX-UK1: 25 μl de WX-UK1 (40 mg/mL) concentrado foram diluídos com 975 μl de água/acetonitrila (50:50 vol/vol). 100 μl desta solução de diluição foram diluídos com 900 μl de água/ acetonitrila (50:50 vol/vol) (c é aproximadamente 0,1 mg/mL de WX-UK1).

Exemplo 9: Método de HPLC-MS para a identificação dos produtos de decomposição das formulações de -UK1:

Aparelho e Condições:	Sistema de HPLC:	Waters Alliance: 2695
		Módulo de separação; detector 2487 UV-VIS
	Detector de MS:	Micromass ZQ: detector de MS quadripolar único
	Tipo de coluna:	Symmetry C 18 3,5 µm; 2,1 x100 mm
	Comprimento de onda de detecção:	UV 215 nm
	Temperatura do injetor de amostra:	4°C
	Temperatura da coluna:	35°C
	Volume de injeção:	20 µl
	Tipo de sistema:	Sistema gradiente
	Taxa de fluxo:	0,5 mL/min
	Tempo de operação:	16 min
	Solventes móveis:	A: Tampão NH ₄ Ac/ACN 72/25 (vol/vol) B: Tampão NH ₄ Ac/ACN 30/70 (vol/vol) C: Metanol

Gradiente:	Tempo [min]	A [%]	B [%]	C [%]
	0	100	0	0
	10	0	100	0
	11	0	20	80
	12	0	20	20
	13	100	0	0
	16	100	0	0

Final

Materiais a serem

usados:

Água para cromatografia (grau gradiente)

Acetonitrila para cromatografia (grau gradiente)

Metanol (grau gradiente de HPLC)

Ácido acético glacial (Suprapur)

Acetato de amônio (grau de HPLC)

NH₄Ac 50 mM: Preparar 3,85 g de NH₄Ac para 1000 mL com água. Ajuste do pH para 5 com ácido acético glacial

REIVINDICAÇÃO

1. Formulação farmacêutica estável para inibir urocinase, caracterizada pelo fato de que compreende:

como um ingrediente ativo, $N\alpha$ -(2,4,6-triisopropilfenilsulfonyl)-3-amidino-(L)-fenilalanina-4-etoxicarbonilpiperazida, sendo que o ingrediente ativo está presente em uma concentração de 40 mg/mL;

um tampão de acetado de sódio presente em uma concentração de 40 mM; e

uma mistura de propileno glicol:etanol: tampão de acetato de sódio 40Mm, em uma razão de mistura de 4:1:5, em uma quantidade de aproximadamente 45 a 55%, em relação ao volume da formulação inteira, e

sendo que a dita formulação apresenta à temperatura ambiente um valor de pH de 5.

Fig. 1

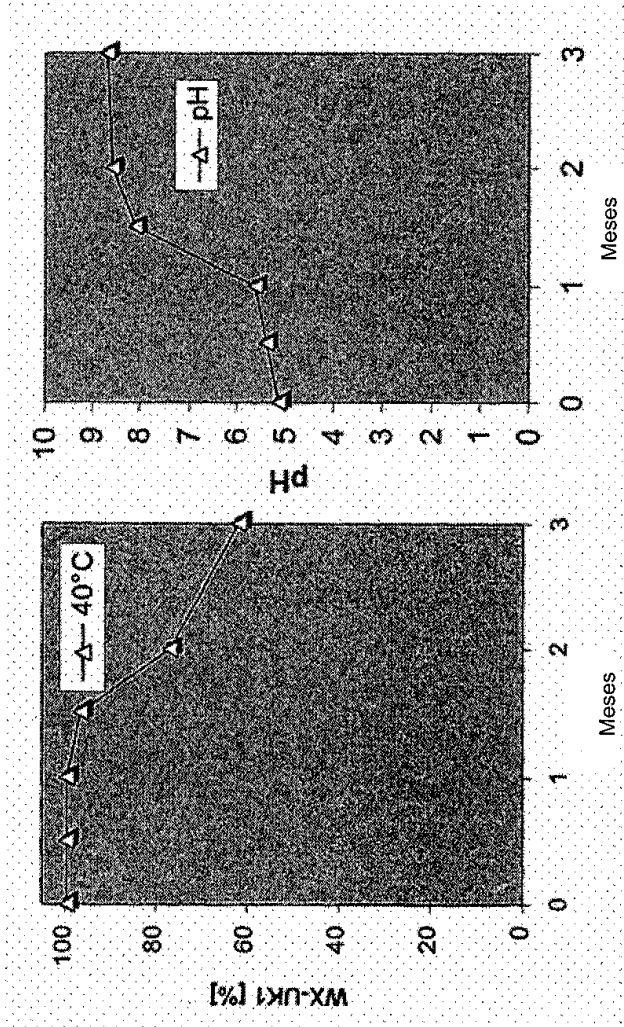


Fig. 2

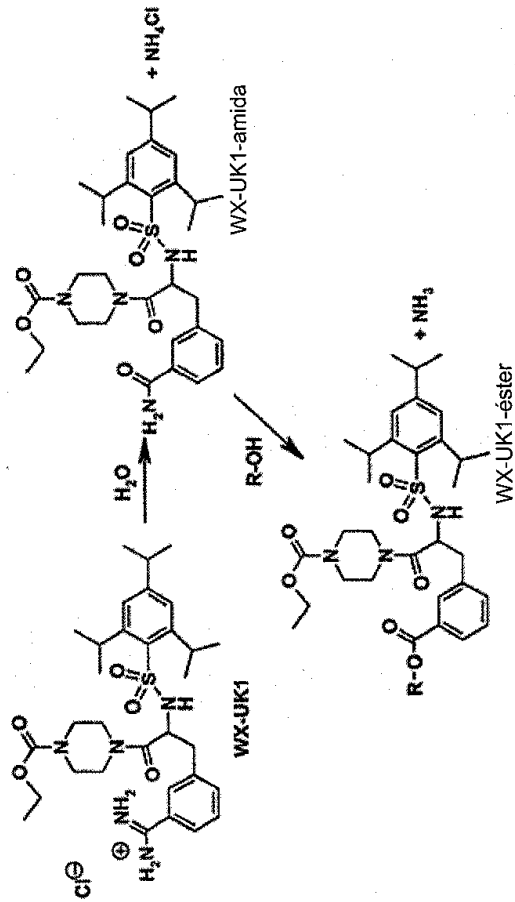


Fig. 3

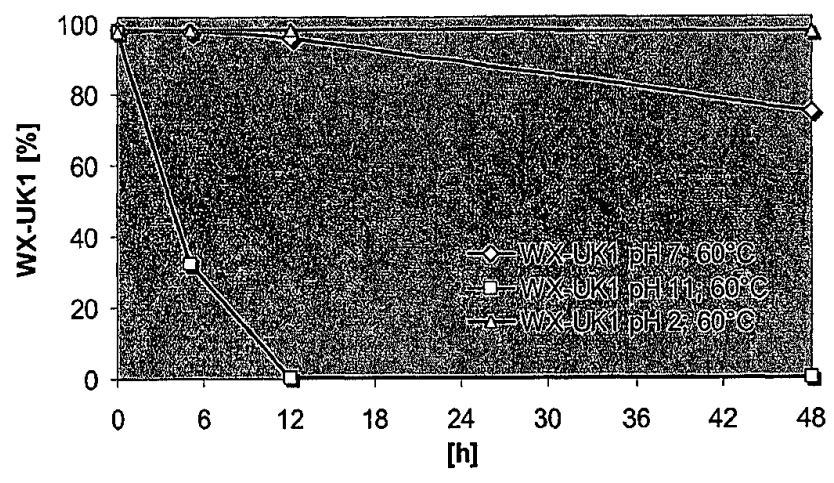


Fig. 4

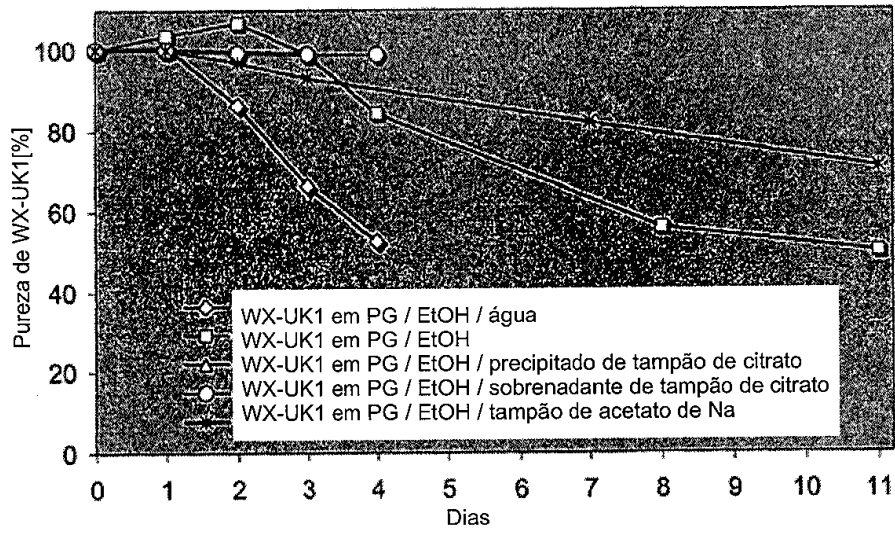


Fig. 5

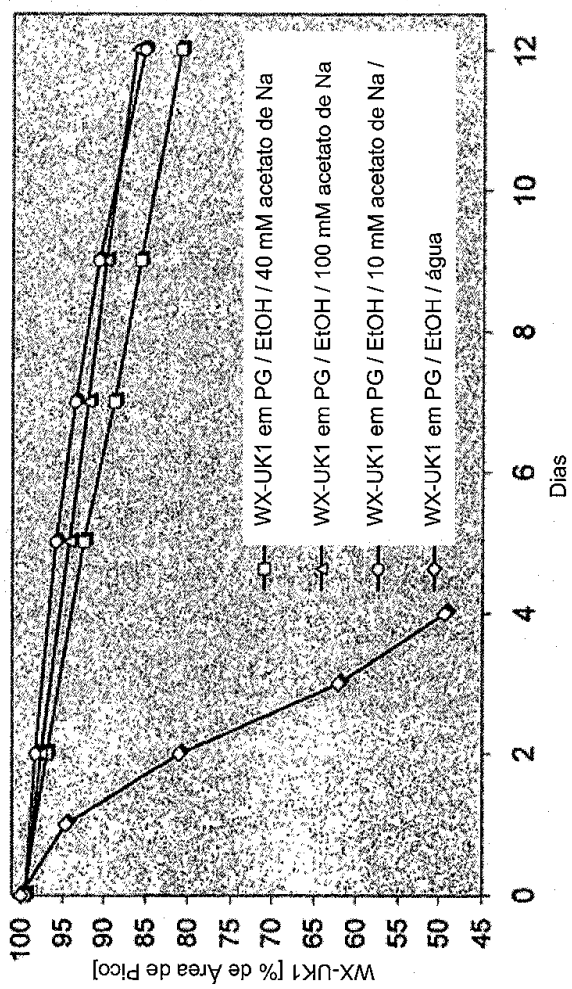


Fig. 6

