

(11) Número de Publicação: **PT 2064189 E**

(51) Classificação Internacional:
C07D 237/32 (2011.01) **A61K 31/502** (2011.01)
A61P 35/00 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.10.15	(73) Titular(es): KUDOS PHARMACEUTICALS LIMITED 2 KINGDOM STREET LONDON W2 6BD GB
(30) Prioridade(s): 2006.10.17 US 829694 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.06.03	(72) Inventor(es): DAVID DERMOT PATRICK LAFFAN GB JOHN DAVID PITTAM GB KEITH ALLAN MENEAR GB ANTHONY PETER OTTRIDGE GB DEREK JOHN LONDESBROUGH GB
(45) Data e BPI da concessão: 2011.10.12 004/2012	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, N.º 74, 4.º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FORMA POLIMÓRFICA DE 4-[3-(4-CICLOPROPANOCARBONILPIPERAZINA- 1-CARBONIL)-4-FLUOROBENZIL]-2H-FTALAZIN-1-ONA**

(57) Resumo:

4-[3-(4-CICLOPROPANOCARBONIL-PIPERAZINA-1-CARBONIL)- 4-FLUOROBENZIL]-2H-FTALAZIN-1-ONA COMO FORMA CRISTALINA.

RESUMO

"Forma polimórfica de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona"

4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona como Forma cristalina A.

DESCRIÇÃO**"Forma polimórfica de 4-[3-(4-Ciclopropanocarbonil-Piperazinil-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona"**

O presente invento refere-se a uma forma cristalina de um derivado ftalazinona particular e a composições farmacêuticas e usos da forma cristalina.

O enzima mamífero PARP (uma proteína multidomínio de 113 kDa) foi envolvida na sinalização de danos no ADN devido à sua capacidade de reconhecer e de se ligar, rapidamente, a cortes em ADN de cadeia simples ou dupla (D'Amours, *et al.*, *Biochem. J.*, **342**, 249-268 (1999)).

Diversas observações conduziram à conclusão de que PARP participa numa variedade de funções relacionadas com o ADN, incluindo amplificação genética, divisão celular, diferenciação celular, apoptose, reparação de excisão de bases de ADN e, também, tem efeito no comprimento dos telómeros e na estabilidade dos cromossomas (d'Adda di Fagagna, *et al.*, *Nature Gen.*, **23(1)**, 76-80 (1999)).

Estudos sobre o mecanismo pelo qual PARP modula a reparação de ADN e outros processos, identificaram a sua importância na formação de cadeias poli(ADP-ribose) no interior do núcleo celular (Althaus, F. R. e Richter, C., *ADP-Ribosylation of Proteins: Enzymology and Biological Significance*, Springer-Verlag, Berlim (1987)). O PARP activado, ligado a ADN, utiliza NAD para a síntese de poli(ADP-ribose) numa variedade de proteínas nucleares alvo, incluindo topo-isomerase, histonas e o próprio PARP (Rhun, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 1-10 (1998)).

A poli(ADP-ribosil)ação também foi associada à transformação maligna. Por exemplo, a actividade de PARP é maior nos núcleos isolados de fibroblastos transformados com SV40, ao passo que, tanto as células leucémicas, como as células do cancro do cólon, evidenciam maior actividade enzimática do que os leucócitos e a mucosa colónica, normais, equivalentes (Miwa, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 313-321 (1977); Burzio *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*,

149, 993-938 (1975); e Hirai, *et al.*, *Cancer Res.*, **43**, 3441-3446 (1993)).

Foi utilizado um certo número de inibidores de PARP, de massa molecular baixa, para a elucidação do papel funcional da poli(ADP-ribosil)ação na reparação do ADN. Em células tratados com agentes de alquilação, a inibição de PARP conduz a um aumento marcado de quebra da cadeia de ADN e de morte celular (Durkacz, *et al.*, *Nature*, **283**, 593-596 (1980), Berger, N. A., *Radiation Research*, **101**, 4-14 (1985)).

Subsequentemente, mostrou-se que esses inibidores intensificam os efeitos da resposta à radiação por supressão da reparação de danos potencialmente letais (Ben-Hur, *et al.*, *British Journal of Cancer*, **49** (Suppl. VI), 34-42 (1984); Schlicker, *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **75**, 91-100 (1999)). Foi referido que os inibidores de PARP são eficazes na sensibilização rádio a células tumorais hipóxicas (US 5.032.617; US 5.215.738 e US 5.041.653).

Para além disso, animais com inativação de PARP (PARP-/-) exibem instabilidade genómica em resposta a agentes de alquilação e a radiação γ (Wang, *et al.*, *Genes Dev.*, **9**, 509-520 (1995); Menissier de Murcia, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7303-7307 (1997)).

Também se evidenciou que um papel para PARP em certas doenças vasculares, choque séptico, dano isquémico e neurotoxicidade (Cantoni, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1014**, 1-7 (1989); Szabo, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **100**, 723-735 (1997)). Danos em ADN por radical oxigénio que conduz a quebras na cadeia de ADN, que são, subsequentemente, reconhecidas por PARP, é um factor contributivo principal para estados de doença como os que são mostrados por estudos de inibidor de PARP (Cosi, *et al.*, *J. Neurosci. Neurosci. Res.*, **39**, 38-46 (1994); Said, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 4688-4692 (1996)). Mais recentemente, demonstrou-se que PARP desempenha um papel na patogénese do choque hemorrágico (Liaudet, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97(3)**, 10203-10208 (2000)).

Também se evidenciou que a infecção retroviral, eficiente, de células de mamífero é bloqueada pela inibição

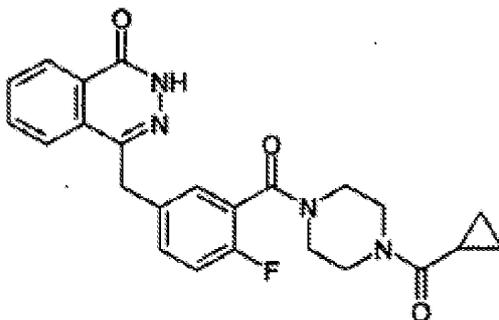
da actividade de PARP. Mostrou-se que essa inibição de infecção por vectores retrovirais recombinantes ocorre em vários tipos celulares diferentes (Gaken, et al., *J. Virology*, **70(6)**, 3992-4000 (1996)). Foram, deste modo, desenvolvidos inibidores de PARP para uso em terapias antivirais e no tratamento do cancro (WO 91/18591).

Para além disso, especulou-se que a inibição de PARP pode retardar o desencadear de características do envelhecimento em fibroblastos humanos (Rattan e Clark, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **201(2)**, 665-672 (1994)). Isto pode relacionar-se com o papel que PARP desempenha no controlo da função dos telómeros (d'Adda di Fagagna, et al., *Nature Gen.*, **23(1)**, 76-80 (1999)).

WO 2004/080976 descreve um certo número de derivados ftalazinona, a sua actividade na inibição de PARP e o seu uso consequente no tratamento do cancro, seja como um auxiliar de radioterapia ou de quimioterapia, ou como um agente individual.

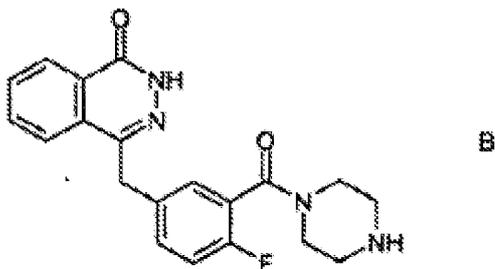
WO 2005/053662 descreve o uso de inibidores de PARP, em particular de derivados ftalazinona como inibidores da reparação de excisão de bases (BER). O uso destes inibidores no fabrico de medicamentos para o tratamento de cancros que são deficitários actividade de reparação de DSB de ADN, dependente de Recombinação Homóloga (HR), é descrito, em particular, para cancros que têm um fenótipo deficitário em BRCA1 e/ou BRCA2.

A 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) descrita em WO 2004/080976:

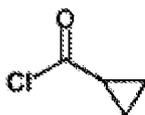


é de interesse particular.

Em WO 2004/080976, o composto A foi sintetizado como um de um certo número de compostos biblioteca a partir de 4-[4-fluoro-3-(piperazina-1-carbonil)-benzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto B):



pela adição de cloreto de ciclopropanocarbonilo:



a uma solução de (B) em diclorometano, seguida de base de Hünig (N,N-di-isopropiletilamina). Esta reacção é realizada, com agitação, à temperatura ambiente, durante 16 horas e o composto resultante é purificado por HPLC preparativa.

Formas particulares do composto A podem ter propriedades vantajosas, por exemplo, relativamente à sua solubilidade e/ou sua estabilidade e/ou sua biodisponibilidade e/ou seu perfil de impurezas e/ou suas características de filtração e/ou suas características de secagem e/ou sua falta de higroscopicidade e/ou de serem de tratamento e/ou de micronização e/ou de conformação em comprimidos mais fácil. Também se deseja possuir um método de síntese melhorado, que seja adequado para a síntese do composto A numa escala multi-grama.

Conseqüentemente, um primeiro aspecto do presente invento proporciona 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A), como Forma cristalina A, tendo o composto os seguintes picos característicos num padrão de difracção de raios X de pó ($\lambda=1,541 \text{ \AA}$):

Pico	$2\theta^\circ (\pm 0,1^\circ)$
1	12,0
2	17,8
5	21,1
4	22,3
5	29,2

O composto A como forma cristalina A pode, também, ter os seguintes picos adicionais, num padrão de difracção de raios X ($\lambda=1,541 \text{ \AA}$)

Pico	$2\theta^\circ (\pm 0,1^\circ)$
6	10,5
7	14,0
8	21,7
9	24,3
10	26,1

O composto A como Forma cristalina A pode, também, ser caracterizado por qualquer combinação de três ou mais picos seleccionados de entre a lista dos 10 picos anteriores.

Um padrão de XRD, representativo, de pó do composto A como Forma A é apresentado na Figura 3.

Sem pretender ficar limitado pela teoria, o composto A consegue, prontamente, formar uma estrutura em que moléculas de solvente podem ocupar posições na matriz cristalina. Esses solvatos, não necessariamente de natureza estequiométrica, podem consistir num solvato puro (e.g. metanolato do Composto A e tetra-hidrofuranato do Composto A) ou podem, potencialmente, consistir em mais do que um componente de solvente (e.g. metanol e éter dietílico). As moléculas de solvente localizam-se, tipicamente, em bolsas criadas pelas moléculas do Composto A. Em certos casos, o volume destas bolsas é suficientemente flexível para incorporar uma gama de solventes, resultando numa pequena alteração da estrutura global do material e, deste modo, em apenas pequenos desvios nas reflexões de XRPD.

Solvatos, incluindo os que partilham a mesma estrutura global, têm origem em experiências de maturação de solução e de cristalização a partir de diclorometano, acetato de etilo, metanol etanol isopropanol, 2-butanona, éter t-butilmetílico,

tolueno, tetra-hidrofurano, água, ciclo-hexano, ciclopropil-metil-cetona, 1,2-dicloroetano, trifluoracetato de etilo, fluorobenzeno-hexafluoro-iso-propanol, éter metil-nonafluoro-butílico, 2-metil-1-propanol, nitrometano, propionitrilo, tricloroetileno, $\alpha\alpha$ -triclorotolueno, heptano, dioxano, acetonitrilo, seja como solventes puros ou quando combinados com outro solvente. O padrão de difracção de raios X da estrutura do solvato, mais comum, é apresentada na Figura 4 e, tipicamente, tem os picos mais intensos nas posições listadas seguidamente:

Pico	$2\theta^\circ (\pm 0,1^\circ)$ ($\lambda=1,541 \text{ \AA}$)
1	7,0-7,5
2	10,1-10,6
3	15,1-15,6
4	18,5-19,0
5	21,0-21,5
6	24,8-25,3
7	27,0-27,5

Entende-se que as intensidades relativas dos picos apresentados nas figuras, podem variar de acordo com a orientação da amostra em teste e com o tipo e ajustamento do instrumento usado, de modo que as intensidades nos registos XRD aqui incluídos são ilustrativas e não se pretende que sejam usados para comparação absoluta.

A Forma A do composto A está substancialmente isenta de solvente. A expressão "substancialmente isenta de solvente", tal como aqui utilizada, refere-se à forma contendo apenas quantidades insignificantes de qualquer solvente, e.g. uma forma com um total de 0,5% ou menos, em peso, de qualquer solvente. A quantidade total de qualquer solvente, incluindo água, pode ser de 0,25%, 0,1%, 0,05% ou 0,025% em peso, ou menos.

A Forma A do composto A pode, também, ser caracterizada usando DSC. A Forma A do composto A quando aquecida de 25°C a 325°C, a 10°C por minuto, entrará em fusão a 210,1°C \pm 1°C. Um registo DSC, representativo, para o composto A como Forma A é apresentado na Figura 5.

O segundo aspecto do presente invento proporciona um método de obtenção de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) como Forma cristalina A que compreende cristalizar o composto A num solvente e, depois, deslocar o solvente da forma cristalina com um agente de deslocamento. O agente de deslocamento pode ser água ou uma mistura de um álcool C₁₋₂ e água.

Numa primeira concretização, este método compreende os passos de:

- (i) cristalização de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) a partir de um solvente;
- (ii) se o solvente original não for etanol, tratamento do composto A, cristalino, com etanol;
- (iii) tratamento do composto A cristalino com água para remoção do etanol aprisionado;
- (iv) secagem do produto resultante.

O solvente usado na cristalização original pode ser, por exemplo, diclorometano ou acetonitrilo.

Os métodos para obtenção da Forma A podem, geralmente, envolver a substituição de solvente. Verificou-se que o composto A cristaliza de um modo tal que são formados canais na matriz cristalina que podem aprisionar solventes, tornando-os difíceis de remover.

O método da primeira concretização pode ser usado, em particular, se o solvente usado na cristalização do composto A for diclorometano. O passo de permuta do diclorometano, como um solvente, com etanol, como um solvente, pode ser realizado por destilação da solução do composto A, à pressão atmosférica na presença de etanol. A permuta está completa quando a temperatura de cabeça se aproximar do ponto de ebulição do etanol, e.g. pelo menos 73°C. Em particular, a permuta pode ser realizada por destilação da maior parte do DCM e, depois, adição de um volume de etanol. A destilação é, então, continuada, com a substituição das cargas de destilado por volumes iguais de etanol.

A cristalização do composto A a partir do solvente etanol pode ser realizada por arrefecimento da solução abaixo de 15°C, preferivelmente, a menos do que 10°C e, mais preferivelmente, a cerca de 8°C. Os cristais do composto A podem, então, ser removidos da solução por filtração.

O composto A cristalino pode ser tratado com água para a remoção do etanol aprisionado pelo material cristalino em suspensão e aquecimento ao refluxo, durante um período de tempo suficiente, por exemplo, pelo menos três horas, e preferivelmente, durante cerca de quatro horas. O composto A cristalino pode ser removido da suspensão em água por filtração.

A secagem do produto resultante do passo anterior é conseguida prontamente. Por exemplo, por aquecimento do produto num forno a uma temperatura de, pelo menos, 60°C, preferivelmente a cerca de 70°C.

Numa outra concretização, o método compreende os passos de:

- (i) cristalização do composto A a partir de um solvente;
- (ii) se o solvente original usado na síntese do composto A na forma cristalina não for uma mistura de água e de um álcool C₁₋₂ (i.e. metanol, etanol), tratamento do composto A na forma cristalina com uma mistura de água e de um álcool C₁₋₂;
- (iii) destilação da mistura à pressão ambiente;
- (iv) secagem do produto resultante.

O produto resultante pode ser tratado, adicionalmente, com uma mistura de água e de um álcool C₁₋₂ e seco, de modo a se isolar, adicionalmente, o composto A na Forma cristalina A.

A mistura de água e de álcool C₁₋₂ está, preferivelmente, na gama de 2:1 a 1:2 em volume e, mais preferivelmente, de 1,5:1 a 1:1,5 em volume. Uma mistura particularmente preferida consiste em 1 parte de água para 1,2 partes de álcool C₁₋₂. Outra mistura particularmente preferida consiste em 2 partes de água para 1 parte de álcool C₁₋₂. O álcool C₁₋₂ é, preferivelmente, etanol.

O tratamento com solvente no passo (ii) pode ser realizado por suspensão do composto A na mistura de água e de álcool C_{1-2} e aquecimento ao refluxo com agitação. Isto pode ser seguido por arrefecimento a entre 55 e 65°C e filtração, e.g. através de uma almofada de celite. A almofada de filtração pode ser lavada com uma mistura de água e de um álcool C_{1-2} antes do passo (iii) de destilação à pressão ambiente (usualmente 1 atm). A destilação pode ser parada para originar uma suspensão que é deixada à temperatura ambiente antes da filtração subsequente. O bolo de filtração resultante pode ser lavado com água.

A secagem do produto resultante do passo anterior é prontamente conseguida. Por exemplo, por aquecimento do produto num forno a uma temperatura de pelo menos 50°C, preferivelmente, a cerca de 60°C.

O tratamento adicional pode decorrer de um modo semelhante ao descrito acima.

Numa terceira concretização, o método compreende:

- (i) suspensão do composto A numa mistura de água e de um álcool C_{1-2} como solvente;
- (ii) aquecimento da suspensão ao refluxo;
- (iii) arrefecimento da solução e sementeira com composto A como Forma A.
- (iv) secagem do produto resultante.

O produto resultante pode ser tratado, adicionalmente, com uma mistura de água e de um álcool C_{1-2} e seco de modo a isolar, adicionalmente, o composto A numa Forma cristalina A.

A mistura de água e álcool C_{1-2} está, preferivelmente, na gama de 2:1 a 1:5 em volume e, mais preferivelmente, 1:2 a 1:4 em volume. Uma mistura particularmente preferida consiste em 1 parte de água para 3 partes de álcool C_{1-2} . O álcool C_{1-2} é, preferivelmente, etanol.

O passo (iii) pode compreender o arrefecimento da solução até entre 65 e 75°C (e.g. 70°C) e filtração, e.g. através de uma almofada e celite. A almofada de filtragem

pode ser lavada com uma mistura de água e de álcool C₁₋₂ antes de destilação (e.g. à pressão ambiente ou acima). A sementeira pode ocorrer depois de o filtrado resultante ter sido arrefecido a entre 40 e 50°C (e.g. 45°C). A suspensão resultante pode ser arrefecida à temperatura ambiente (e.g. 20°C) em entre 2 a 3 horas (e.g. 2,5 horas) e mantida à referida temperatura durante o tempo suficiente para se estabelecer cristalização. Isto pode ocorrer entre 12 e 24 horas e pode ocorrer durante 16 horas. No fim deste período, pode ser adicionada água adicional. A quantidade pode ser igual ao volume do solvente total (água e álcool C₁₋₂) presente e pode ser adicionada lentamente, por exemplo, durante um período de 4 a 6 (e.g. 5) horas. A suspensão pode ser mantida à temperatura ambiente após a adição da água, por exemplo durante 2 horas.

A suspensão pode, então, ser filtrada e o bolo de filtração resultante ser lavado com uma mistura de álcool C₁₋₂ e de água (numa razão entre 1:3 e 1:2, e.g. 1:2,5).

A secagem do produto do passo anterior pode ser conseguida prontamente. Por exemplo, por aquecimento do produto num forno, sob vácuo, a uma temperatura de entre 40 e 60°C.

Um terceiro aspecto do presente invento proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um composto do primeiro aspecto e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Um quarto aspecto do presente invento proporciona um composição do primeiro aspecto para uso num método de tratamento do corpo humano ou animal.

Aspectos adicionais do invento proporcionam o uso de um composto tal como definido no primeiro aspecto do invento, na preparação de um medicamento para o tratamento de: doença vascular, choque séptico, dano isquémico, neurotoxicidade, choque hemorrágico, infecção viral, ou doenças passíveis de melhoras pela inibição da actividade de PARP.

Outro aspecto adicional do invento proporciona o uso de um composto, tal como definido no primeiro aspecto do

invento, na preparação de um medicamento para uso como um auxiliar na terapia do cancro ou para a potenciação de células tumorais para tratamento com radiação ionizante ou agentes quimioterapêuticos.

Em aspectos adicionais do presente invento, os compostos podem ser usados na preparação de um medicamento para o tratamento de cancro que é deficitário em actividade de reparação de ADN, dependente de Recombinação Homóloga (HR), compreendendo administrar ao referido paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto.

A via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR, repara quebras na cadeia dupla (DSB) no ADN através de mecanismos homólogos para a reformação de uma hélice dupla de ADN (K. K. Khanna e S. P. Jackson, *Nat. Genet.* 27(3): 247-254(2001)). Os componentes da via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR, incluem, mas não estão limitados a ATM (NM_000051), RAD51 (NM_002875), RAD51L1 (NM_002877), RAD51C (NM_002876), RAD51L3 (NM_002878), DMC1 (NM_007068), XRCC2 (NM_005431), XRCC3 (NM_005432), RAD52 (NM_002879), RAD54L (NM_003579), RAD54B (NM_012415), BRCA1 (NM_007295), BRCA2 (NM_000059), RAD50 (NM_005732), MRE11A (NM_005590) e NBS1 (NM_002485). Outras proteínas envolvidas na via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR, incluem factores reguladores como EMSY (Hughes-Davies, *et al.*, *Cell*, **115**, pp 523-535). Componentes de HR são, também, descritos em Wood, *et al.*, *Science*, **291**, 1284-1289, (2001).

Um cancro com défice em reparação de DSB de ADN, dependente de HR, pode compreender ou consistir em uma ou mais células cancerígenas que tenham uma capacidade reduzida ou anulada de reparar DSB de ADN através dessa via, relativamente a células normais, *i.e.* a actividade da via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR, pode estar reduzida ou ter ser anulada numa ou mais células cancerígenas.

A actividade de um ou mais componentes da via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR, pode estar abolida em uma ou mais células cancerígenas de um indivíduo com um cancro que é deficitário em reparação de DSB de ADN, dependente de HR. Os componentes da via de reparação de DSB

de ADN, dependente de HR, estão bem caracterizados na arte (ver, por exemplo, Wood, *et al.*, *Science*, **291**, 1284-1289 (2001)) e incluem os componentes listados acima.

Em algumas concretizações preferidas, a células cancerígenas podem ter um fenótipo deficitário em BRCA1 e/ou BRCA2, *i.e.* a actividade de BRCA1 e/ou de BRCA2 estar reduzida ou foi abolida nas células cancerígenas. As células cancerígenas com este fenótipo podem ser deficitárias em BRCA1 e/ou BRCA2, *i.e.* a expressão e/ou actividade de BRCA1 e/ou BRCA2 pode estar reduzida ou ter sido abolida nas células cancerígenas, por exemplo, por meio de mutação ou polimorfismo na codificação de ácido nucleico ou por meio de amplificação, mutação ou polimorfismo num gene que codifica um factor de regulação, por exemplo, o gene EMSY que codifica um factor de regulação de BRCA2 (Hughes-Davies, *et al.*, *Cell*, **115**, 523-535).

BRCA1 e BRCA2 são supressores tumorais conhecidos cujos alelos de tipo selvagem são, frequentemente, perdidos em tumores de portadores heterozigóticos (Jasin, M., *Oncogene*, **21(58)**, 8981-93 (2002); Tutt, *et al.*, *Trends Mol Med.*, **8(12)**, 571-6 (2002)). A associação de mutações de BRCA1 e/ou BRCA2 com o cancro da mama está bem caracterizada na arte (Radice, P. J., *Exp Clin Cancer Res.*, **21(3 Supl)**, 9-12 (2002)). Também se sabe que a amplificação do gene EMSY, que codifica um factor de ligação a BRCA2, está associada ao cancro da mama e do ovário.

Os portadores de mutações em BRCA1 e/ou BRCA2 apresentam, também, risco elevado de cancro do ovário, da próstata e do pâncreas.

Em algumas concretizações preferidas, o indivíduo é heterozigótico para uma ou mais variações, como mutações e polimorfismos, em BRCA1 e/ou BRCA2 ou num seu regulador. A detecção de variação em BRCA1 e BRCA2 é bem conhecida na arte e está descrita, por exemplo, em EP 699754, EP 705903, Neuhausen, S. L. e Ostrander, E. A., *Genet. Test*, **1**, 75-83 (1992); Chappnis, P. O. e Foulkes, W. D., *Cancer Treat Res*, **107**, 29-59 (2002); Janatova M., *et al.*, *Neoplasma*, **50(4)**, 246-50 (2003); Jancarkova, N., *Ceska Gynekol.*, **68(1)**, 11-6 (2003)). A determinação de amplificação do factor de ligação EMSY de BRCA2 é descrita em Hughes-Davies, *et al.*, *Cell*, **115** 523-535).

Mutações e polimorfismos associados com o cancro podem ser detectados, ao nível de ácido nucleico, através da detecção da presença de uma sequência de ácido nucleico variante ou, ao nível proteico, pela detecção da presença de um polipéptido variante (i.e. uma variante alélica ou mutante).

Breve Descrição das Figuras

A Fig. 1 apresenta a RMN de um composto A após tratamento com água (exemplo 1);

A Fig. 2 apresenta o padrão de XRD de pó do composto A na Forma A após tratamento com água (exemplo 1);

A Fig. 3 apresenta um padrão de XRD de pó, representativo, de composto A na Forma A;

A Fig. 4 apresenta um padrão de XRD de pó, representativo, de composto A na forma solvatada;

A Fig. 5 apresenta um gráfico de DSC representativo do composto A como Forma A, obtido por aquecimento de 25°C a 325°C a 10°C por minuto.

Uso

O presente invento proporciona composto A como Forma A como um composto activo, especificamente, activo na inibição da actividade de PARP.

O termo "activo" tal como aqui usado, refere-se ao composto que é capaz de inibir a actividade de PARP. Um ensaio que pode, convenientemente, ser usado para avaliar a inibição de PARP oferecida pelo composto é descrito nos exemplos seguintes.

O presente invento proporciona, adicionalmente, um método para a inibição da actividade de PARP, numa célula, compreendendo contactar a referida célula com uma quantidade eficaz do composto activo, preferivelmente na forma de uma composição farmacologicamente aceitável. Esse método pode ser executado *in vitro*.

Por exemplo, pode ser desenvolvida *in vitro* uma amostra de células e o composto activo ser posto em contacto com as

referidas células e o efeito do composto sobre essas células ser observado. Como exemplos de "efeito", pode ser determinada a quantidade de reparação de ADN efectuada durante um certo tempo. Quando se verificar que o composto activo exerce uma influência nas células, este facto pode ser utilizado como um marcador de prognóstico ou de diagnóstico, da eficácia do composto em métodos de tratamento de um paciente portador de células do mesmo tipo celular.

O termo "tratamento", tal como aqui utilizado no contexto do tratamento de uma condição, refere-se, geralmente, ao tratamento e terapia, seja de um humano ou de um animal (e.g., em aplicações veterinárias), nos quais se consegue algum efeito terapêutico desejado, por exemplo, a inibição do progresso da condição e inclui uma redução na taxa de progressão, uma paragem da taxa de progressão, a melhoria da condição e a cura da condição. Também está incluído o tratamento como uma medida profilática (e.g. profilaxia).

O termo "auxiliar", tal como aqui utilizado, refere-se ao uso do composto activo em conjunto com meios terapêuticos conhecidos. Esses meios incluem regimes citotóxicos de drogas e/ou de radiação ionizante, tal como usados no tratamento de diferentes tipos de cancro. Em particular, os compostos activos são conhecidos por potenciarem as acções de um certo número de tratamentos de quimioterapia de cancros, que incluem a classe dos venenos de topo-isomerase (e.g. topotecano, irinotecano, rubitecano), a maior parte dos agentes alquilantes (e.g. DTIC, temozolamida) e drogas à base de platina (e.g. carboplatina, cisplatina) utilizadas no tratamento do cancro.

O composto activo também pode ser usado como aditivo de cultura celular para a inibição de PARP, por exemplo, de modo a sensibilizarem células a agentes quimioterapêuticos conhecidos ou tratamento com radiação ionizante *in vitro*.

O composto também pode ser usado como parte de um ensaio *in vitro*, por exemplo, para a determinar se um hospedeiro candidato irá, provavelmente, beneficiar do tratamento com o composto em questão.

Administração

O composto activo ou a composição farmacêutica compreendendo o composto activo podem ser administrados a um sujeito por qualquer via conveniente de administração, seja sistemicamente/periféricamente ou no local da acção desejada, incluindo, mas sem lhe estar limitada, administração oral (e.g. por ingestão); tópica (incluindo transdérmica, intranasal, ocular, bucal e sublingual); pulmonar (e.g., por inalação ou terapia de insuflação utilizando, e.g. um aerossol, e.g. através da boca ou do nariz); rectal; vaginal; parentérica, por exemplo, por injeccção, incluindo subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intracardiaca, intratecal, intraspinal, intracapsular, subcapsular, intra-orbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intra-articular, subaracnóide e intraesternal; por implante, como um depósito, por exemplo, subcutaneamente ou intramuscularmente.

O sujeito pode ser um eucariota, um animal, um animal vertebrado, um mamífero, um roedor (e.g. uma cobaia, um hamster, uma ratazana, um ratinho), murino (e.g. um ratinho), canino (e.g. um cão), felino (e.g. um gato), equino (e.g. um cavalo), um primata, símio (e.g. macaco ou grande símio), um macaco (e.g. sagui, babuíno), um grande símio (e.g., gorila, chimpanzé, orangotango, gibão), ou um humano.

Formulações

Embora seja possível administrar o composto activo sozinho, é preferível apresentá-lo como uma composição farmacêutica (e.g. formulação) compreendendo o composto activo, tal como definido acima, em conjunto com um ou mais portadores, adjuvantes, excipientes, diluentes, cargas, tampões, estabilizantes, conservantes, lubrificantes, ou outros materiais farmacêuticamente aceitáveis, bem conhecidos dos peritos na técnica e, opcionalmente, outros agentes terapêuticos ou profiláticos.

Deste modo, o presente invento compreende adicionalmente composições farmacêuticas, tal como definido acima, e métodos para a produção de uma composição farmacêutica compreendendo

misturar o composto activo, tal como definido acima, em conjunto com um ou mais portadores, excipientes, tampões, adjuvantes, estabilizantes ou outros materiais farmacologicamente aceitáveis, tal como aqui descrito, de modo que o composto activo se mantenha na Forma cristalina A.

A expressão "farmacologicamente aceitável", tal como aqui usada refere-se a compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, no âmbito julgamento médico avisado, adequados para uso em contacto com os tecidos de um sujeito (e.g. humano) sem toxicidade, irritação ou resposta alérgica, excessivas, outro problema ou complicação, compatível como uma razoável razão benefício/risco. Cada portador, excipiente, etc., de, também, ser "aceitável" no sentido de ser compatível como os outros ingredientes da formulação.

Podem ser encontrados portadores, diluentes, excipientes, etc., aceitáveis nos textos farmacêuticos correntes. Ver, por exemplo, "Handbook of Pharmaceutical Additives", 2ª Edição (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nova Iorque), "Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edição, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; e "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª edição, 1994.

As formulações podem, convenientemente, ser apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na arte da farmácia. Esses métodos incluem o passo de associar o composto activo com o portador que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas por associação íntima e uniforme do composto activo com portadores líquidos ou portadores divididos finamente ou ambos e, depois, se necessário conformação do produto.

As formulações podem estar na forma de suspensões, comprimidos, grânulos, pós, cápsulas, hóstias, pílulas ou pastas.

Formulações adequadas para administração oral (e.g. por ingestão) podem ser apresentadas como unidades discretas,

como cápsulas, hóstias ou comprimidos, cada um contendo uma quantidade predeterminada do composto activo; como pós ou grânulos; como uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso; ou como uma pasta.

Um comprimido pode ser produzido por meios convencionais, e.g. compressão ou moldagem, opcionalmente como um ou mais ingredientes acessórios. Comprimidos que são comprimidos podem ser preparados por compressão, numa máquina adequada, do composto activo numa forma de elevada fluidez como um pó ou grânulos, misturados, opcionalmente, como um ou mais ligantes (e.g. povidona, gelatina, acácia, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulose); cargas ou diluentes (e.g. lactose, celulose microcristalina, hidrogenofosfato de cálcio); lubrificantes (e.g. estearato de magnésio, talco, sílica); desintegrantes (e.g. amidoglicolato de sódio, povidona reticulada, carboximetilcelulose de sódio reticulada); agentes tensioactivos ou dispersantes e humectantes (e.g. laurilsulfato de sódio) e conservantes (e.g. p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico). Comprimidos moldados podem ser produzidos por moldagem, numa máquina adequada, de uma mistura do composto em pó, humedecido com um líquido diluído inerte. Os comprimidos podem, opcionalmente, ser revestidos ou ranhurados, e podem ser formulados de modo a proporcionarem libertação lenta ou controlada do seu composto activo utilizando, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose em proporções variáveis, para proporcionar o perfil de libertação desejado. Os comprimidos podem, opcionalmente, ser dotados de um revestimento entérico, para proporcionarem libertação em partes do tracto gastrintestinal, que não o estômago.

Uma cápsula pode incluir o composto activo em suspensão.

Formulações adequadas para administração tópica (e.g. transdérmica, intranasal, ocular, bucal e sublingual) podem ser formuladas como uma pasta.

Formulações adequadas para administração tópica ao olho também incluem gotas oculares em que o composto activo é suspenso num portador adequado, especialmente um solvente aquoso para o composto activo.

Formulações adequadas para administração nasal, em que o portador é sólido, incluem um pó grosseiro com um tamanho de partícula, por exemplo, na gama de cerca de 20 a cerca de 500 micra, que é administrado do modo em que o rapé é tomado, *i.e.* por inalação rápida através da passagem nasal, a partir de um recipiente para o pó, colocado perto do nariz.

Formulações adequadas para administração por inalação incluem as apresentadas como uma pulverização em aerossol a partir de uma embalagem pressurizada, com a utilização de um propulsor adequado, como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outros gases adequados.

Dosagem

Será evidente que as dosagens adequadas do composto activo e de composições que compreendem o composto activo, podem variar de paciente para paciente. A determinação da dosagem óptima envolverá, geralmente, o equilíbrio entre o nível do benefício terapêutico relativamente a qualquer risco ou efeitos secundários, prejudiciais, dos tratamentos do presente invento. O nível de dosagem seleccionado dependerá de uma variedade de factores incluindo, mas sem lhes estar limitado, a actividade do composto em particular, a via de administração o tempo de administração, a taxa de excreção do composto, a duração do tratamento, outras drogas, compostos e/ou materiais usados em combinação e a idade, sexo, peso, condição, saúde em geral e história médica anterior do paciente. A quantidade do composto e a via de administração será, em última instância, da competência do médico, embora, em geral, a dosagem deva conseguir concentrações locais, no sítio da acção, que atinjam os efeitos desejados sem provocarem substanciais efeitos secundários nocivos ou prejudiciais.

A administração *in vivo* pode ser realizada numa dose, continuamente ou intermitentemente (*e.g.* em doses divididas a intervalos adequados), durante o curso do tratamento. Métodos para a determinação do meio e da dosagem da administração mais eficazes são bem conhecidos dos peritos na arte e variam com a formulação usada para a terapia, o fim da terapia, a célula alvo em tratamento e o sujeito em tratamento. Podem ser

HPLC-MS Analítica

Foi realizada HPLC analítica com uma bomba Spectra System P4000 e coluna Jones Genesis C18 (4 µm, 50 mm x 4,6 mm). Foram usadas as fase móveis A (ácido fórmico a 0,1% em água) e B (acetonitrilo) num gradiente de 5% de B durante 1 minuto, aumentando para 98% de B após 5 minutos, mantido durante 3 minutos, a um caudal de 2 ml/minuto. A detecção foi feita com um detector TSP UV 6000LP a 254 nm UV e gama de 210-600 nm PDA. O espectrómetro de massa foi um Finnigan LCQ operando num modo de electropulverização de iões positivos.

RMN

Os espectros de ¹H RMN foram registados usando um espectrómetro Bruker DPX 300 a 300 MHz. Os desvios químicos foram registados em partes por milhão (ppm) na escala δ relativamente ao padrão interno tetrametilsilano. A menos que seja referido de outro modo, todas as amostras foram dissolvidas em DMSO-d₆.

(a) Éster terc-butílico de ácido 4-[2-fluoro-5-(4-oxo-3,4-dihidroftalazin-1-ilmetil)-benzoíl]-piperazina-1-carboxílico (C)

A uma solução agitada do material de partida D (850 g) em dimetilacetamida (DMA) (3561 ml), à temperatura ambiente, sob azoto, foi adicionado HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio) (1402 g) numa porção. Foi então adicionada base de Hünig (iPr₂NET, 1096 ml), tendo a temperatura sido mantida entre 15 a 25°C, seguindo-se uma solução de 1-Boc-piperazina (637 g) in DMA (1428 ml), com a temperatura mantida entre 15 a 25°C.

A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas e foi testada quanto à terminação (HPLC). Quando se considerou terminada, a solução foi adicionada a água agitada vigorosamente (17085 ml), sendo a temperatura mantida entre 15 a 25°C e o sólido removido por filtração, lavado com água (2 x 7131 ml), hexano (2 x 7131 ml) e éter metil-terc-butílico (MTBE) (2 x 3561 ml). O sólido foi, então, seco durante a noite e, depois, foi testado quanto ao teor em água e pureza química.

Esta reacção foi então repetida, ver tabela:

Carga	Rendimento (g)	Pureza (% Área de HPLC)	Teor em água (K.F.)	Rendimento corrigido
1	1571,3	86,80	24,3	1032,5 g (78%)
2	2781,6	85,00	40,3	1411,5 g (106%)

Um rendimento superior a 100% é atribuído a amostragem não representativa

(b) *4-[4-Fluoro-3-(piperazina-1-carbonil)-benzil]-2H-ftalazin-1-ona (B)*

A uma solução agitada de álcoois desnaturados industriais (IMS), em (2200 ml) e HCl concentrado (4400 ml) foi adicionado composto C (2780,2 g), em porções, à temperatura ambiente, sob azoto, tendo a formação de espuma sido controlada pela taxa de adição. A solução foi, então, agitada a de 15 a 25°C durante 30 minutos e foi testada quanto à terminação (HPLC).

Quando considerada terminada, a solução foi evaporada para a remoção de qualquer IMS e a fase aquosa foi extractada com CH₂Cl₂ (2 x 3500 ml), antes do pH ser ajustado a >8 usando amónia concentrada. A lama resultante foi, então, diluída com água (10000 ml) e extractada com CH₂Cl₂ (4 x 3500 ml), lavada com água (2 x 2000 ml), seca sobre MgSO₄ (250 g) e evaporada. O produto em bruto foi transformado numa lama em CH₂Cl₂ (3500 ml) e foi adicionado a MTBE (5000 ml). A suspensão resultante foi filtrada e seca a 50°C, durante a noite, originando 611,0 g (58,5% de rendimento) do material com uma a pureza de 94,12%.

(c) *4-[3-(4-Ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (A)*

A uma suspensão agitado do composto B (1290 g) em CH₂Cl₂ (15480 ml), sob azoto, foi adicionada, gota a gota, uma solução pré-misturada de trietilamina (470 ml) e cloreto de ciclopropano-carbonilo (306 ml) in CH₂Cl₂ (1290 ml), com a temperatura mantida abaixo de 20°C. A solução foi, então, agitada a 10-15°C durante 15 minutos e foi testada quanto à terminação. Verificou-se que mistura reaccional continha apenas 1,18% do material de partida B e, deste modo,

considerou-se que a reacção estava completa e a carga foi, então, processada.

A mistura reaccional foi lavada com água (7595 ml), solução de ácido cítrico a 5% (7595 ml), solução de carbonato de sódio a 5% (7595 ml) e água (7595 ml). A camada orgânica foi, então, seca sobre sulfato de magnésio (500 g).

A camada de CH_2Cl_2 contendo o produto foi, então, isolada, filtrada através de Celite e carregada num vaso de 25 l. O CH_2Cl_2 (8445 ml) foi, então, removido por destilação à pressão atmosférica e foi adicionado etanol (10000 ml). A destilação foi, depois, continuada, sendo cada 4000 ml de destilado removido substituído por etanol (4000 ml) até a temperatura de cabeça atingir $73,7^\circ\text{C}$. O volume reaccional foi, depois, reduzido (a 7730 ml), altura em que a temperatura de cabeça tinha atingido $78,9^\circ\text{C}$, deixando-se a solução arrefecer até 8°C , durante a noite. O sólido foi, depois, removido por filtração, lavado com etanol (1290 ml) e seco a 70°C , durante a noite.

Rendimento = 1377,3 g (90%). Pureza por HPLC (99,34% [% de área]). Continha 4,93% de etanol e 0,45% de CH_2Cl_2 por GC.

(d) Tratamento com água do Composto A

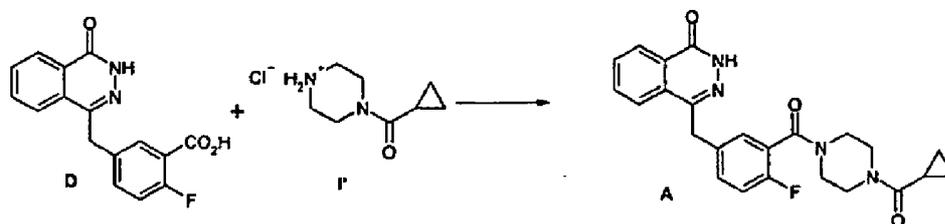
Uma suspensão do composto A (1377,0 g), tal como produzido pelo método do Exemplo 1, em água (13770 ml), foi aquecida ao refluxo durante 4 horas, arrefecida à temperatura ambiente e filtrada. O sólido foi lavado com água (2754 ml) e foi seco a 70°C durante a noite.

Rendimento = 1274,8 g (92,6%). Pureza por HPLC (99,49% [% de área]). Continha 0,01% de etanol e 0,01% de CH_2Cl_2 por GC.

O espectro de ^1H RMN do composto A (DMSO- d_6) seguindo-se a tratamento com água é apresentado na Figura 1.

O padrão de XRD de pó do composto A, seguindo-se a tratamento com água é apresentado na Figura 2, que mostra que o composto está na Forma A.

Exemplo 2: Síntese alternativa do Composto A usando o sal de HCl de 1-(ciclopropilcarbonil)piperazina



(a) Sal de HCl de 1-(ciclopropilcarbonil)piperazina (I')

Tratou-se ácido acético (700 ml) com piperazina (50,00 g, 0,581 mol), em porções, durante 15 minutos com agitação, sob azoto. A mistura reaccional foi aquecida a 40°C e foi mantida a esta temperatura até obtenção de uma solução completa. Foi adicionado cloreto de ciclopropanocarbonilo (59,2 ml, 0,638 mol), durante 15 minutos. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura reaccional foi filtrada e o filtrado foi destilado sob pressão reduzida até terem sido recolhidos ~430 ml de destilados. Foi carregado tolueno (550 ml) na mistura reaccional e a destilação a pressão reduzida foi prosseguiu até terem sido recolhidos mais 400 ml de destilados. Foi adicionada uma carga adicional de tolueno (550 ml) e a destilação a pressão reduzida foi continuada até terem sido recolhidos 350 ml de destilados. A lama resultante foi diluída com tolueno (200 ml) e foi agitada durante a noite. Foi adicionado mais tolueno (500 ml) de modo a mobilizar a lama. A lama foi filtrada, lavada com tolueno (100 ml) e seca *in vacuo* a 40°C para originar o composto em título como um sólido branco sujo (86,78 g).

Espectro de massa: MH⁺ 155

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ: 0,92 (m, 4H), 1,98 (m, 1H), 3,29 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,84 (m, 2H), 4,08 (m, 2H).

(b) Composto A

Suspendeu-se ácido 2-fluoro-5-[(4-oxo-3,4-di-hidro-ftalazin-1-il)metil]benzóico (D) (0,95 g, 3,19 mmol), com agitação, sob azoto, em acetonitrilo (4 ml). Adicionou-se hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetra-metilurónio (HBTU) (1,45 g, 3,83 mmol), seguindo-se sal de

HCl de 1-ciclopropilcarbonilpiperazina (I') (0,73 g, 3,83 mmol). Foi adicionada di-isopropiletilamina (1,39 ml, 7,98 mmol) durante 3 minutos e a mistura reaccional foi agitada durante a noite, à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi arrefecida a 5°C e foi mantida a esta temperatura durante 1 hora, antes de ser filtrada. O bolo filtrado foi lavado com acetoneitrilo (2 ml) frio (3°C), antes de ser seco *in vacuo*, a até 40°C, para originar o composto em título como um sólido amarelo claro (0,93 g).

(c) Recristalização do composto A de metanol

O composto A (9,40 g, 21,64 mmol) do passo (b) foi suspenso numa mistura de água (100 ml) e de metanol (120 ml). A suspensão foi aquecida ao refluxo, com agitação. A solução turva produzida, foi, então, arrefecida a 60°C e foi filtrada através de uma almofada de harborlite. A almofada de filtragem foi lavada com uma mistura de água (5 ml) e de metanol (5 ml). O filtrado foi destilado à pressão atmosférica até terem sido recolhidos 115 ml de destilado. Parou-se, então, a destilação e a suspensão produzida foi, então, deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A suspensão resultante foi agitada durante ~18 horas, antes de ser filtrada. O bolo filtrado foi lavado com água (20 ml), antes de ser seco *in vacuo* a até 60°C, para originar o composto em título na Forma A, como um sólido branco (8,67 g).

Espectro de massa: MH⁺ 435

1H RMN (400MHz, DMSO-d₆) δ: 0,70 (m, 4H), 1,88 (largo s, 1H), 3,20 (largo s, 2H), 3,56 (m, 6H), 4,31 (s, 2H), 7,17 (t, 1H), 7,34 (dd, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,77 (dt, 1H), 7,83 (dt, 1H), 7,92 (d, 1H), 8,25 (dd, 1H), 12,53 (s, 1H).

(d) Recristalização do composto A de etanol aquoso

O composto A (9,40 g, 21,64 mmol) do passo (b) foi suspenso numa mistura de água (100 ml) e de etanol (50 ml). A suspensão foi aquecida ao refluxo com agitação. A solução turva produzida foi, então, arrefecida a 60°C e filtrada através de uma almofada de harborlite. A almofada filtrante foi lavada com uma mistura de água (5 ml) e de etanol (5 ml). O filtrado foi destilado à pressão atmosférica até terem sido

recolhidos 53 ml de destilado. A destilação foi, então, parada e a suspensão produzida foi deixada arrefecer até à temperatura ambiente. A suspensão resultante foi agitada durante ~18 horas, antes de ser filtrada. O bolo filtrado foi lavado com água (20 ml), antes de ser seco *in vacuo* a 60°C para originar o composto em título na Forma A como um sólido branco (8,74 g).

Espectro de Massa: MH+ 435

1H RMN (400MHz, DMSO-d6) δ : 0,70 (m, 4H), 1,88 (largo s, 1H), 3,20 (largo s, 2H), 3,56 (m, 6H), 4,31 (s, 2H), 7,17 (t, 1H), 7,34 (dd, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,77 (dt, 1H), 7,83 (dt, 1H), 7,92 (d, 1H), 8,25 (dd, 1H), 12,53 (s, 1 H).

Exemplo 3: Recristalização do Composto A de etanol aquoso

Suspendeu-se 4-(3-{[4-(ciclopropilcarbonil)piperazin-1-il]carbonil}-4-fluorobenzil)ftalazin-1(2H)-ona (composto A) (20,00 g, 44,66 mmol) numa mistura de água (50 ml) e de etanol (150 ml). A suspensão foi aquecida ao refluxo com agitação. A solução produzida foi, então, arrefecida a 70°C e foi filtrada. A almofada de filtragem foi lavada com uma mistura de água (8 ml) e de etanol (22 ml).

O filtrado foi arrefecido a 45°C com agitação. Foi adicionado 4-(3-{[4-(ciclopropilcarbonil)piperazin-1-il]carbonil}-4-fluorobenzil)ftalazin-1(2H)-ona (Composto A) na Forma A (0,08 g) de modo a semear a mistura. A suspensão resultante foi arrefecida 20°C durante 2,5 horas e foi agitada a esta temperatura durante mais 16 horas, de modo a estabelecer cristalização. Foi adicionada água (200 ml) durante 5 horas, mantendo a temperatura a 20°C. No fim da adição a suspensão foi mantida a 20°C durante 2 horas.

A suspensão foi filtrada e o bolo filtrado foi lavado com uma mistura de etanol (24 ml) e de água (56 ml). O sólido isolado foi descarregado e seco sob vácuo a 40-60°C, para originar o composto em título (Forma A) como um sólido branco sujo (18,1 g).

Métodos para a obtenção das Figuras 3 de 5

XRD de pó - Figura 3 (composto A como Forma A)

A difracção de raios X de pó foi registada com um difractómetro Bruker D5000 (comprimento de onda dos raios X 1,5418 Å, fonte de Cu, voltagem 40 kV, emissão de filamento 40 mA). As amostras foram varridas de 2-40° 2θ usando um passo com largura de 0,02° e uma contagem de tempo de 4 segundos.

XRD de pó - Figura 4 (composto A como forma solvatada)

A difracção de raios X de pó foi registada com um difractómetro Inel XRG-3000 (comprimento de onda dos raios X 1,5418 Å fonte de Cu, voltagem 40 kV, emissão de filamento 30 mA), equipado com um detector sensível a posições curvas (gama de 2θ de 120°). As amostras foram varridas de 2θ de 2,5-40° usando uma largura de passo de 0,03°, tipicamente com um tempo de recolha total de 300 s.

Calorimetria de Varrimento Diferencial (DSC) - Figura 5

A DSC foi registada usando um Mettler DSC820E com um sistema robótico TSO801RO. Tipicamente, foram aquecidos menos do 5 mg do material, contidos numa recipiente de alumínio de 40 µl equipado com uma tampa perfurada, numa gama de temperaturas de 25°C a 325°C, a uma taxa de aquecimento constante de 10°C por minuto. Uma purga de azoto gasoso foi usada com um caudal de 100 ml por minuto.

Exemplo 4

Acção inibidora

De modo a avaliar a acção inibidora do composto activo foi usado o ensaio seguinte para determinar um valor de IC₅₀.

PARP de mamífero, isolado de extracto nuclear de células HeLa, foi incubado com tampão Z (Hepes (Sigma) 25 mM); MgCl₂ (Sigma) 12,5 mM; KCl (Sigma) 50 mM; DTT (Sigma) 1 mM; Glicerol (Sigma) 10%, NP-40 (Sigma) 0,001%; pH 7,4) em

FlashPlates (Marca Registada) (NEN, UK) de 96 alvéolos, tendo sido adicionadas concentrações variáveis dos referidos inibidores. Todos os compostos foram diluídos em DMSO e proporcionaram concentrações finais de ensaio entre 10 e 0,01 μM , estando o DMSO a uma concentração final de 1% por alvéolo. O volume total de ensaio foi de 40 μl por alvéolo.

Após incubação de 10 minutos a 30°C as reacções foram iniciadas por adição de 10 μl de mistura reaccional, contendo NAD (5 μM), ^3H -NAD e oligómeros de ADN de cadeia dupla com 30mer. Alvéolos de reacção referidos como positivos e negativos foram feitos em combinação com alvéolos de composto (desconhecidos) de modo a se calcular a % de actividades de enzima. As placas foram, então, agitadas durante 2 minutos e incubadas a 30°C durante 45 minutos.

A seguir à incubação as reacções foram extintas pela adição de 50 μl de ácido acético a 30% a cada alvéolo. As placas foram, então, agitadas durante 1 hora à temperatura ambiente.

As placas foram transferidas para um TopCount NXT (Marca Registada) (Packard, UK), para contagem de cintilação. Os valores registados são contagens por minuto (cpm), seguindo-se contagem de 30 segundos para cada alvéolo

A % de actividade enzimática para o composto é, então, calculada usando a equação seguinte:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left(100 \times \frac{(\text{cpm de desconhecidos} - \text{cpm negativo médio})}{(\text{cpm positivo médio} - \text{cpm negativo médio})} \right)$$

Os valores de IC_{50} (a concentração à qual 50% da actividade enzimática é inibida) foram calculados, numa gama de concentrações diferentes, normalmente de 10 μM até 0,001 μM . Estes valores de IC_{50} foram usados como valores comparativos para a identificação de potências aumentadas do composto.

O composto A tem uma IC_{50} de cerca de 5 μM .

Factor de potenciação

O Factor de Potenciação (PF_{50}) para o composto activo é calculado como a razão entre a IC_{50} do desenvolvimento das células de controlo dividida pela IC_{50} do desenvolvimento das células+inibidor de PARP. As curvas de inibição do desenvolvimento, tanto para o controlo, como para as células tratadas com composto são na presença do agente de alquilação metanossulfonato de metilo (MMS). O composto em teste foi usado a uma concentração fixa de 0,2 micromolar. As concentrações de MMS estavam numa gama de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

O desenvolvimento celular foi avaliado usando o ensaio de sulfuro-hodamina B (SRB) (Skehan, P., et al., (1990), "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening", *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112). Foram cultivadas 2000 células HeLa em cada alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos de fundo plano, num volume de 100 μl , e foram incubadas durante 6 horas a 37°C. As células foram substituídas apenas com meio ou com meio contendo inibidor de PARP a uma concentração final de 0,5, 1 ou 5 μM . Deixou-se que as células se desenvolvessem durante 1 hora, antes da adição de MMS a uma gama de concentrações (tipicamente, 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g/ml}$) às células não tratadas e às células tratados com ou inibidor de PARP. Células tratadas com inibidor de PARP sozinho foram utilizadas para avaliar a inibição do desenvolvimento pelo inibidor de PARP.

Deixaram-se as células durante mais 16 horas antes da substituição dos meios e deixaram-se as células desenvolver durante mais 72 horas a 37°C. Os meios foram, então, removidos e as células fixadas com 100 μl de ácido tricloroacético a 10% (p/v) gelado. As placas foram incubadas a 4°C durante 20 minutos e, depois, foram secas durante 2 horas à temperatura ambiente. Cada alvéolo das células foi colorido com 100 μl de SRB a 0,4% (p/v) em ácido acético a 1% durante 20 minutos, antes de serem lavados quatro vezes com ácido acético a 1%. As placas foram, então, secas durante 2 horas à temperatura ambiente. O corante das células coloridas foi solubilizado por adição de 100 μl de TrisBase 10 mM a cada alvéolo. As placas foram agitadas suavemente e foram

deixadas à temperatura ambiente durante 30 minutos antes da medição da densidade óptica a 564 nM num leitor de placas de microtitulação Microquant.

O composto A tem um PF_{50} a 200 nM de pelo menos 20.

Lisboa, 2011-12-16

REIVINDICAÇÕES

1. 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona como Forma cristalina A, composto com os seguintes picos característicos num XRD de pó:

Pico	$2\theta^\circ (\pm 0,1^\circ)$ ($\lambda=1,5418\text{\AA}$)
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, tendo os seguintes picos característicos num XRD de pó:

Pico	$2\theta^\circ (\pm 0,1^\circ)$ ($\lambda=1,5418\text{\AA}$)
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2
6	10,5
7	14,0
8	21,7
9	24,3
10	26,1

3. O composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, que começa a fundir a $210,1^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ quando aquecido de 25°C a 325°C a 10°C por minuto em DSC.

4. Método de obtenção de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) como Forma cristalina A tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo os passos de:

- (i) cristalização de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona de um solvente;
- (ii) se o solvente original não for etanol, tratamento do composto cristalino A com etanol;
- (iii) tratamento do composto cristalino A com água para a remoção do etanol aprisionado;
- (iv) secagem do produto resultante.

5. Método de obtenção de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) como Forma cristalina A, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo os passos de:

- (i) cristalização de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona de um solvente;
- (ii) se o solvente original usado na síntese do composto A, na forma cristalina, não for uma mistura de água e de um álcool C₁₋₂, aquecimento do composto com uma mistura de água e de um álcool C₁₋₂;
- (iii) destilação da mistura à temperatura ambiente; e
- (iv) secagem do produto resultante.

6. Método de obtenção de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluorobenzil]-2H-ftalazin-1-ona (composto A) como Forma cristalina A, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo os passos de:

- (i) suspensão do composto A numa mistura de água e de um álcool C₁₋₂ como solvente;
- (ii) aquecimento da suspensão ao refluxo;
- (iii) arrefecimento da solução e sua sementeira com composto A como Forma A;
- (iv) secagem do produto resultante.

7. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para uso num método de tratamento do corpo humano ou de um animal.

9. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 na preparação de um medicamento para o tratamento de: doença vascular; choque séptico; dano isquémico; neurotoxicidade; choque hemorrágico; ou infecção viral.

10. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 na preparação de um medicamento para uso como um auxiliar na terapia do cancro ou para a potenciação de células tumorais para o tratamento com radiação ionizante ou com agentes quimioterapêuticos.

11. Uso de um composto de acordo com as reivindicações 1 a 3 no fabrico de um medicamento para uso no tratamento do cancro de um individuo, em que o referido cancro é deficitário na via de reparação de DSB de ADN, dependente de HR.

12. Uso de acordo com a reivindicação 13, no qual o referido cancro compreende uma ou mais células cancerígenas com capacidade reduzida ou anulada de reparação de DSB de ADN dependente de HR, relativamente a células normais.

13. Uso de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 14, no qual o referido tratamento compreende, adicionalmente, administração de radiação ionizante ou de um agente quimioterapêutico.

Lisboa, 2011-12-16

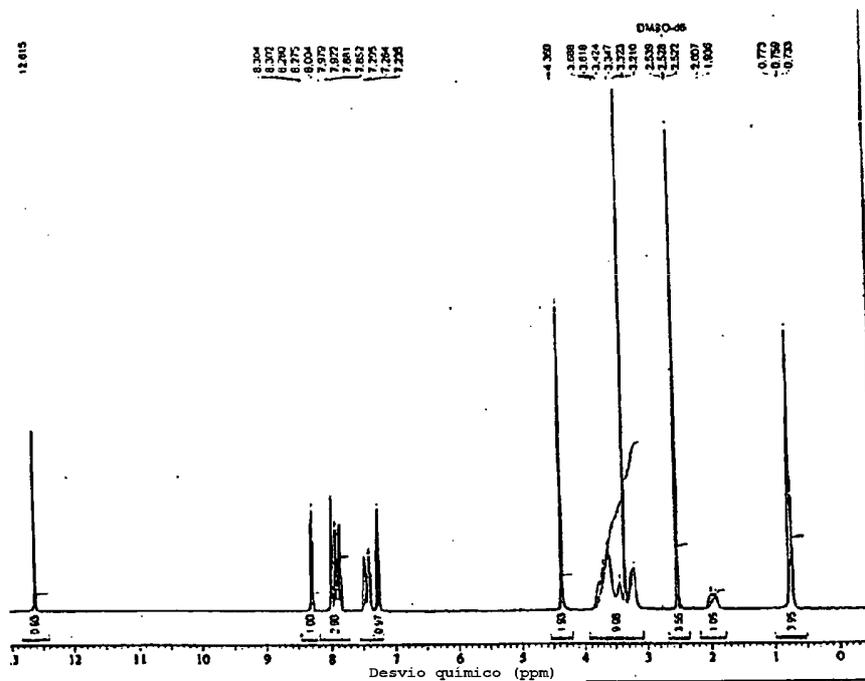


Figura 1

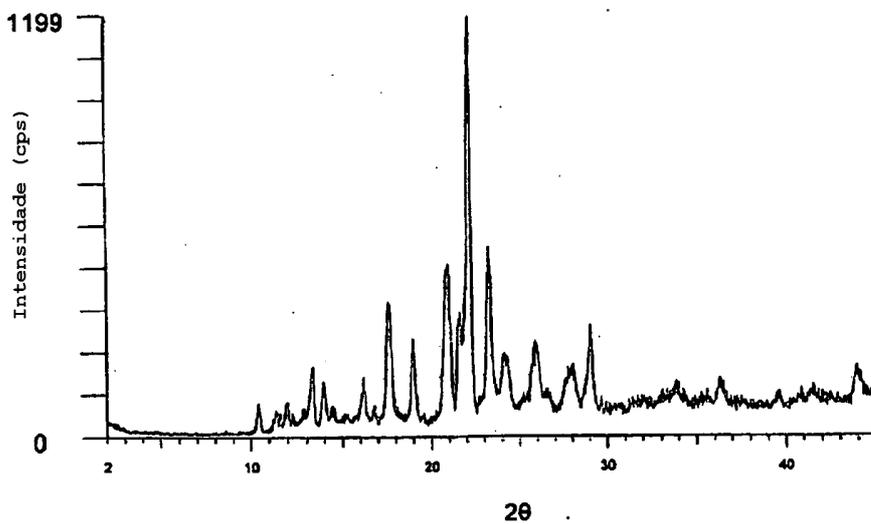


Figura 2

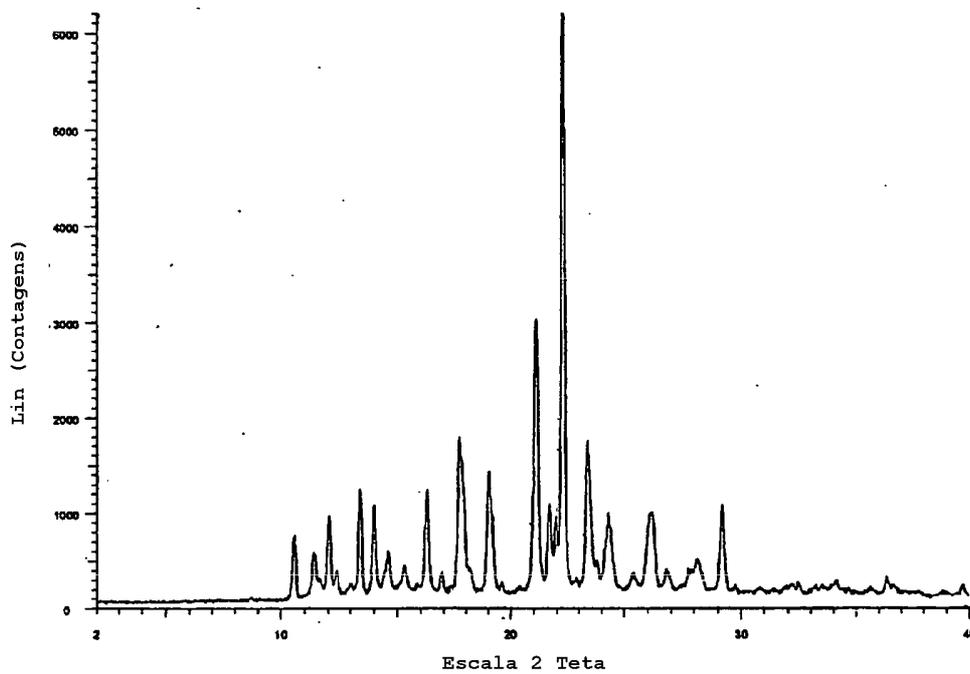


Figura 3

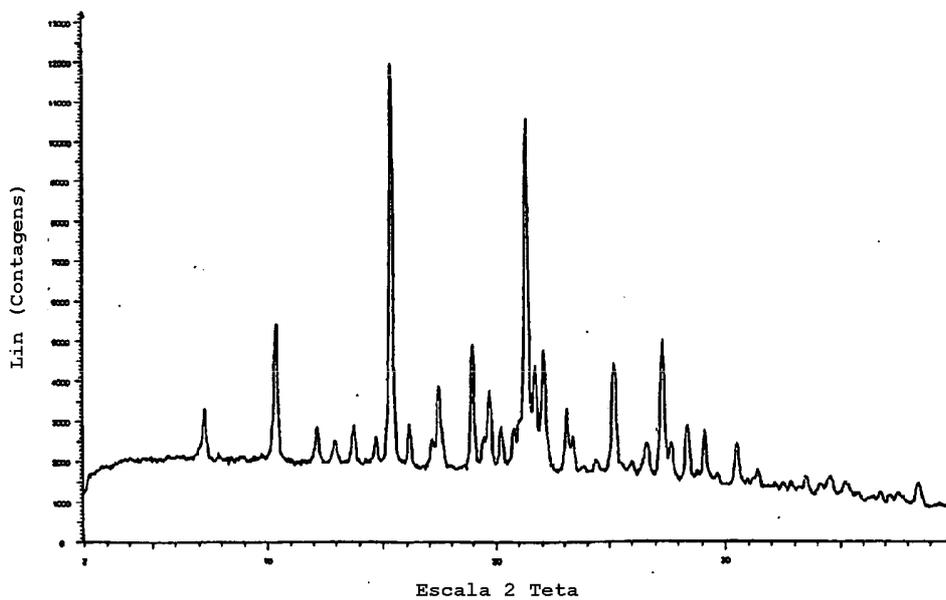


Figura 4

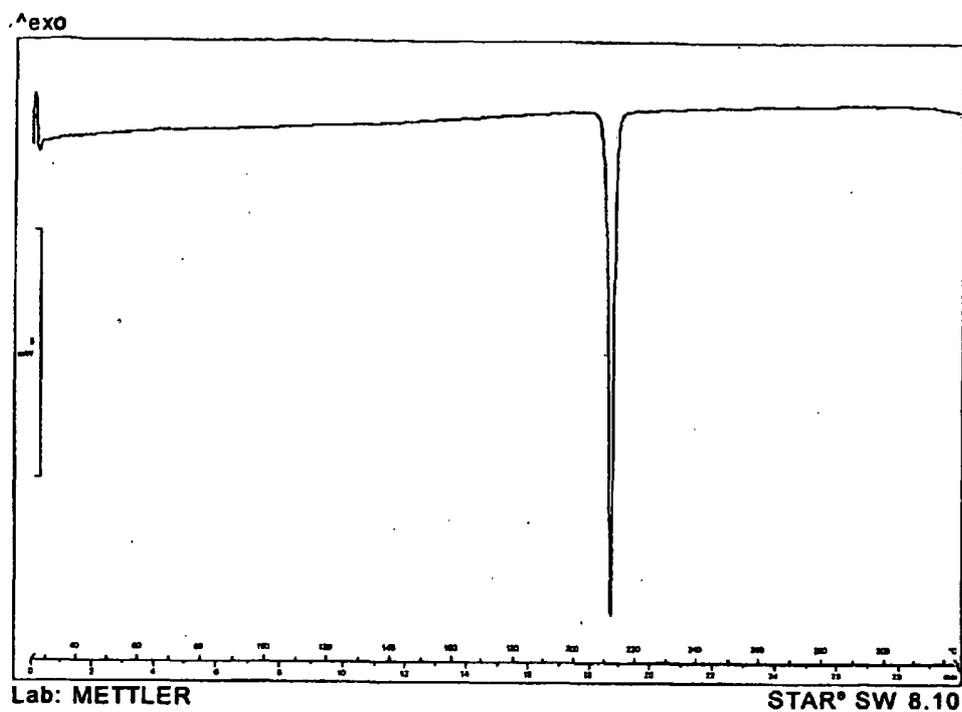


Figura 5