

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 630**

51 Int. Cl.:
C07D 237/32 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07824140 .3**
96 Fecha de presentación: **15.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2064189**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **FORMA POLIMÓRFICA DE LA 4-[3-(4-CICLOPROPILCARBONILPIPERACIN-1-CARBONIL)-4-FLUOROBENCIL]-2H-FTALACIN-1-ONA.**

30 Prioridad:
17.10.2006 US 829694 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.01.2012

73 Titular/es:
Kudos Pharmaceuticals Limited
2 Kingdom Street
London W2 6BD, GB

72 Inventor/es:
MENEAR, Keith Allan;
OTTRIDGE, Anthony Peter;
LONDESBROUGH, Derek John;
HALLETT, Michael, Raymond;
MULLHOLLAND, Keith, Raymond;
PITTAM, John, David;
LAFFAN, David, Dermot, Patrick;
ASHWORTH, Ian, Woodward;
JONES, Martin, Francis y
CHERRYMAN, Janette, Helen

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 372 630 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

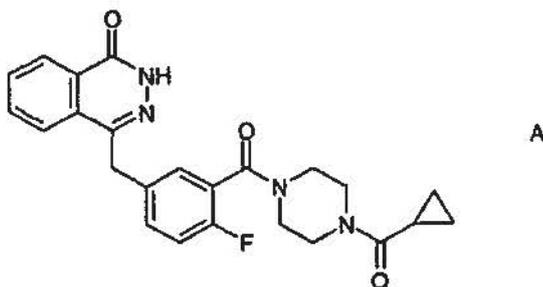
Forma polimórfica de la 4-[3-(4-ciclopropilcarbonilpiperacina-1-carbonil)-4-fluorobencil]-2H-ftalacina-1-ona

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una forma cristalina de un derivado particular de la ftalacina, y a composiciones y usos de la forma cristalina.
- 10 **[0002]** La enzima de mamífero PARP (una proteína multidominio de 113 kDa) se ha relacionado con la señalización del daño en el ADN mediante su capacidad para reconocer y unirse rápidamente a roturas en las cadenas de ADN sencillas o de doble cadena (D'Amours, y col., *Biochem. J.*, 342, 249-268 (1999)).
- 15 **[0003]** Varias observaciones han llevado a la conclusión de que la PARP participa en una variedad de funciones relacionadas con el ADN incluyendo la amplificación génica, división celular, diferenciación, apoptosis, reparación de la escisión de bases de ADN y también produce efectos sobre la longitud de los telómeros y la estabilidad cromosómica (d'Adda di Fagagna, y col., *Nature Gen.*, 23(1), 76-80 (1999)).
- 20 **[0004]** Estudios sobre el mecanismo mediante el cual la PARP modula la reparación del ADN y otros procesos han identificado su importancia en la formación de cadenas de poli(ADP-ribosa) dentro del núcleo celular (Althaus, F.R. y Richter, C., *ADPRibosylation of Proteins: Enzymology and Biological Significance*, Springer-Verlag, Berlín (1987)). La PARP activada y unida al ADN utiliza NAD para sintetizar poli(ADP-ribosa) en una variedad de proteínas diana nucleares, incluyendo la topoisomerasa, histonas y la propia PARP (Rhun, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 1-10 (1998)).
- 25 **[0005]** La poli(ADP-ribosil)ación también se ha relacionado con la transformación maligna. Por ejemplo, la actividad PARP es superior en los núcleos aislados de fibroblastos transformados con SV40, mientras que las células leucémicas y de cáncer de colon presentan una mayor actividad enzimática que los leucocitos y la mucosa de colon normal equivalentes (Miwa, y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 313-321 (1977); Burzio, y col., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 933-938 (1975); y Hirai, y col., *Cancer Res.*, 43, 3441-3446 (1983)).
- 30 **[0006]** Se han usado una serie de inhibidores de bajo peso molecular de PARP para elucidar el papel funcional de la poli(ADP-ribosil)ación en la reparación del ADN. En células tratadas con agentes alquilantes, la inhibición de PARP da lugar a un marcado incremento de la rotura de las cadenas de ADN y de muerte celular (Durkacz, y col., *Nature*, 283, 593-596 (1980), Berger, NA, *Radiation Research*, 101, 4-14 (1985)).
- 35 **[0007]** Posteriormente, se ha demostrado que dichos inhibidores potencian el efecto de la respuesta a la radiación suprimiendo la reparación de daño potencialmente letal (Ben-Hur, y col., *British Journal of Cancer*, 49 (Suppl. VI), 34-42 (1984); Schlicker, y col., *Int. J. Radiat. Biol.*, 75, 91-100 (1999)). Se ha informado de que los inhibidores PARP son eficaces en la radio sensibilización de células tumorales hipóxicas (documentos de EE.UU. 5.032.617; EE.UU. 5.215.738 y EE.UU. 5.041.653).
- 40 **[0008]** Además, animales deficientes en PARP (PARP *-/-*) presentan inestabilidad genómica en respuesta a agentes alquilantes y radiación gamma (Wang, y col., *Genes Dev.*, 9, 509-520 (1995); Menissier de Murcia, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 94, 7303-7307 (1997)).
- 45 **[0009]** También se ha demostrado la implicación de PARP en ciertas enfermedades vasculares, choque séptico, lesión isquémica y neurotoxicidad (Cantoni, y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1014, 1-7 (1989); Szabo, y col., *J. Clin. Invest.*, 100, 723-735 (1997)). El daño del ADN por radicales oxígeno que da lugar a la rotura de la cadena del ADN, que posteriormente es reconocida por PARP, es un factor importante que contribuye a dichos estados patológicos, como demuestran los estudios del inhibidor de PARP (Cosí, y col., *J. Neurosci. Res.*, 39, 38-46 (1994); Said, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 4688-4692 (1996)). Más recientemente, se ha demostrado que PARP desempeña un papel en la patogénesis del choque hemorrágico (Liadet, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(3), 10203-10208 (2000)).
- 50 **[0010]** También se ha demostrado que la infección retroviral eficiente de células de mamífero está bloqueada por la inhibición de la actividad PARP. Se ha demostrado que dicha inhibición de las infecciones por el vector retroviral recombinante se produce en diversos tipos celulares diferentes (Gaken, y col., *J. Virology*, 70(6), 3992-4000 (1996)). Así, se han desarrollado inhibidores de PARP para su uso en terapias antivirales y en el tratamiento del cáncer (documento WO 91/18591).
- 55 **[0011]** Además, se ha especulado con que la inhibición de PARP retrasa el comienzo de las características del envejecimiento en fibroblastos humanos (Rattan y Clark, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201(2), 665-672 (1994)). Esto puede estar relacionado con el papel que desempeña PARP en el control de la función del telómero (d'Adda di Fagagna, y col., *Nature Gen.*, 23(1), 76-80 (1999)).
- 60 **[0012]** El documento WO 2004/080976 describe una serie de derivados de ftalacina, su actividad en la inhibición de PARP, y en consecuencia su uso en el tratamiento del cáncer, ya sea como agente auxiliar a la radioterapia o
- 65

quimioterapia, o como agente independiente.

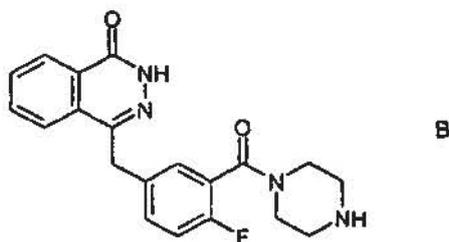
5 **[0013]** El documento WO 2005/053662 describe el uso de inhibidores de PARP, en particular derivados de ftalacinona, como inhibidores de la reparación de la escisión de bases (REB). Se describe el uso de estos inhibidores en la producción de medicamentos para el tratamiento de cánceres que son deficientes en la actividad reparadora de DSB del ADN dependiente de Recombinación homóloga (RH), en particular para cánceres que presentan un fenotipo deficiente en BRCA1 y/o BRCA2.

10 **[0014]** El compuesto 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperacín-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacín-1-ona (Compuesto A) descrito en el documento WO 2004/080976:

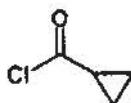


15 es de interés particular.

[0015] En el documento WO 2004/080976, se sintetizó el Compuesto A como parte de una serie de compuestos de una librería del compuesto 4-[4-fluoro-3-(piperacín-1-carbonil)-bencil]-2H-ftalacín-1-ona (compuesto B):



20 por adición de cloruro de ciclopropanocarbonilo:



25 a una disolución de (B) en diclorometano, seguido de base de Hünig (N,N- diisopropiletilamina). Esta reacción se lleva a cabo con agitación a temperatura ambiente durante 16 horas, y el compuesto resultante se purifica por HPLC preparativa.

30 **[0016]** Las formas particulares del Compuesto A pueden presentar propiedades ventajosas, por ejemplo con respecto a su solubilidad y/o estabilidad y/o biodisponibilidad y/o perfil de impurezas y/o características de filtración y/o características de secado y/o ausencia de higroscopicidad, y/o pueden ser más fáciles de manipular y/o micronizar y/o formar en comprimidos. También se desea tener un procedimiento mejorado de síntesis que sea adecuado para la síntesis del Compuesto A a escala de varios gramos.

35 **[0017]** Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperacín-1-carbonil)-4-fluorobencil]-2H-ftalacín-1-ona (Compuesto A) en la Forma A cristalina, el compuesto que tiene los siguientes picos característicos en un patrón de difracción de rayos X en polvo ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$):

Pico	2θ° (±0,1°)
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2

[0018] El Compuesto A en su Forma A cristalina también puede presentar los siguientes picos adicionales en un patrón de difracción de rayos X ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$):

5

Pico	2θ° (±0,1°)
6	10,5
7	14,0
8	21,7
9	24,3
10	26,1

[0019] El Compuesto A en su Forma A cristalina también se puede caracterizar por cualquier combinación de tres o más picos seleccionados de la lista de 10 picos anteriores.

10 **[0020]** En la Figura 3 se muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo representativo del Compuesto A en su Forma A.

15 **[0021]** Sin querer estar limitado por la teoría, el Compuesto A es capaz de formar fácilmente una estructura en la que las moléculas de disolvente pueden ocupar posiciones dentro de la red cristalina. Dichos solvatos, no necesariamente de naturaleza estequiométrica, pueden consistir en un solvato puro (por ejemplo, metanolato del Compuesto A, y tetrahidrofuranato del Compuesto A) o potencialmente pueden constar de más de un componente disolvente (por ejemplo, metanol y dietiléter). Las moléculas de disolvente normalmente entran dentro de los bolsillos creados por las moléculas del Compuesto A. En ciertas circunstancias, el volumen de estos bolsillos es suficientemente flexible para incorporar un abanico de disolventes, dando como resultado un pequeño cambio en la estructura global del material, y por tanto sólo pequeños desplazamientos en las reflexiones del patrón de difracción de rayos X.

20 **[0022]** Los solvatos, incluyendo los que comparten la misma estructura global, surgen de la maduración de la disolución y de los experimentos de cristalización en diclorometano, acetato de etilo, metanol, etanol, isopropanol, 2-butanona, *t*-butilmetiléter, tolueno, tetrahidrofurano, agua, ciclohexano, ciclopropilmetilcetona, 1,2-dicloroetano, trifluoroacetato de etilo, fluorobencenoheptafluoro-iso-propanol, metil nonafluorobutil éter, 2-metil-1-propanol, nitrometano, propionitrilo, tricloroetileno, $\alpha\alpha\alpha$ -trifluorotolueno, heptano, dioxano, acetonitrilo, ya sea en forma de disolventes puros o cuando se combinan con otro disolvente. En la Figura 4 se muestra el patrón de difracción de rayos X de la mayoría de las estructuras de los solvatos, y normalmente contienen los picos más intensos en las posiciones listadas a continuación:

30

Pico	2θ° (±0,1°) ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$)
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

35 **[0023]** Se comprenderá que las intensidades relativas de los picos mostradas en las Figuras pueden variar según la orientación de la muestra sometida a prueba y del tipo y los ajustes del instrumento usado, de manera que las intensidades en las señales de difracción de rayos X incluidas en el presente documento son ilustrativas y no están previstas para su uso en una comparación absoluta.

40 **[0024]** La Forma A del Compuesto A está sustancialmente exenta de disolvente. El término "sustancialmente exenta de disolvente" como se usa en el presente documento se refiere a que la forma tiene sólo cantidades insignificantes de cualquier disolvente, por ejemplo, una forma con un total del 0,5% en peso o inferior de cualquier disolvente. La cantidad total de cualquier disolvente, incluyendo el agua, puede ser del 0,25%, 0,1%, 0,05% o 0,025% en peso o inferior.

[0025] La Forma A del Compuesto A se puede caracterizar usando DSC. La Forma A del Compuesto A cuando se

calienta de 25°C a 325°C a 10°C por minuto comenzará a fundir a 210,1°C ± 1°C. En la Figura 5 se muestra una señal de DSC representativa para el Compuesto A en su Forma A.

5 **[0026]** El segundo aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonilpiperacina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacina-1-ona (Compuesto A) en la Forma A cristalina que comprende la cristalización del Compuesto A en un disolvente y a continuación el desplazamiento del disolvente de la forma cristalina con un agente de desplazamiento. El agente de desplazamiento puede ser agua o una mezcla de un alcohol C₁₋₂ y agua.

10 **[0027]** En una primera forma de realización, este procedimiento comprende las etapas de:

- 15 (i) cristalización de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonilpiperacina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacina-1-ona (Compuesto A) en un disolvente;
(ii) si el disolvente original no es etanol, el tratamiento del compuesto cristalino A con etanol;
(iii) el tratamiento del compuesto cristalino A con agua para eliminar el etanol atrapado;
(iv) el secado de producto resultante.

[0028] El disolvente usado en la cristalización original puede ser, por ejemplo, diclorometano o acetonitrilo.

20 **[0029]** Los procedimientos para la obtención de la Forma A generalmente pueden suponer la sustitución del disolvente. Se ha encontrado que el Compuesto A cristaliza de tal forma que se forman canales en la red del cristal que pueden atrapar a los disolventes, haciendo así que sea difícil su eliminación.

25 **[0030]** El procedimiento de la primera forma de realización se puede usar en particular si el disolvente usado en la cristalización del Compuesto A es diclorometano. La etapa de intercambio del diclorometano como disolvente con etanol como disolvente se puede llevar a cabo destilando la disolución de Compuesto A a presión atmosférica en presencia de etanol. El intercambio se completa cuando la temperatura de cabeza se aproxima al punto de ebullición del etanol, por ejemplo, al menos 73°C. En particular, el intercambio se puede llevar a cabo destilando la mayoría del DCM, y a continuación añadiendo un volumen de etanol. A continuación se prosigue con la destilación, reemplazando lotes del destilado con volúmenes iguales de etanol.

30 **[0031]** La cristalización del Compuesto A en el disolvente etanol se puede llevar a cabo enfriando la disolución por debajo de 15°C, preferentemente por debajo de 10°C, y más preferentemente a 8°C aproximadamente. A continuación se pueden extraer los cristales del Compuesto A de la disolución por filtración.

35 **[0032]** El compuesto cristalino A se puede tratar con agua para extraer el etanol atrapado suspendiendo el material cristalino en agua y calentando a temperatura de reflujo durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo al menos 3 horas, y preferentemente durante 4 horas aproximadamente. El compuesto cristalino A se puede extraer de la suspensión en agua por filtración.

40 **[0033]** El secado del producto resultante de la etapa anterior se consigue fácilmente, por ejemplo, calentando el producto en un horno a una temperatura de al menos 60°C, y preferentemente a 70°C aproximadamente.

45 **[0034]** En otra de dichas formas de realización, el procedimiento comprende las etapas de:

- 50 (i) cristalización del Compuesto A en un disolvente;
(ii) si el disolvente original usado en la síntesis del Compuesto A en la forma cristalina no es una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂ (es decir, metanol, etanol), tratar el Compuesto A en la forma cristalina con una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂;
(iii) la destilación de la mezcla a presión ambiente;
(iv) el secado del producto resultante.

55 **[0035]** El producto resultante se puede tratar posteriormente con una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂, y se puede secar con el fin de aislar aún más el Compuesto A en una Forma A cristalina.

60 **[0036]** La mezcla de agua y alcohol C₁₋₂ preferentemente está en el intervalo de 2:1 a 1:2 en volumen, y más preferentemente de 1,5:1 a 1:1,5 en volumen. Una mezcla particularmente preferida es 1 parte de agua por 1,2 partes de alcohol C₁₋₂. Otra mezcla particularmente preferida es 2 partes de agua por 1 parte de alcohol C₁₋₂. El alcohol C₁₋₂ es preferentemente etanol.

65 **[0037]** El tratamiento del disolvente en la etapa (ii) se puede llevar a cabo suspendiendo el Compuesto A en la mezcla de agua y alcohol C₁₋₂ y calentando a temperatura de reflujo con agitación. Se pueden proseguir con el enfriamiento entre 55 y 65°C y filtración, por ejemplo, a través de un lecho de Celite. El lecho del filtro se puede lavar con una mezcla de agua y alcohol C₁₋₂ antes de la etapa (iii) de destilado a presión ambiente (normalmente 1 atm). La destilación se puede detener para producir una suspensión que se deja a temperatura ambiente antes de la subsiguiente filtración. La pasta del filtro resultante se puede lavar con agua.

- [0038]** El secado del producto resultante de la etapa anterior se consigue fácilmente. Por ejemplo, calentando el producto en un horno a una temperatura de al menos 50°C, preferentemente a 60°C aproximadamente.
- 5 **[0039]** El tratamiento posterior se puede llevar a cabo de una manera similar a lo que se ha descrito anteriormente.
- [0040]** En una tercera forma de realización, el procedimiento comprende:
- 10 (i) la suspensión del Compuesto A en una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂ como disolvente;
(ii) el calentamiento de la suspensión a temperatura de reflujo;
(iii) el enfriamiento de la disolución y la siembra con el Compuesto A en la Forma A;
(iv) el secado del producto resultante.
- 15 **[0041]** El producto resultante se puede tratar posteriormente con una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂, y se puede secar con el fin de aislar aún más el Compuesto A en una Forma A cristalina.
- [0042]** La mezcla de agua y alcohol C₁₋₂ preferentemente está en el intervalo de 2:1 a 1:5 en volumen, y más preferentemente de 1:2 a 1:4 en volumen. Una mezcla particularmente preferida es 1 parte de agua por 3 partes de alcohol C₁₋₂. El alcohol C₁₋₂ es preferentemente etanol.
- 20 **[0043]** La etapa (iii) puede comprender el enfriamiento de la disolución entre 65 y 75°C (por ejemplo, 70°C) y filtración, por ejemplo, a través de un lecho de Celite. El lecho del filtro se puede lavar con una mezcla de agua y alcohol C₁₋₂ antes del destilado (por ejemplo, a presión ambiente o superior). La siembra se puede producir después de que el filtrado resultante se haya enfriado entre 40 y 50°C (por ejemplo, 45°C). La suspensión resultante se puede enfriar a temperatura ambiente (por ejemplo, 20°C), en entre 2 y 3 horas (por ejemplo, 2,5 horas) y mantenerse a dicha temperatura durante un tiempo suficientemente prolongado para establecer la cristalización. Esto puede llevar entre 12 y 24 horas, y puede ser un periodo de 16 horas aproximadamente. Al final de este periodo, se puede añadir más agua. La cantidad puede ser aproximadamente igual al volumen del disolvente total (agua y alcohol C₁₋₂) presente y se puede añadir lentamente, por ejemplo durante un periodo de 4 a 6 horas (por ejemplo 5 horas). La suspensión se puede mantener a temperatura ambiente después de la adición del agua, por ejemplo durante 2 horas.
- 25 **[0044]** A continuación la suspensión se puede filtrar, y la pasta del filtro resultante se puede lavar con una mezcla de alcohol C₁₋₂ y agua en una relación de entre 1:3 y 1:2, por ejemplo, 1:2,3).
- 30 **[0045]** El secado del producto resultante de la etapa anterior se consigue fácilmente. Por ejemplo, calentando el producto en un horno sobre vacío a una temperatura de entre 40°C y 60°C aproximadamente.
- 35 **[0046]** Un tercer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto del primer aspecto y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 40 **[0047]** Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona un compuesto del primer aspecto para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o de un animal.
- 45 **[0048]** Aspectos adicionales de la invención proporcionan el uso de un compuesto como se define en el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de: una enfermedad vascular, choque séptico, lesión isquémica, neurotoxicidad, choque hemorrágico, infección vírica, o enfermedades que mejoran con la inhibición de la actividad de PARP.
- 50 **[0049]** Otro aspecto adicional de la invención proporciona el uso de un compuesto como se define en el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para su uso como agente auxiliar en terapia contra el cáncer o para potenciar células tumorales para el tratamiento con radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos.
- 55 **[0050]** En aspectos adicionales de la presente invención, los compuestos se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer que es deficiente en la actividad reparadora de DSB del ADN dependiente de Recombinación homóloga (RH) que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto.
- 60 **[0051]** La vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH repara roturas en la doble cadena (DSBs) del ADN mediante mecanismos homólogos para reformar una hélice de ADN continua (K.K. Khanna y S.P. Jackson, Nat. Genet. 27(3): 247-254 (2001)). Los componentes de la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH incluyen, pero no están 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) y NBS1 (NM_002485). Otras proteínas involucradas en la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH incluyen factores reguladores como EMSY (Hughes-Davies, y col.,
- 65

Cell, 115, pp523-535). Los componentes de la RH también están descritos en Wood, y col., Science, 291, 1284-1289 (2001)).

5 **[0052]** Un cáncer que es deficiente en la reparación de DSB del ADN dependiente de RH puede comprender o consistir en una o más células cancerígenas que tienen una capacidad reducida o anulada para reparar las DSBs del ADN a través de esa vía, en relación con las células normales, es decir, la actividad de la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH puede estar reducida o suprimida en una o más células cancerígenas.

10 **[0053]** La actividad de uno o más componentes de la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH puede estar suprimida en una o más células cancerígenas de un individuo que tiene un cáncer que es deficiente en la reparación de DSB del ADN dependiente de RH. Los componentes de la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH están bien caracterizados en la materia (véase, por ejemplo, Wood, y col., Science, 291, 1284-1289 (2001)) e incluyen los componentes listados anteriormente.

15 **[0054]** En algunas formas de realización preferidas, las células cancerígenas pueden presentar un fenotipo deficiente en BRCA1 y/o BRCA2, es decir, la actividad BRCA1 y/o BRCA2 está reducida o anulada en las células cancerígenas. Las células cancerígenas con este fenotipo puede ser deficientes en BRCA1 y/o BRCA2, es decir, la expresión y/o actividad de BRCA1 y/o BRCA2 puede estar reducida o anulada en las células cancerígenas, por ejemplo, por medio de mutación o polimorfismo en el ácido nucleico codificante, o por medio de amplificación, mutación o polimorfismo en un gen que codifica un factor regulador, por ejemplo el gen EMSY que codifica un factor regulador de BRCA2 (Hughes-Davies, y col., Cell, 115, 523-535).

20 **[0055]** BRCA1 y BRCA2 son supresores tumorales conocidos cuyos alelos silvestres habitualmente están ausentes en tumores de portadores heterocigóticos (Jasin M., Oncogene, 21(58), 8981-93 (2002); Tutt, y col., Trends Mol Med., 8(12), 571-6, (2002)). La asociación de mutaciones de BRCA1 y/o BRCA2 con el cáncer de mama está perfectamente caracterizada en la materia (Radice, P.J., Exp Clin Cancer Res., 21(3 Suppl), 9-12 (2002)). También se sabe que la amplificación del gen EMSY, que codifica un factor de unión a BRCA2, está asociada al cáncer de mama y de ovario.

25 **[0056]** Los portadores de mutaciones en BRCA1 y/o BRCA2 también presentan un riesgo elevado de cáncer de ovario, próstata y páncreas.

30 **[0057]** En algunas formas de realización preferidas, el individuo es heterocigótico para una o más variaciones, tales como mutaciones y polimorfismos, en BRCA1 y/o BRCA2 o uno de sus reguladores. La detección de la variación en BRCA1 y BRCA2 es muy conocida en la materia y se describe, por ejemplo, en los documentos EP 699 754, EP 705 903, Neuhausen, S.L. y Ostrander, E.A., Genet. Test, 1, 75-83 (1992); Chappnis, P.O. y Foulkes, W.D., Cancer Treat Res, 107, 29-59 (2002); Janatova M., y col., Neoplasma, 50(4), 246-50 (2003); Jancarkova, N., Ceska Gynekol., 68(1), 11-6 (2003)). La determinación de la amplificación del factor EMSY de unión a BRCA2 se describe en Hughes-Davies, y col., Cell, 115, 523-535.

35 **[0058]** Las mutaciones y polimorfismos asociados con el cáncer se pueden detectar a nivel de los ácidos nucleicos detectando la presencia de una secuencia variante de los ácidos nucleicos o a nivel de la proteína detectando la presencia de un polipéptido variante (es decir, una variante mutante o alélica).

45 **Breve descripción de las Figuras**

[0059]

50 La Figura 1 muestra la RMN del Compuesto A después del tratamiento con agua (ejemplo 1);
La Figura 2 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo del Compuesto A en su Forma A después del tratamiento con agua (ejemplo);
La Figura 3 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo representativo del Compuesto A en su Forma A;
La Figura 4 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo representativo del Compuesto A en su forma solvatada;
55 La Figura 5 muestra una señal de DSC representativa del Compuesto A en su Forma A obtenida calentando entre 25°C y 325°C a 10°C por minuto.

Uso

60 **[0060]** La presente invención proporciona el Compuesto A en su Forma A como compuesto activo, específicamente, activo en la inhibición de la actividad de PARP.

65 **[0061]** El término "activo" como se usa en el presente documento, se refiere al compuesto que es capaz de inhibir la actividad de PARP. En los ejemplos a continuación se describe un ensayo que se puede usar de manera conveniente con el fin de valorar la inhibición de PARP proporcionada por el compuesto.

[0062] La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento de inhibición de la actividad de PARP en una célula, que comprende la puesta en contacto de dicha célula con una cantidad eficaz del compuesto activo, preferentemente en forma de composición farmacéuticamente aceptable. Dicho procedimiento se puede llevar a la práctica *in vitro*.

[0063] Por ejemplo, una muestra de células se puede crecer *in vitro* y el compuesto activo se puede poner en contacto con dichas células, y se puede observar el efecto del compuesto sobre esas células. Como ejemplos del "efecto", se puede determinar la cantidad de reparación de ADN efectuada en un cierto tiempo. Cuando se encuentre que el compuesto activo ejerce una influencia sobre las células, esto se puede usar como marcador pronóstico o diagnóstico de la eficacia del compuesto en procedimientos de tratamiento de un paciente que porte células del mismo tipo celular.

[0064] El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto del tratamiento de una dolencia, se refiere de manera general a tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o de un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en las que se consigue algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la dolencia, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, una mejora de la dolencia, y la curación de la dolencia. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis).

[0065] El término "agente auxiliar" como se usa en el presente documento se refiere al uso del compuesto activo junto con medios terapéuticos conocidos. Dichos medios incluyen regímenes de fármacos citotóxicos y/o radiación ionizante como se usa en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres. En particular, se sabe que los compuestos activos potencian las acciones de una serie de tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer, que incluyen la clase de venenos para la topoisomerasa (por ejemplo, topotecan, irinotecan, rubitecan), la mayoría de los agentes alquilantes conocidos (por ejemplo, DTIC, temozolamida) y fármacos basados en el platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino) usados en el tratamiento contra el cáncer.

[0066] El compuesto activo también se puede usar como aditivo en cultivos celulares para inhibir la PARP, por ejemplo, con el fin de sensibilizar las células a agentes quimioterapéuticos conocidos o tratamientos de radiación ionizante *in vitro*.

[0067] El compuesto activo también se puede usar como parte de un ensayo *in vitro*, por ejemplo, con el fin de determinar si es probable que un hospedador candidato se beneficie del tratamiento con el compuesto en cuestión.

Administración

[0068] El compuesto activo o composición farmacéutica que comprende el compuesto activo se puede administrar a un sujeto mediante cualquier vía de administración convencional, ya sea sistémica/periféricamente o en el sitio de acción deseado, incluyendo pero no limitado a, administración por vía oral (por ejemplo, mediante ingestión), tópica (incluyendo, por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal, y sublingual); pulmonar (por ejemplo, por inhalación o terapia de insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo a través de la boca o la nariz), rectal, vaginal, parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intra-articular, subaraquinoide, e intraesternal; mediante el implante de un depósito, por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente.

[0069] El sujeto puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, tití, babuino), un homínido (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

Formulaciones

[0070] Aunque es posible la administración en solitario del compuesto activo, es preferible presentarlo en forma de composición farmacéutica (por ejemplo, formulación) que comprenda el compuesto activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, agentes de relleno, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes u otros materiales muy conocidos por los expertos en la materia farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.

[0071] Así, la presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas, como se ha definido anteriormente, y procedimientos de preparación de una composición farmacéutica que comprende la mezcla del compuesto activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos, excipientes, tampones, adyuvantes, estabilizantes, u otros materiales farmacéuticamente aceptables, como se define en el presente documento, de manera que el compuesto activo permanezca en su Forma A cristalina.

[0072] El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones excesivos, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros principios de la formulación.

[0073] Vehículos, diluyentes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos de referencia. Véase, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Additives", 2nd Edition (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2nd edition, 1994.

[0074] Las formulaciones se pueden presentar de manera conveniente en formas de dosificación unitarias y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos muy conocidos en materia de farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociación del compuesto activo con el vehículo, que constituye uno o más principios accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando el compuesto activo a vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, dando forma al producto.

[0075] Las formulaciones pueden estar en forma suspensiones, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, píldoras o pastas.

[0076] Las formulaciones adecuadas para la administración por vía oral (por ejemplo, mediante ingestión) se pueden presentar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada una que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de pasta.

[0077] Un comprimido se puede preparar mediante medios convencionales, por ejemplo por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más principios accesorios. Los comprimidos compactados se pueden preparar comprimiendo el compuesto activo en una máquina adecuada en forma no aglomerada tales como polvos o gránulos, opcionalmente mezclada con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, goma arábiga, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa); agentes de relleno o diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); agentes desagregantes (por ejemplo, glicolato de fécula sódica, povidona entrecruzada, carboximetilcelulosa sódica entrecruzada); agentes con la superficie activa o dispersantes o humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico); y conservantes (por ejemplo, *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico). Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando una mezcla del compuesto pulverizado húmedo en una máquina adecuada con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente se pueden recubrir o ranurar o se pueden formular de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del compuesto activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para suministrar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos opcionalmente se pueden proporcionar con una cubierta entérica, para proporcionar su liberación en partes del intestino distintas del estómago.

[0078] Una cápsula puede incluir el compuesto activo en suspensión.

[0079] Las formulaciones adecuadas para la administración por vía tópica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal, y sublingual) se pueden formular en forma de pasta.

[0080] Las formulaciones adecuadas para la administración por vía tópica en el ojo también incluyen gotas oculares donde el compuesto activo se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el compuesto activo.

[0081] Las formulaciones adecuadas para la administración por vía nasal, donde el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 aproximadamente a 500 μm aproximadamente que se administra de forma que se toma aspirado, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente con el polvo mantenido cerca de la nariz.

[0082] Las formulaciones adecuadas para la administración mediante inhalación incluyen las presentadas como pulverizado en aerosol en un envase presurizado, con el uso de un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otros gases adecuados.

Dosificación

[0083] Se apreciará que las dosificaciones apropiadas del compuesto activo, y de las composiciones que comprenden el compuesto activo, pueden variar de un paciente a otro. La determinación de la dosificación óptima en general supondrá el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efecto secundario deletéreo de los tratamientos de la presente invención. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una

variedad de factores incluyendo, pero no limitado a, la actividad del compuesto particular, la vía de administración, el periodo de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales usados en combinación, y la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general, e historial médico previo del paciente. La cantidad de compuesto y la vía de administración estarán en última instancia a discreción del facultativo, aunque en general la dosificación será la que alcanza concentraciones locales en el sitio de acción que consigan el efecto deseado sin provocar efectos secundarios perjudiciales o deletéreos sustanciales.

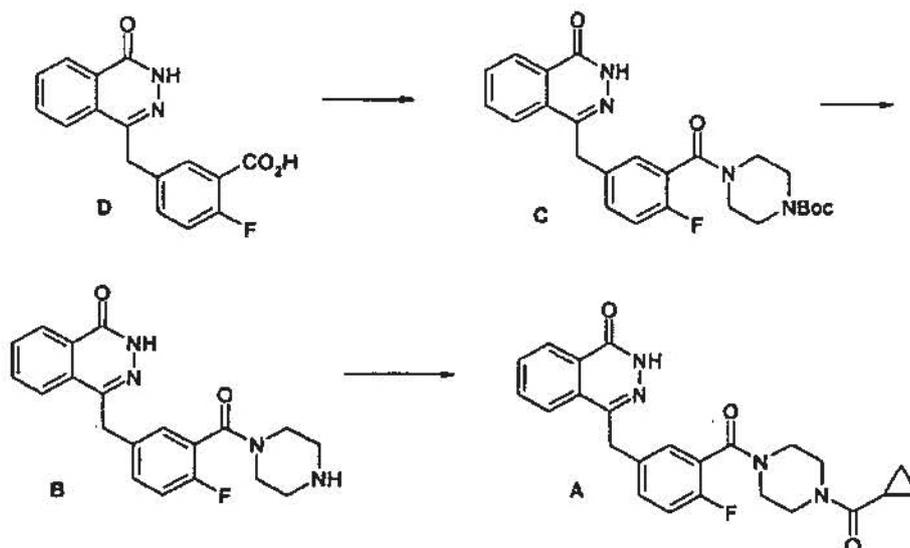
[0084] La administración *in vivo* se puede llevar a cabo en una única dosis, de manera continua o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas en intervalos apropiados) durante el transcurso del tratamiento. Los procedimientos de determinación de los medios y la dosificación de administración más eficaces son muy conocidos por los expertos en la materia y variarán con la formulación usada para terapia, el propósito de la terapia, la célula diana a tratar, y el sujeto sometido a tratamiento. Las administraciones únicas o múltiples se pueden llevar a cabo con el nivel y el patrón de dosificación seleccionado por el facultativo que atiende.

[0085] En general, una dosis adecuada de la sustancia activa está en el intervalo de 10 mg aproximadamente a 600 mg aproximadamente por m² de área de peso corporal del sujeto al día.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto A

[0086]



[0087] Se sintetizó el material de partida (D) mediante el procedimiento descrito en el documento 2004/080976.

Procedimientos

HPLC preparativa

[0088] Las muestras se purificaron con un sistema de purificación orientado a la masa de Waters utilizando una bomba Waters 600 LC, una columna Waters Xterra C18 (5 µm, 19 mm x 50 mm) y un espectrómetro de masas Micromass ZQ, funcionando en modo de ionización por electropulverización de iones positivos. Las fases móviles A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) se usaron en gradiente; 5% de B al 100% durante 7 minutos, mantenido durante 3 minutos, a una velocidad de flujo de 20 ml/min.

HPLC-MS analítica

[0089] La HPLC analítica se llevó a cabo usando una bomba Spectra System P4000 y una columna Jones Genesis C18 (4 µm, 50 mm x 4,6 mm). Las fases móviles A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y B (acetonitrilo) se usaron en gradiente del 5% de B durante 1 minuto incrementándose hasta el 98% de B después de 5 minutos, mantenido durante 3 minutos, a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La detección se realizó mediante un detector TSP UV 6000LP en el UV a 254 nm y un intervalo del PDA de 210-600 nm. El espectrómetro de masas era un Finnigan LCQ funcionando en modo de electropulverización de iones positivos.

RMN

5 [0090] El espectro de RMN ¹H se registró usando un espectrómetro Bruker DPX 300 a 300 MHz. Los desplazamientos químicos se presentan en partes por millón (ppm) en la escala relativa al ¹H interno tetrametilsilano. A menos que se indique otra cosa todas las muestras se han disuelto en DMSO-d₆.

(a) *terc-Butil éster del ácido 4-[2-fluoro-5-(4-oxo-3,4-dihidro-ftalacin-1-ilmetil)-benzoil]-piperacin-1-carboxílico (C)*

10 [0091] A una disolución agitada del material de partida D (850 g) en dimetilacetamida (DMA) (3561 ml) a temperatura ambiente en nitrógeno se añadió HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) (1402 g) en una fracción. A continuación se añadió la base de Hunig (iPr₂NEt, 1096 ml) manteniendo la temperatura entre 15 y 25°C, seguido de una disolución de 1-Boc-piperacina (637 g) en DMA (1428 ml) y manteniendo la temperatura entre 15 y 25°C.

15 [0092] La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se tomaron muestras para determinar su finalización (HPLC). Tras determinar su finalización la disolución se añadió a agua agitada vigorosamente (17.085 ml) manteniendo la temperatura entre 15 y 25°C y el sólido se filtró, se lavó con agua (2×7131 ml), hexano (2×7131 ml) y metil *terc*-butiléter (MTBE) (2×3561 ml). A continuación el sólido se secó durante toda la noche y se tomó una muestra para el contenido en agua y la pureza química.

20 [0093] A continuación se repitió esta reacción, véase la tabla:

Lote	Rendimiento (g)	Pureza (% del área en HPLC)	Contenido en agua (K.F.)	Rendimiento corregido
1	1571,3	86,80	24,3	1032,5 g (78%)
2	2781,6	85,00	40,3	1411,5 g (106%)

Rendimiento superior al 100% atribuido a una toma de muestra no representativa

25 (b) *4-[4-Fluoro-3-(piperacin-1-carbonil)-bencil]-2H-ftalacin-1-ona (B)*

[0094] A una disolución agitada de alcoholes industriales metilados (IMS) (2200 ml) y HCl concentrado (4400 ml) se le añadió el compuesto C (2780,2 g) en fracciones a temperatura ambiente en nitrógeno, controlando la espumación con la velocidad de adición. A continuación la disolución se agitó a 15 y 25°C durante 30 minutos y se tomaron muestras para determinar su finalización (HPLC).

35 [0095] Tras determinar su finalización la disolución se evaporó para extraer todo IMS y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2×3500 ml) antes de que el pH se ajustará a >8 usando amoníaco concentrado. A continuación la suspensión resultante se diluyó con agua (10.000 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4×3500 ml), se lavó con agua (2×2000 ml), se secó sobre MgSO₄ (250 g) y se evaporó. A continuación el producto en bruto se suspendió en CH₂Cl₂ (3500 ml) y se añadió a MTBE (5000 ml). La suspensión resultante se filtró y se secó a 50°C durante toda la noche para dar 611,0 g (58,5% de rendimiento) de material con una pureza del 94,12%.

40 (c) *4-[3-(4-Ciclopropanocarbonil-piperacin-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacin-1-ona (A)*

[0096] A una suspensión agitada del compuesto B (1290 g) en CH₂Cl₂ (15480 ml) en nitrógeno se le añadió una disolución premezclada de trietilamina (470 ml) y cloruro de ciclopropanocarbonilo (306 ml) en CH₂Cl₂ (1290 ml) gota a gota manteniendo la temperatura por debajo de 20°C. A continuación la disolución se agitó a 10-15°C durante 15 minutos y se tomaron muestras para determinar su finalización. Se encontró que la mezcla de reacción contenía sólo el 1,18% del material de partida B y así la reacción se consideró completa y a continuación el lote se trató.

[0097] La mezcla de reacción se lavó con agua (7595 ml), una disolución de ácido cítrico al 5% (7595 ml), una disolución de carbonato sódico al 5% (7595 ml) y agua (7595 ml). A continuación la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio (500 g).

50 [0098] A continuación se aisló la capa de producto que contiene CH₂Cl₂, se filtró a través de Celite y se cargó en un reactor 251. A continuación el CH₂Cl₂ (8445 ml) se destiló a presión atmosférica y se añadió etanol (10.000 ml). Se prosiguió con la destilación extrayendo cada 4000 ml de destilado y reemplazándolos con etanol (4000 ml) hasta que la temperatura de cabeza alcanzó los 73,7°C. A continuación se redujo el volumen de reacción (a 7730 ml), momento en el cual la temperatura de cabeza había alcanzado los 78,9°C y se dejó enfriar la disolución a 8°C durante toda la noche. A continuación el sólido se filtró, se lavó con etanol (1290 ml) y se secó a 70°C durante toda la noche. Rendimiento = 1377,3 g (90%). Pureza de la HPLC (99,34% [% del área]). Contenía el 4,93% de etanol y el 0,45% de CH₂Cl₂ por GC.

(d) Tratamiento con agua del Compuesto A

5 [0099] Una suspensión del Compuesto A (1377,0 g), producido mediante el procedimiento del Ejemplo 1, en agua (13.770 ml) se calentó a temperatura de reflujo durante 4 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con agua (2754 ml) y se secó a 70°C durante toda la noche.

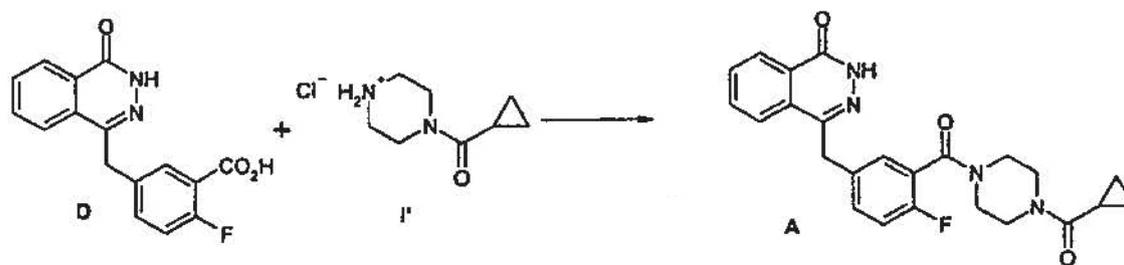
10 [0100] Rendimiento = 1274,8 g (92,6%). Pureza de la HPLC (99,49% [% del área]). Contenia el 0,01% de etanol y el 0,01% de CH₂Cl₂ por GC.

[0101] En la Figura 1 se presenta el espectro de RMN ¹H del Compuesto A (DMSO-d₆) después del tratamiento con agua.

15 [0102] En la Figura 2 se muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo del Compuesto A después del tratamiento con agua, que presenta el compuesto en su Forma A.

Ejemplo 2: Síntesis alternativa del Compuesto A usando la sal de clorhidrato de 1-(ciclopropilcarbonil)piperacina

20 [0103]

*(a) Sal de clorhidrato de 1-(ciclopropilcarbonil)piperacina (I')*

25 [0104] Se trató ácido acético (700 ml) con piperacina (50,00 g, 0,581 mol) de forma fraccionada durante 15 minutos con agitación en nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 40°C y se mantuvo a esta temperatura hasta que se obtuvo una disolución completa. Se añadió cloruro de ciclopropanocarbonilo (59,2 ml, 0,638 mol) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se destiló a presión reducida hasta que se hubieron recogido 430 ml de destilados. Se cargó tolueno (550 ml) en la mezcla de reacción y se prosiguió con la destilación a presión reducida hasta que se recogieron 400 ml más de destilados. Se añadió una carga más de tolueno (150 ml) y se prosiguió con la destilación a presión reducida hasta que se recogieron 350 ml de destilados. La suspensión resultante se diluyó con tolueno (200 ml) y se agitó durante toda la noche. Se añadió tolueno adicional (500 ml) con el fin de movilizar la suspensión. La suspensión se filtró, se lavó con tolueno (100 ml) y se secó sobre vacío a 40°C para dar el compuesto del título en forma de sólido blanquecino (86,78 g).

Espectro de masas: MH+ 155

40 [0105] **RMN ¹H (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) Compuesto A

45 [0106] Se suspendió ácido 2-fluoro-5-[(4-oxo-3,4-dihidroftalacin-1-il)metil]benzoico (D) (0,95 g, 3,19 mmol) con agitación bajo atmósfera de nitrógeno en acetonitrilo (4 ml). Se añadió hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) (1,45 g, 3,83 mmol) seguido de la sal de clorhidrato de 1-(ciclopropilcarbonil)piperacina (I') (0,73 g, 3,83 mmol). Se añadió diisopropiletamina (1,39 ml, 7,98 mmol) en 3 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a 5°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora, antes de filtrar. La pasta del filtro se lavó con acetonitrilo (2 ml) frío (3°C) antes de secar sobre vacío hasta una temperatura de 40°C para dar el compuesto del título en forma de sólido amarillo pálido (0,93 g).

(c) Recristalización del Compuesto A en metanol acuoso

5 [0107] El Compuesto A (9,40 g, 21,64 mmol) de la etapa (b) se suspendió en una mezcla de agua (100 ml) y metanol (120 ml). La suspensión se calentó a temperatura de reflujo con agitación. A continuación la disolución nebulosa producida se enfrió a 60°C y se filtró a través de un lecho de Harborlite. El lecho del filtro se lavó con una mezcla de agua (5 ml) y metanol (5 ml). El filtrado se destiló a presión atmosférica hasta que se hubieron recogido 115 ml de destilado. A continuación la destilación se detuvo y la suspensión producida se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión resultante se agitó durante ~18 horas antes de filtrarla. La pasta del filtro se lavó con agua (20 ml), antes de secarse sobre vacío a una temperatura de hasta 60°C para dar el compuesto del título en su Forma A como un sólido blanco (8,67 g).

Espectro de masas: MH+ 435

15 [0108] **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆)** δ: 0,70 (m, 4H), 1,88 (sa, 1H), 3,20 (sa, 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) Recristalización del Compuesto A en etanol acuoso

20 [0109] El Compuesto A (9,40 g, 21,64 mmol) de la etapa (b) se suspendió en una mezcla de agua (100 ml) y etanol (50 ml). La suspensión se calentó a temperatura de reflujo con agitación. A continuación la disolución nebulosa producida se enfrió a 60°C y se filtró a través de un lecho de Harborlite. El lecho del filtro se lavó con una mezcla de agua (5 ml) y etanol (5 ml). El filtrado se destiló a presión atmosférica hasta que se hubieron obtenido 53 ml de destilado. A continuación la destilación se detuvo y la suspensión producida se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión resultante se agitó durante ~18 horas antes de filtrarla. La pasta del filtro se lavó con agua (20 ml), antes de secarla sobre vacío a 60°C para dar el compuesto del título en su Forma A como un sólido blanco (8,74 g).

Espectro de masas: MH+ 435

30 [0110] **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆)** δ: 0,70 (m, 4H), 1,88 (sa, 1H), 3,20 (sa, 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).

Ejemplo 3: Recristalización del Compuesto A en etanol acuoso

35 [0111] La 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacina-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacina-1(2H)-ona (Compuesto A) (20,00 g, 44,66 mmol) se suspendió en una mezcla de agua (50 ml) y etanol (150 ml). La suspensión se calentó a temperatura de reflujo con agitación. A continuación la disolución producida se enfrió a 70°C y se filtró. El lecho del filtro se lavó con una mezcla de agua (8 ml) y etanol (22 ml).

40 [0112] El filtrado se enfrió a 45°C con agitación. Se añadió 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacina-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacina-1(2H)-ona (Compuesto A) en Forma A (0,08 g) con el fin de sembrar la mezcla. La suspensión resultante se enfrió a 20°C en 2,5 horas y se agitó a esta temperatura durante 16 horas más con el fin de establecer la cristalización. Se añadió agua (200 ml) en 5 horas manteniendo la temperatura a 20°C. Al final de la adición la suspensión se mantuvo a 20°C durante 2 horas.

45 [0113] La suspensión se filtró y la pasta del filtro se lavó con una mezcla de etanol (24 ml) y agua (56 ml). El sólido aislado se descargó y se secó sobre vacío a 40-60°C, para dar el compuesto del título (Forma A) como un sólido blanquecino (18,1 g).

Procedimientos para la obtención de las Figuras 3 a 5XRD en polvo - Figura 3 (Compuesto A en Forma A)

55 [0114] El patrón de difracción de rayos X en polvo se registró con un difractómetro Bruker D5000 (longitud de onda de rayos X de 1,5418 Å, fuente de Cu, Voltaje de 40 kV, emisión de filamento de 40 mA). Las muestras se sometieron a un barrido entre 2-40° de 2θ usando una anchura de paso de 0,02° con un tiempo de medición de 4 segundos.

XRD en polvo - Figura 4 (Compuesto A en forma solvatada)

60 [0115] El patrón de difracción de rayos X en polvo se registró con un difractómetro Inel XRG-3000 (longitud de onda de rayos X de 1,5418 Å, fuente de Cu, Voltaje de 40 kV, emisión de filamento de 30 mA), ajustado con un detector sensible a una posición curva (intervalo de 120° de 2θ). Las muestras se sometieron a un barrido entre 2,5 - 40° de 2θ usando una anchura de paso de 0,03° normalmente con un tiempo de medición total de 300 s.

65

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) - Figura 5

[0116] La DSC se registró usando un Mettler DSC820E con el sistema robótico TSO801RO. Normalmente se calientan menos de 5 mg de material, contenido en una sartén de aluminio de 40 µl equipada con una tapa perforada, sobre el intervalo de temperaturas de 25°C a 325°C a una velocidad de calentamiento constante de 10°C por minuto. Se usó nitrógeno como gas de purga con una velocidad de flujo de 100 ml por minuto.

Ejemplo 4**Acción inhibitoria**

[0117] Con el fin de valorar la acción inhibitoria del compuesto activo, se usó el siguiente ensayo para determinar el valor de CI_{50} .

[0118] La PARP de mamífero, aislada a partir del extracto nuclear de células Hela, se incubó con tampón Z (Hepes 25 mM (Sigma); $MgCl_2$ 12,5 mM (Sigma); KCl 50 mM (Sigma); DTT 1 mM (Sigma); Glicerol al 10% (Sigma) NP-40 al 0,001% (Sigma); pH 7,4) en placas de 96 pocillos FlashPlates™ (NEN, RU) y se añadieron concentraciones variables de dichos inhibidores. Todos los compuestos se diluyeron en DMSO y dieron unas concentraciones de ensayo finales de entre 10 y 0,01 µM, con el DMSO estando a una concentración final del 1% por pocillo. El volumen total de ensayo por pocillo fue de 40 µl.

[0119] Después de 10 minutos de incubación a 30°C, las reacciones se iniciaron con la adición de 10 µl de la mezcla de reacción, que contiene NAD (µM), 3H -NAD y 30-meros de oligos de ADN de doble cadena. Las designaciones positivas y negativas de los pocillos de reacción se realizaron en combinación con los pocillos del compuesto (desconocidos) con el fin de calcular el % de las actividades enzimáticas. A continuación las placas se agitaron durante 2 minutos y se incubaron a 30°C durante 45 minutos.

[0120] Después de la incubación, las reacciones se inactivaron con la adición a cada pocillo de 50 µl de ácido acético al 30%. A continuación las placas se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0121] Las placas se transfirieron a un TopCount NXT™ (Packard, RU) para el recuento por centelleo. Los valores registrados son cuentas por minuto (cpm) después de un recuento de cada pocillo de 30 segundos.

[0122] A continuación se calcula el % de actividad enzimática para el compuesto usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(100 \times \frac{(\text{cpm de desconocidos} - \text{media cpm negativas})}{\text{media cpm positivas} - \text{media cpm negativas}} \right)$$

[0123] Se calcularon los valores de CI_{50} (concentración a la que el 50% de la actividad enzimática está inhibida), que están determinados en un rango de concentraciones diferentes, normalmente entre 10 µM y 0,001 µM. Dichos valores de CI_{50} se usan como valores comparativos para identificar compuestos con una potencia incrementada.

[0124] El Compuesto A tiene una CI_{50} de 5 nM aproximadamente.

Factor de potenciación

[0125] El factor de potenciación (PF_{50}) para el compuesto activo se calcula como una relación de la CI_{50} del crecimiento celular control dividido por la CI_{50} del crecimiento celular + inhibidor PARP. Las curvas de inhibición del crecimiento tanto para las células control como para las células tratadas con compuesto están realizadas en presencia del agente alquilante metil metanosulfonato (MMS). El compuesto de prueba se usó a una concentración fija de 0,2 micromolar. Las concentraciones de MMS estaban en el intervalo entre 0 y 10 µg/ml.

[0126] El crecimiento celular se valoró usando el ensayo de la sulforhodamina B (SRB) (Skehan, P., y col., (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112). Se sembraron 2000 células HeLa en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano en un volumen de 100 µl y se incubó durante 6 horas a 37°C. Las células se reemplazaron con medio solo o con medio que contiene el inhibidor PARP a una concentración final de 0,5, 1 ó 5 µM. Las células se dejaron crecer durante 1 hora más antes de la adición de MMS en un intervalo de concentraciones (normalmente de 0, 1, 2, 3, 5, 7 y 10 µg/ml) a células no tratadas o células tratadas con el inhibidor PARP. Las células tratadas con el inhibidor PARP sólo se usaron para valorar la inhibición de crecimiento por parte del inhibidor PARP.

[0127] Las células se dejaron durante 16 horas más antes de sustituir el medio y dejar que las células crecieran durante 72 horas más a 37°C. A continuación se extrajo el medio y las células se fijaron con 100 µl de ácido tricloroacético al 10% (p/v) enfriado en hielo. Las placas se incubaron a 4°C durante 20 minutos y a continuación se

ES 2 372 630 T3

5 lavaron cuatro veces con agua. A continuación cada pocillo de células se tiñó con 100 μ l de SRB al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1% durante 20 minutos antes de lavar cuatro veces con ácido acético al 1%. A continuación las placas se secaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El colorante de las células teñidas se solubilizó con la adición de 100 μ l de Tris Base 10 mM a cada pocillo. Las placas se agitaron suavemente y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de medir la densidad óptica a 564 nm en un lector de placas de microtitulación Microquant.

[0128] El Compuesto A tiene una PF_{50} a 200 nM de al menos 20.

REIVINDICACIONES

1. La 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacin-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacin-1(2H)-ona en la Forma A cristalina, el compuesto que tiene los siguientes picos característicos en difracción de rayos X en polvo:

Pico	2θ° (±0,1°) (λ = 1,5418 Å)
1	12,0
2	17,8
3	21,1
4	22,3
5	29,2

2. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene los siguientes picos característicos en difracción de rayos X en polvo:

Pico	2θ° (±0,1°) (λ = 1,5418 Å)
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. El compuesto de cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comienza a fundir a 210,1°C ± 1°C cuando se calienta entre 25°C y 325°C a 10 °C por minuto en DSC.

4. Un procedimiento de obtención de la 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacin-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacin-1(2H)-ona (compuesto A) en la Forma A cristalina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:

- (i) cristalización de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil)piperacin-1-carbonil]-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacin-1-ona (Compuesto A) en un disolvente;
- (ii) si el disolvente original no es etanol, el tratamiento del compuesto cristalino A con etanol;
- (iii) el tratamiento del compuesto cristalino A con agua para eliminar el etanol atrapado;
- (iv) el secado de producto resultante.

5. Un procedimiento de obtención de la 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacin-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacin-1(2H)-ona (compuesto A) en la Forma A cristalina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:

- (i) cristalización de 4-[3-(4-ciclopropanocarbonil)piperacin-1-carbonil]-4-fluoro-bencil]-2H-ftalacin-1-ona en un disolvente;
- (ii) si el disolvente original usado en la síntesis del Compuesto A en la forma cristalina no es una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂, calentar el compuesto con una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂;
- (iii) la destilación de la mezcla a presión ambiente; y
- (iv) el secado del producto resultante.

6. Un procedimiento de obtención de la 4-(3-[[4-(ciclopropilcarbonil)piperacin-1-il]carbonil]-4-fluorobencil)ftalacin-1(2H)-ona (compuesto A) en la Forma A cristalina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:

- (i) la suspensión del Compuesto A en una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₂ como disolvente;
- (ii) el calentamiento de la suspensión a temperatura de reflujo;
- (iii) el enfriamiento de la disolución y la siembra con el Compuesto A en la Forma A;
- (iv) el secado del producto resultante.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o de un animal.
- 5 9. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de: una enfermedad vascular; choque séptico; lesión isquémica; neurotoxicidad; choque hemorrágico; o infección vírica.
- 10 10. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento para su uso como agente auxiliar en terapia contra el cáncer o para potenciar células tumorales para el tratamiento con radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos.
- 15 11. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 3 en la producción de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en el que dicho cáncer es deficiente en la vía de reparación de DSB del ADN dependiente de RH.
- 20 12. Uso según la reivindicación 11, en el que dicho cáncer comprende una o más células cancerígenas que tienen una capacidad reducida o anulada para reparar la DSB del ADN dependiente de RH en relación a células normales.
13. Uso según cualquiera de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en el que dicho tratamiento comprende además la administración de radiación ionizante o un agente quimioterapéutico.

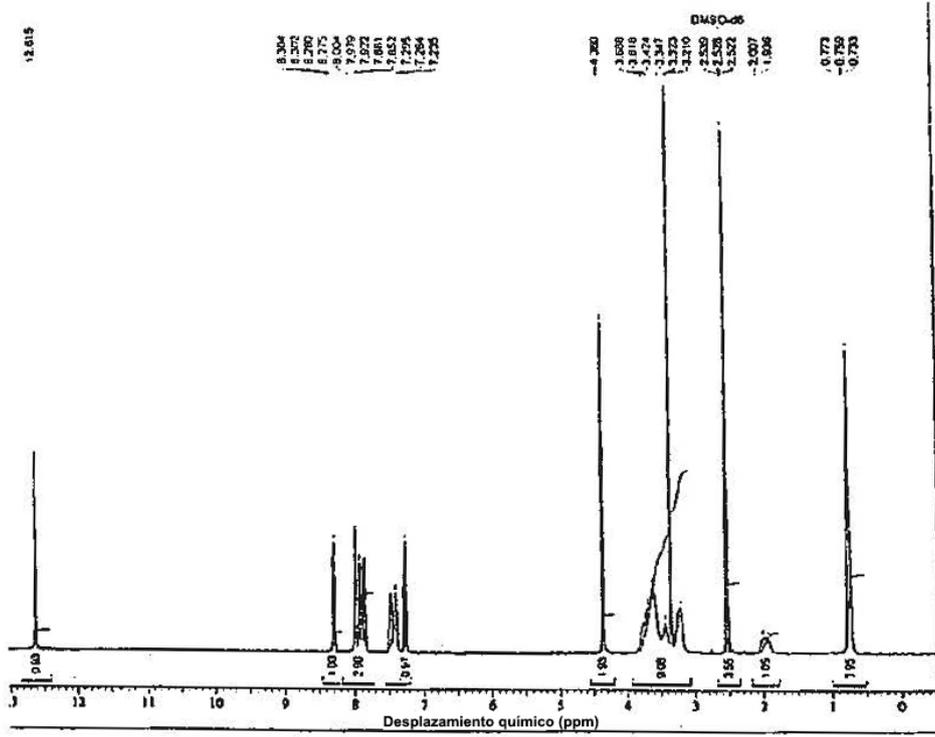


Figura 1

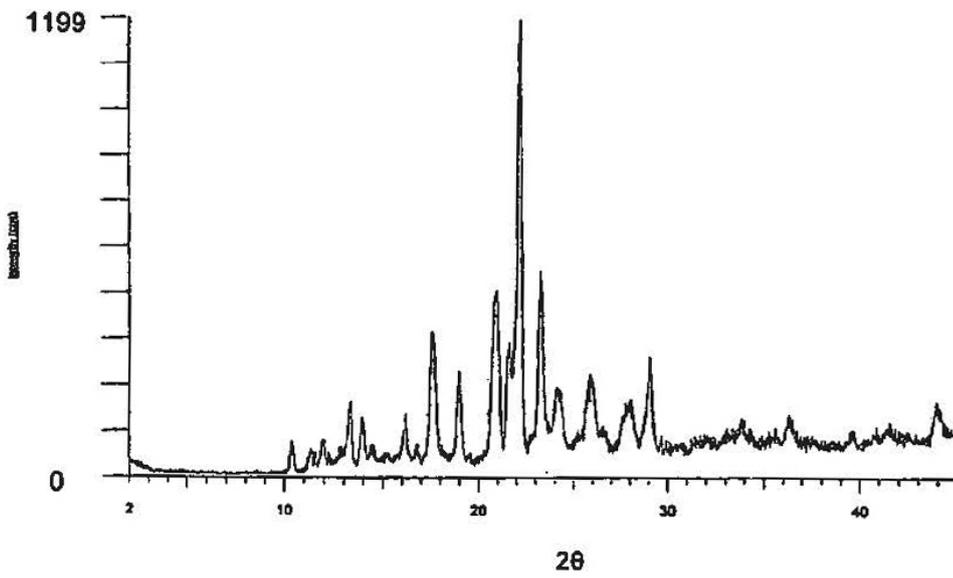


Figura 2

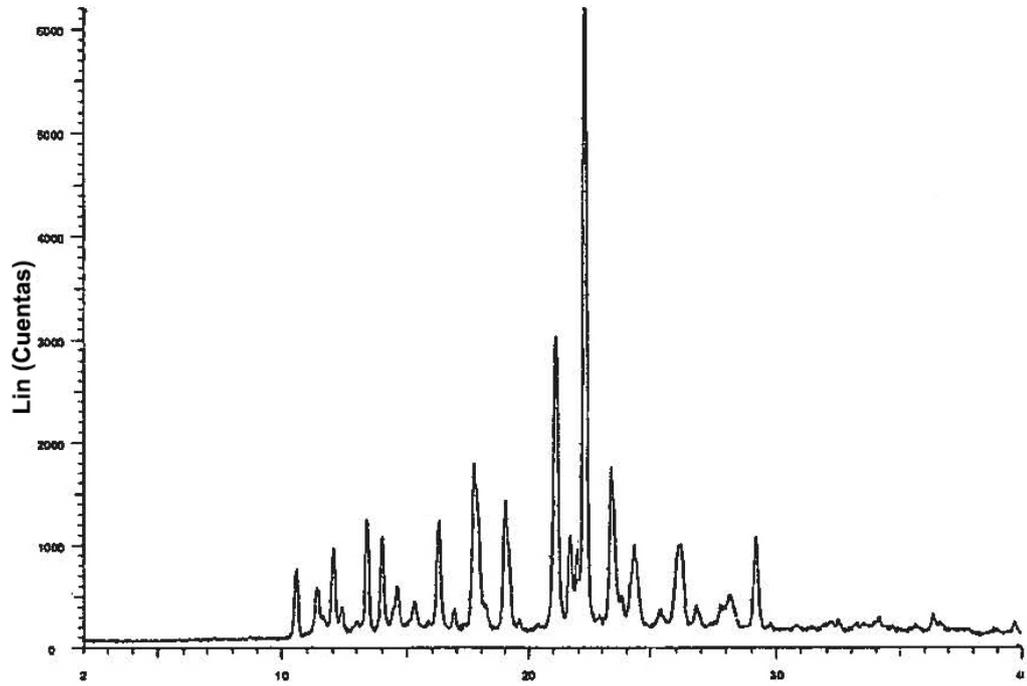


Figura 3

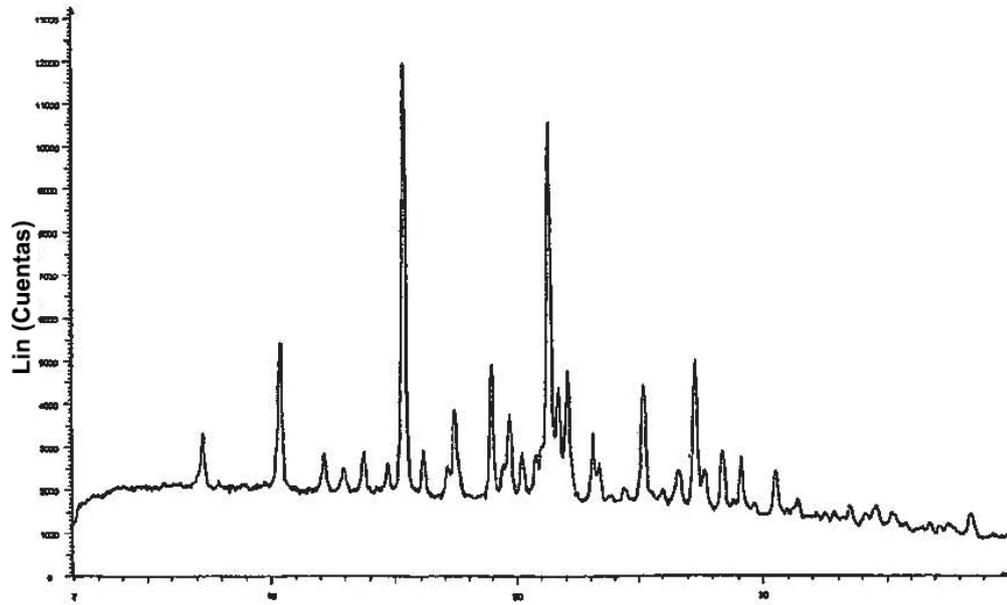


Figura 4

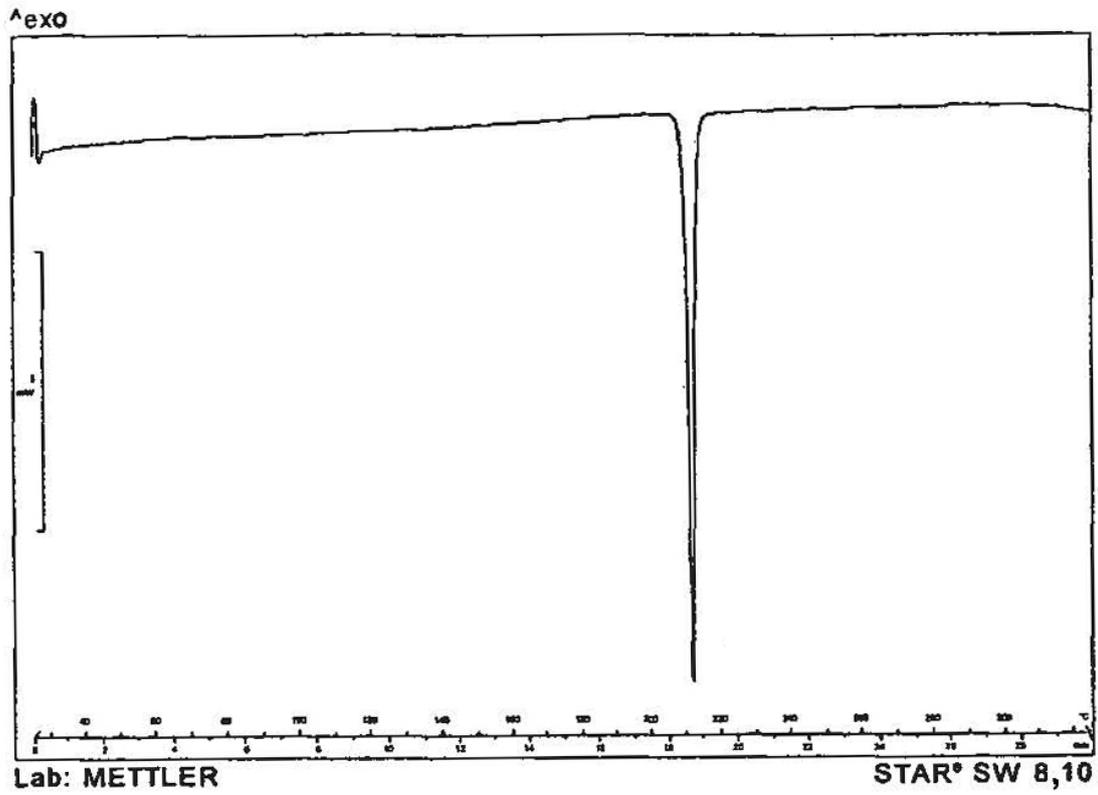


Figura 5