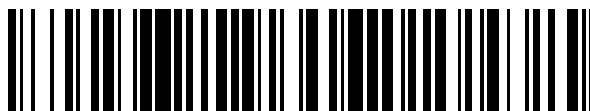


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 469**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/502** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798705 .2**  
96 Fecha de presentación: **30.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1684736**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **INHIBIDORES DE REPARACIÓN DE DAÑOS EN ADN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:  
**01.12.2003 US 526244 P**  
**01.12.2003 GB 0327844**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.01.2012**

73 Titular/es:  
**Kudos Pharmaceuticals Limited**  
**2 Kingdom Street**  
**London W2 6BD, GB y**  
**The Institute of Cancer Research**

72 Inventor/es:  
**ASHWORTH, Alan;**  
**JACKSON, Stephen;**  
**MARTIN, Niall y**  
**SMITH, Graeme**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 371 469 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

Inhibidores de reparación de daños en ADN para el tratamiento del cáncer

- 5 **[0001]** Esta invención se refiere a la inducción de mortalidad celular en células cancerosas, en particular en células cancerosas que son deficientes en la reparación de la ruptura de doble cadena (DSB) de ADN dependiente de recombinación homóloga (HR).
- 10 **[0002]** La reparación efectiva de los daños del ADN en las células se basa en mecanismos de detección de daños seguidos por la transducción de señales de daños a los efectores posteriores que se detienen en los puntos de control del ciclo celular y reparan el daño del ADN. Las células contienen una serie de vías distintas de señales y efectores que intervienen en la reparación de los diferentes tipos de daños en el ADN. Estas vías incluyen la reparación por escisión de base (BER), la reparación de la ruptura de doble cadena (OSD) de ADN dependiente de recombinación homóloga (HR), la unión de extremos no homólogos (NHEJ), la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación por escisión de base (BER) y la reparación de desapareamiento (MMR). La interacción y la interdependencia entre las diferentes vías de reparación del ADN sigue siendo poco conocida.
- 15 **[0003]** Los presentes inventores han descubierto que la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es selectivamente letal para las células cancerosas que son deficientes en la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR. Esto tiene importantes implicaciones en el tratamiento de las condiciones de cáncer.
- 20 **[0004]** Un aspecto de la invención proporciona el uso de un inhibidor de la PARP en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en el que dicho cáncer es deficiente en la actividad de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, tal como se establece en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que dicho cáncer es deficiente en la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 25 **[0005]** El cáncer puede comprender una o más células cancerosas que tienen una capacidad reducida o abrogada para reparar el ADN por dicha segunda vía de reparación respecto a las células normales.
- 30 **[0006]** La vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR repara roturas de doble cadena (DSBs) en el ADN a través de mecanismos homólogos para la reforma de 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 por DSB de ADN dependiente de HR incluyen 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 por DSB de ADN dependiente de HR incluyen factores reguladores tales como EMSY (Hughes-Davies et al, Cell, Vol 115, pp 523-535).
- 35 **[0007]** La vía de reparación por escisión de base (BER) repara roturas en el ADN de cadena sencilla y huecos y elimina bases específicas dañadas. Los huecos en la hélice de ADN se llenan por la acción secuencial de una poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y una ligasa. (K.K. Khanna y S.P. Jackson, Nat Genet, 27 (3): 247-254 (2001); Dantzer F. et al Biochemistry 39, 7559-69 2000; Hoeijmakers J.H., Nature 411 366-74 (2001)). Un inhibidor de la reparación por escisión de base puede inhibir uno de los componentes de la vía de reparación por escisión de base. Componentes de la vía BER incluyen: UNG (NM\_003362), SMUG1 (NM\_014311), MBD4 (NM\_003925), TDG (NM\_003211), OGG1 (NM\_002542), MYH (NM\_012222), NTHL1 (NM\_002528), MPG (NM\_002434), NEIL1 (NM\_024608), NEIL2 (NM\_145043), NEIL3 (NM\_018248), APE1 (NM\_001641), APE2 (NM\_014481), LIG3 (NM\_013975), XRCC1 (NM\_006297), ADPRT (PARP1) (NM\_0016718) y ADPRTL2 (PARP2) (NP\_005475).
- 40 **[0008]** Los inhibidores de PARP se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres deficientes en reparación por DSB de ADN dependiente de HR en combinación con un agente que daña el ADN. Preferiblemente, el agente que daña el ADN se utiliza en una dosis o formulación que, en ausencia del inhibidor de la BER, no es letal para las células. Agentes quimioterapéuticos adecuados que daña el ADN se describen a continuación.
- 45 **[0009]** Un inhibidor de la enzima de mamíferos poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (D'Amours et al, (1999) Biochem J. 342. 249-268) puede ser utilizado así para el tratamiento de un cáncer que es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 50 **[0010]** Un procedimiento de tratamiento de un cáncer deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR en un individuo puede comprender: administrar un inhibidor de la PARP tal como se establece en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 a dicho individuo.
- [0011]** Un inhibidor de la PARP tal como se establece en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 puede ser utilizado en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en el que el cáncer es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.

- [0012]** Los inhibidores de PARP se describen con más detalle a continuación.
- [0013]** Un cáncer que es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede comprender o consistir en una o más células cancerosas que tienen una capacidad reducida o abrogada para reparar DSBs de ADN a través de esa vía, en relación con las células normales, es decir la actividad de la vía reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede reducirse o suprimirse en una o más células cancerosas.
- [0014]** La actividad de uno o más componentes de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede suprimirse en una o más células de cáncer de un individuo que tiene un cáncer que es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR. Los componentes de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR están bien caracterizados en la técnica (véase, por ejemplo, Wood et al (2001) Science 291 1284 a 1289), e incluyen todos los componentes descritos anteriormente.
- [0015]** En algunas realizaciones preferidas, las células cancerosas pueden tener un fenotipo deficiente en BRCA1 y/o BRCA2, es decir la actividad de BRCA1 y/o de BRCA2 se reduce o elimina en las células cancerosas. Las células de cáncer con este fenotipo puede ser deficientes en los genes BRCA1 y/o BRCA2, es decir, la expresión y/o la actividad de BRCA1 y/o BRCA2 puede reducirse o suprimirse en las células cancerosas, por ejemplo mediante mutaciones o polimorfismos en el ácido nucleico que codifica, o mediante mutaciones o polimorfismos en un gen que codifica un factor regulador, por ejemplo, el gen EMSY que codifica un factor regulador BRCA2 (Hughes-Davies et al, Cell, Vol 115, pp523-535).
- [0016]** BRCA1 y BRCA2 son conocidos supresores de tumores cuya alelos de tipo salvaje se pierden con frecuencia en tumores de portadores heterocigotos (Jasin M. Oncogene. 16 de diciembre de 2002, 21 (58):8981-93; Tutt et al Trends Mol Med. (2002)8(12):571-6). La asociación de BRCA1 y/o mutaciones de BRCA2 en el cáncer de mama está bien caracterizado en la técnica (Radice P J Exp Clin Cancer Res 2002 Etapa; 21 (3 Supl):9-12). La amplificación del gen EMSY, que codifica un factor de unión BRCA2, también se sabe que está asociada con cáncer de mama y de ovario.
- [0017]** Los portadores de mutaciones en BRCA1 y/o BRCA2 también tienen un riesgo elevado de cáncer de ovario, próstata y páncreas.
- [0018]** En algunas realizaciones, una condición de cáncer en un individuo puede haber sido previamente identificada como un cáncer que es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- [0019]** En otras realizaciones, un procedimiento tal como se describe aquí puede comprender la etapa de identificación de una condición de cáncer en un individuo como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- [0020]** Un cáncer puede ser identificado como un cáncer deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR, por ejemplo, mediante la determinación de la actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en una o más células de cáncer a partir de una muestra obtenida de la persona o mediante la determinación de la actividad de uno o más componentes de la vía. La actividad puede ser determinada en relación a la células normales (es decir, no cancerosas), preferentemente del mismo tejido.
- [0021]** La actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede ser determinada mediante la medición de la formación de focos que contienen Rad51 en el núcleo en respuesta a los agentes que dañan el ADN o los inhibidores de PARP. Las células deficientes en la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR carecen de la capacidad de producir esos focos. La presencia de focos Rad51 se puede determinar utilizando técnicas de inmunofluorescencia.
- Otros procedimientos para determinar la actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR pueden incluir sensibilidad a IR, quimioterapéuticos, tales como reactivos de entrecruzamiento entre cadenas, agentes de inducción de DSB (inhibidores de ácido nucleico I y II), así como el uso del análisis de Western blot, inmunohistología, anomalías cromosómicas, ensayos de unión enzimática o ADN y ensayos basados en plásmidos.
- [0022]** En algunas realizaciones, un cáncer puede ser identificado como deficientes en una vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la determinación de la presencia de células cancerosas de la persona de una o más variaciones, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido que es un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- [0023]** Variaciones en la secuencia tales como mutaciones y polimorfismos pueden incluir una eliminación, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, en relación con la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la variación puede ser de la amplificación de genes, por ejemplo, una amplificación del gen EMSY (CAD22881, símbolo del gen C110RF30). La una o más variaciones pueden estar en una región codificante o no codificante de la secuencia de ácido nucleico y, pueden reducir o suprimir la expresión o función del polipéptido del componente de reparación por DSB de ADN dependiente de HR. En otras palabras, el ácido nucleico variante puede codificar una variante de polipéptido que tiene actividad reducida o abolida o puede codificar un polipéptido de tipo salvaje que tiene poca o ninguna expresión en la célula, por ejemplo a través de la alteración de la actividad de un

elemento regulador. Un ácido nucleico variante puede tener una, dos, tres, cuatro o más mutaciones o polimorfismos en relación con la secuencia de tipo salvaje.

**[0024]** La presencia de una o más variaciones en un ácido nucleico que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, se puede determinar mediante la detección, en una o más células de una muestra de prueba, la presencia de una secuencia de ácido nucleico de codificación que comprende una o más mutaciones o polimorfismos, o mediante la detección de la presencia del polipéptido de componente variante que es codificado mediante la secuencia de ácido nucleico.

**[0025]** Están disponibles varios procedimientos para determinar la presencia o ausencia en una muestra obtenida de un individuo de una secuencia de ácido nucleico particular, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que tiene una mutación o polimorfismo que reduce o anula la expresión o actividad de un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR. Además, al tener un ácido nucleico secuenciado de un individuo o muestra, la información de la secuencia pueden ser retenida y, posteriormente, buscarse sin recurrir al propio ácido nucleico original. Así, por ejemplo, el escaneado de una base de datos de información de secuencias utilizando software de análisis de secuencias puede identificar una alteración o mutación de la secuencia.

**[0026]** Procedimientos de acuerdo con algunos aspectos de la presente invención pueden comprender la determinación de la unión de una sonda de oligonucleótido de ácido nucleico obtenido de la muestra, por ejemplo, ADN, ARN o ADNc genómico. La sonda puede comprender una secuencia de nucleótidos que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico que contiene una o más mutaciones o polimorfismos y no se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico que no contiene una o más mutaciones o polimorfismos, o vice versa.

**[0027]** La sonda de oligonucleótidos puede incluir una etiqueta y la unión de la sonda se puede determinar mediante la detección de la presencia de la etiqueta.

**[0028]** Un procedimiento puede incluir hibridación de una o más (por ejemplo, dos) de las sondas de oligonucleótidos o cebadores en ácido nucleico diana. Cuando el ácido nucleico es ADN de doble cadena, la hibridación generalmente estará precedida por la desnaturalización para producir una sola cadena de ADN. La hibridación puede ser parte de un procedimiento de PCR, o parte de un procedimiento con sonda que no implica PCR. Un procedimiento de ejemplo podría ser una combinación de PCR y la hibridación de baja estrictencia.

**[0029]** La unión de una sonda a un ácido nucleico diana (ADN, por ejemplo) se puede medir utilizando cualquiera de una variedad de técnicas a disposición de los expertos en la materia. Por ejemplo, las sondas pueden estar etiquetadas de manera radiactiva, fluorescente o enzimática. Otros procedimientos que no utilizan el etiquetado de la sonda incluyen el examen de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, amplificación mediante PCR, división RN'asa y sondeo de oligonucleótidos específicos de alelo. El sondeo puede emplear la técnica estándar de transferencia de Southern. Por ejemplo, el ADN puede ser extraído de las células y se digiere con enzimas de restricción diferentes. Los fragmentos de restricción se pueden separar por electroforesis en gel de agarosa, antes de la desnaturalización y transferirse a un filtro de nitrocelulosa. La sonda etiquetada puede hibridarse a los fragmentos de ADN en el filtro y determinarse la unión.

**[0030]** Los expertos en la materia son capaces de emplear las condiciones adecuadas de estrictencia deseada para la hibridación selectiva, teniendo en cuenta factores tales como la longitud de oligonucleótidos y la composición de base, la temperatura y así sucesivamente.

**[0031]** Condiciones adecuadas de hibridación selectiva de oligonucleótidos de 17 a 30 bases incluyen hibridación durante la noche a 42°C en SSC 6X y lavado en SSC 6X en una serie de temperaturas en aumento de 42°C a 65°C.

**[0032]** Otras condiciones adecuadas y protocolos se describen en Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 3ª edición, Sambrook y Russell (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons (1992).

**[0033]** El ácido nucleico, que puede ser ADN, ARN o ADNc genómico, o una región amplificada del mismo, puede ser secuenciado para identificar o determinar la presencia de polimorfismo o mutación en el mismo. Un polimorfismo o mutación pueden ser identificados mediante la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia de la bases de datos del componente, tal como se indica anteriormente. En particular, la presencia de uno o más polimorfismos o mutaciones que causan la abrogación o pérdida de la función del componente del polipéptido, y así se puede determinar la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en su conjunto.

**[0034]** La secuenciación se puede realizar utilizando cualquiera de una serie de técnicas estándar. La secuenciación de un producto amplificado puede, por ejemplo, involucrar la precipitación con isopropanol, resuspensión y secuenciación usando un equipo de secuenciación de terminador TaqFS + Tinte. Productos de extensión se pueden someter a electroforesis en un secuenciador de ADN ABI 377 y los datos analizados utilizando el software Sequence Navigator.

**[0035]** Una reacción de amplificación específica, tal como PCR, que utiliza uno o más pares de cebadores

- 5 puede ser empleada convenientemente para amplificar la región de interés dentro de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, la porción de la secuencia que se sospecha que contiene mutaciones o polimorfismos. El ácido nucleico amplificado puede ser secuenciado como anteriormente, y/o probarse de cualquier otra manera para determinar la presencia o ausencia de una mutación o polimorfismo que reduzca o anule la expresión o la actividad del componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- [0036]** Reacciones de amplificación apropiadas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (revisada por ejemplo, en "PRC protocols; A Guide to Methods and Applications", Eds. Innis et al, 1990, Academic Press, Nueva York, Mullis et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987), Ehrlich (ed), PCR technology, Stockton Press, NY, 1989, y Ehrlich et al, Science, 252:1643-1650 (1991)).
- 10 **[0037]** En algunas realizaciones, un tipo de cáncer puede ser identificado como deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la evaluación del nivel de expresión o la actividad de un regulador positivo o negativo de un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, tal como EMSY. Los niveles de expresión se pueden determinar, por ejemplo, a través de Western blot, ELISA, RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos o análisis del cariotipo.
- 15 **[0038]** En algunas modalidades preferidas, el individuo es heterocigoto para una o más variaciones, tales como mutaciones y polimorfismos en BRCA1 y/o BRCA2 o un regulador de los mismos. La detección de la variación en BRCA1 y BRCA2 es muy conocido en la técnica y se describe, por ejemplo en EP699754, EP705903, Neuhausen S.L. y Ostrander E.A. Genet. Test (1992) 1, 75-83; Chappnis, P.O. y Foulkes, W.D. Cancer Res Treat (2002) 107, 29-59; Janatova M. et al Neoplasma. 2003; 50 (4):246-50; Jancarkova N Ceska Gynecol. 2003 68 (1): 11.06). La determinación de la amplificación del factor de unión EMSY BRCA2 se describe en Hughes-Davies et al Cell 115 523 a 535).
- 20 **[0039]** Las mutaciones y polimorfismos asociados con el cáncer puede ser detectados a nivel de proteínas mediante la detección de la presencia de un polipéptido variante (es decir, una variante mutante o alélica).
- [0040]** Un procedimiento de identificación de una célula de cáncer en una muestra de un individuo como deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede incluir contactar una muestra con un elemento de unión específico dirigido contra un componente de polipéptido variante (por ejemplo, mutante) de la vía, y determinar la unión de los elementos de unión específicos a la muestra. La unión de los elementos de la unión específicos a la muestra puede ser indicativa de la presencia del componente de la variante de polipéptido de la vía reparación por DSB de ADN dependiente de HR en una célula dentro de la muestra.
- 25 **[0041]** Moléculas de unión específicas preferidas para su uso en aspectos de la presente invención incluyen anticuerpos y fragmentos o sus derivados ("moléculas de anticuerpos").
- 30 **[0042]** La reactividad de un elemento de unión, tal como un anticuerpo en muestras normales y de prueba puede ser determinada por cualquier medio adecuado. El marcado con moléculas reporteras individuales es una posibilidad. Las moléculas reporteras pueden generar directa o indirectamente señales detectables, y preferentemente medibles. La vinculación de las moléculas reporteras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico o no covalente. La vinculación a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de un gen de fusión que codifica la molécula de unión (por ejemplo, anticuerpo) y la molécula reportera.
- 35 **[0043]** El modo de determinar la unión no es una característica de la presente invención y los expertos en la materia son capaces de elegir un modo adecuado de acuerdo a sus preferencias y conocimientos generales.
- 40 **[0044]** Las células de cáncer en general se caracterizan por una proliferación anormal respecto a las células normales y típicamente forman grupos o tumores en un individuo que tiene una condición de cáncer.
- [0045]** Una condición de cáncer, que es deficiente en la ruta de reparación por DSB de ADN dependiente de HR tal como se describe aquí, puede incluir cualquier tipo de cáncer sólido o linfoma maligno y, especialmente, leucemia, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de estómago y cáncer cerebral. En algunas realizaciones preferidas, la condición puede ser cáncer de mama, de ovario, de páncreas o de próstata. Tipos de cáncer pueden ser familiares o esporádicos.
- 45 **[0046]** Una muestra obtenida de un individuo puede ser una muestra de tejido que comprende una o más células, por ejemplo, una biopsia de un tejido canceroso tal como se describe anteriormente, o de un tejido no canceroso, por ejemplo, para su uso como control.
- 50 **[0047]** Los procedimientos de la invención pueden ser útiles en la evaluación de un individuo que tiene una condición de cáncer, por ejemplo, con el fin de determinar un curso terapéutico de acción.
- 55 **[0048]** Los inhibidores de PARP se describen con más detalle a continuación. Un procedimiento para evaluar la condición de cáncer puede comprender:

identificar una célula de cáncer obtenida a partir del individuo como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR en relación con las células normales, y;

proporcionar un inhibidor de la PARP adecuado para su administración a dicho individuo, en el que el inhibidor de PARP se selecciona del grupo que figura en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2.

5 **[0049]** En algunas realizaciones preferidas, la célula cancerosa que se identifica como deficiencia de reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede tener un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2.

**[0050]** Un individuo puede tener una predisposición a un cáncer que es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR. Los procedimientos y medios de la invención son particularmente útiles para estas personas.

10 **[0051]** Un individuo puede, por ejemplo, ser heterocigoto para una mutación o polimorfismo en un ácido nucleico que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un componente descrito anteriormente.

**[0052]** Un procedimiento de tratamiento de cáncer en un individuo puede comprender:

administrar un inhibidor de la PARP a dicho individuo,

15 en el que dicho individuo es heterocigoto para una mutación o polimorfismo en un gen que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.

**[0053]** Un inhibidor de PARP se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un cáncer en un individuo que es heterocigoto para una mutación en un gen de una vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR y un inhibidor de PARP se puede utilizar en el tratamiento de un cáncer en un individuo que es heterocigoto para una mutación en un gen que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.

**[0054]** En algunas realizaciones preferidas, un individuo que es heterocigoto para una mutación o polimorfismo en un gen que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede ser heterocigotos para una mutación o polimorfismo en BRCA1 y/o BRCA2.

25 **[0055]** Un inhibidor de la PARP reduce o suprime la actividad de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP).

**[0056]** El término PARP tal como se usa aquí se refiere a PARP1 (CE 2.4.2.30, Genbank N°: M32721) y/o PARP2 (Ame et al J. Biol Chem (1999) 274 15504 a 15511; GenBank N°: AJ236912) a menos que el contexto dicte lo contrario.

**[0057]** Ejemplos de compuestos que son inhibidores de la PARP conocidos son:

30 1. Nicotinamidas, tal como 5-metil-nicotinamida y O-(2-hidroxi-3-piperidino-propil)-3-ácido carboxílico amidoxima, y análogos y derivados del mismo.

2. Benzamidas, incluyendo 3-benzamidas sustituidas tal como 3-aminobenzamida, 3-hidroxibenzamida, 3-nitrosobenzamida, 3-metoxibenzamida y 3-cloroprocainamida y 4-aminobenzamida, 1, 5-di [(3-carbamoilfenil) aminocarboniloxi] pentano, y análogos y sus derivados.

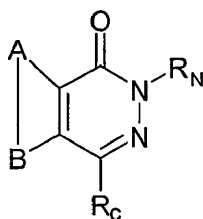
35 3. Isoquinolinones y dihidroisoquinolinones, incluyendo 2H-isoquinolin-1-onas, 5-dihidroisoquinolinones sustituidos, tales como 5-hidroxi dihidroisoquinolinona, 5-metil dihidroisoquinolinona y isoquinolinone 5-hidroxi, 5-amino-1-isoquinolin uno, 5-dihydroxyisoquinolinone, 3, 4 dihidroisoquinolina-1(2H)-onas tal como 3, 4 dihidro-5-metoxi-isoquinolin-1(2H)-ona y 3, 4 dihidro-5-metil-1(2H) isoquinolinona, isoquinolin-1(2H)-onas, 4,5-dihidro-imidazo [4,5,1-ij] quinolin-6-onas, 1, 6-naftiridina-5(6H)-onas, 1,8-naftalimidias tales como 4-amino-1,8-naftalimida, isoquinolinona, 3, 4-dihidro-5-[4-1 (1-piperidinil) butoxi]-1 (2H)-isoquinolinona, 2, 3 dihidrobenzo [de]isoquinolin-1-ona, 1-11b-dihidro-[2H] benzopirano [4, 3, 2 de] isoquinolin-3-ona, y tetracíclicos lactámicos, incluyendo benzpiranoisoquinolinonas tales como benzopirano [4,3,2-de]isoquinolinona, y los análogos y derivados,

45 4. Bencimidazoles e indoles, incluyendo benzoxazol-4-carboxamidas, benzimidazol-4-carboxamidas, tales como 2-benzoxazol sustituido 4-carboxamidas y 2-benzimidazol sustituido 4-carboxamidas tales como 2-aril benzimidazol 4-carboxamidas y 2-cicloalquilbenzimidazol-4 carboxamidas que incluyen 2-(4-hidroxifenil) benzimidazol 4-carboxamida, quinoxalinecarboxamidas, imidazopiridinecarboxamidas, 2-fenilindoles, 2-benzoxazoles sustituidos, tales como 2-fenil benzoxazol y 2-(3-metoxifenil) benzoxazol, 2-benzimidazoles sustituidos, tales como 2-fenil bencimidazol y 2-(3-metoxifenil) bencimidazol, 1, 3, 4, 5 tetrahidro-azepino [5, 4, 3-cd] indol-6-ona, azepinoindoles y azepinoindolones tales como 1, 5-dihidro azepino [4, 5, 6-cd] indolin-6-ona y dihidrodiazapinoindolinona, 3-dihidro-diazapinoindolinonas sustituidas, tales como 3-(4-trifluorometilfenil)-dihidro-diazapinoindolinona, tetrahidrodiazapinoindolinona y 5,6,-dihidroimidazo [4, 5, 1-j, k] [1, 9] benzodiazopin-7 (4H)-ona, 2-fenil-5 ,6-dihidro-imidazo [4,5,1-jk] [1,4] benzodiazepin-7 (4H)-ona y 2, 3, dihidro-isoindol-1-ona, y sus análogos y derivados,

5. Ftalazin-1(2H)-onas y quinazolinonas, tales como 4-hidroxiquinazolina, ftalazinona, 5-metoxi-4-metil-1(2) ftalazinonas, 4- ftalazinonas sustituidas, 4-(1-piperazinil)-1(2H) -ftalazinona, benzopirano tetracíclico [4, 3, 2-de] ftalazinonas y indeno tetracíclico [1, 2, 3-de] ftalazinonas, 3H-quinazolin-4-onas y 2- quinazolinonas sustituidas, tal como 8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-(3H)ona, ftalazinonas tricíclicas y 2-aminoftalhidrazido, y análogos y derivados de los mismos.
- 5 6. Isoindolinonas y análogos y derivados de los mismos.
7. Fenantridinas y fenantridinonas, por ejemplo, 5 [H] fenantridin-6-ona, 5 [H] fenantridin-6-ona sustituida, en especial 2-, 3-5[H] fenantridin-6-onas sustituidas y sulfonamida/carbamida derivadas de 6(5H) fenantridinonas, tieno [2, 3-c] isoquinolonas tal como 9-amino tieno [2, 3-c] isoquinolona y 9 hidroxitieno-[2, 3-c] isoquinolona, 9-metoxitieno [2, 3-c] isoquinolona, y N-(6-oxo-5, 6 dihidrofenantridin-2-il)-2-(N, N-dimetilamino) acetamida, 9,9-dihidrocyclopenta [1mn] fenantridina-5-ona sustituida, y s análogos y derivados de los mismos.
- 10 8. Benzopironas tales como 1, 2-benzopirona, 6-nitrosobenzopirona, 6-nitroso 1, 2 benzopirona y 5-yodo-6-aminobenzopirona, y análogos y derivados de los mismos.
9. Derivados de ácido hidroxímico insaturado tales como O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil) amidoxima nicotínico, y análogos y derivados de los mismos.
- 15 10. Piridazinas, incluyendo piridazinas fundidas y análogos y derivados de los mismos.
11. Otros compuestos tales como cafeína, teofilina y timidina y análogos y derivados de los mismos.

**[0058]** Inhibidores de PARP adicionales se describen, por ejemplo, en los documentos US 6.635.642, US 5.587.384, WO2003080581, WO2003070707, WO2003055865, WO2003057145, WO2003051879, US6514983, WO2003007959, US6426415, WO2003007959, WO2002094790, WO2002068407, US6476048, WO2001090077, WO2001085687, WO2001085686, WO2001079184, WO2001057038, WO2001023390, WO2001021615, WO2001016136, WO2001012199, WO9524379, Banasik et al. J. Biol. Chem., 267:3, 1569-1575 (1992), Banasik et al. Molec. Cell. Biochem. 138:185-97 (1994)), Cosi (2002) Expert Opin. Ther. Patents 12 (7), y Southan y Szabo (2003) Curr Med Chem 10 321-340 y referencias allí citadas.

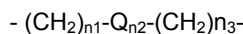
**[0059]** Una clase preferida de los inhibidores de PARP adecuados incluye ftalazinonas tales como 1 (2H)-ftalazinona y sus derivados, tal como se describe en el documento WO02/36576. En particular, los compuestos de la fórmula:



es isómeros, sales, solvatos, formas químicamente protegidas y profármacos de los mismos, puede ser utilizado para inhibir la PARP en donde:

30 A y B juntos representan un anillo aromático fusionado opcionalmente sustituido;

R<sub>C</sub> está representado por LR<sub>L</sub>, donde L es de fórmula:

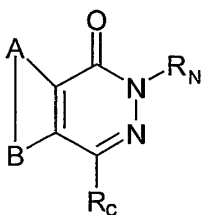


35 donde n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub> y n<sub>3</sub> se seleccionan cada uno entre 0, 1, 2 y 3, la suma de n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub> y n<sub>3</sub> es 1, 2 ó 3 y Q se selecciona entre O, S, NH, C(=O) o -CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno o C<sub>1-7</sub> alquilo opcionalmente sustituido, o juntos pueden con el átomo de carbono al cual están unidos formar un grupo alquilo cíclico C<sub>3-7</sub>, que puede ser saturado (un grupo cicloalquilo C<sub>3-7</sub>) o insaturado (un grupo cicloalqueno C<sub>3-7</sub>), o uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> puede estar unidos a un átomo en R<sub>L</sub> para formar un grupo cicloalqueno insaturado C<sub>3-7</sub> que comprende los átomos de carbono a los que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se unen en Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>3</sub></sub>- (si está presente) y parte de R<sub>L</sub>;

y R<sub>L</sub> es C<sub>5-20</sub> arilo opcionalmente sustituido, y

40 R<sub>N</sub> se selecciona entre hidrógeno, C<sub>1-7</sub> alquilo opcionalmente sustituido, C<sub>3-20</sub> heterociclilo, y C<sub>5-20</sub> arilo, hidroxilo, éter, nitro, amino, amido, tiol, tioéter, sulfóxido y sulfona.

**[0060]** Preferiblemente un compuesto de la fórmula:



o un isómero, sal, solvato, forma químicamente protegida, o profármaco del mismo puede ser utilizado para inhibir la PARP, en el que:

A y B juntos representan un anillo aromático fusionado opcionalmente sustituido;

5  $R_C$  es  $-CH_2-R_L$ ;

$R_L$  es fenilo opcionalmente sustituido, y

$R_N$  es hidrógeno.

10 **[0061]** En algunas realizaciones preferidas, un compuesto que tiene la estructura de KU-0058684 o KU-0058948 tal como se establece en la figura 2, o un isómero, sal, solvato, forma químicamente protegida, o profármaco del mismo, puede ser utilizado para inhibir la PARP.

**[0062]** Inhibidores de la PARP adecuados están disponibles comercialmente o se pueden sintetizar mediante procedimientos conocidos a partir de materiales de partida que se conocen (véase, por ejemplo, Suto et al. *Anticancer Drug Des.* 6:107-17 (1991)).

15 **[0063]** Otra clase de los inhibidores de la PARP incluye fragmentos de péptidos de la secuencia de PARP. Por ejemplo, fragmentos de péptidos de la secuencia de la PARP pueden ser utilizados para inhibir la PARP y, por lo tanto, reducir o suprimir la actividad de la vía BER. Fragmentos de péptidos se pueden generar en su totalidad o en parte mediante síntesis química usando las secuencias publicadas de los componentes, por ejemplo, la secuencia PARP publicada (Acc No: NM\_001618). Fragmentos de péptidos se pueden preparar fácilmente de acuerdo a las descripciones establecidas, líquido estándar o, preferiblemente, procedimientos de síntesis de péptidos de fase sólida, 20 cuyas descripciones generales están ampliamente disponibles (véase, por ejemplo, en J.M. Stewart y J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York (1984) y *Applied Biosystems 430A Users Manual*, ABI Inc., Foster City, California), o pueden ser preparados en solución, mediante el procedimiento de fase líquida o mediante cualquier combinación de fase sólida, fase líquida y una solución química, por ejemplo, completando 25 primero la correspondiente porción de péptido y luego, si se desea y es apropiado, después de eliminación de cualquier grupo de protección presente, mediante la introducción del residuo X mediante la reacción del respectivo ácido carbónico o sulfónico o un derivado reactivo del mismo.

30 **[0064]** Otros compuestos candidatos para inhibir la PARP pueden estar basados en el modelado de la estructura tridimensional del componente y usando diseño racional de fármacos para proporcionar a los compuestos candidatos con una particular forma molecular, tamaño y características de carga. Un inhibidor candidato, por ejemplo, puede ser un "análogo funcional" de un fragmento de péptido u otro compuesto que inhibe el componente. Un análogo funcional tiene la misma actividad funcional que el péptido o de otro compuesto en cuestión, es decir, que puede interferir con las interacciones o la actividad del componente de la vía de reparación de ADN. Ejemplos de dichos análogos incluyen compuestos químicos que son modelados para parecerse a la estructura tridimensional de los 35 componentes en un área que hace contacto con otro componente, y en particular la disposición de los residuos de aminoácidos clave cuando aparecen.

**[0065]** Otra clase de inhibidores de la PARP incluyen ácido nucleico que codifica una parte o la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la PARP (No Acc: NM\_001618), o el complemento de los mismos, que inhiben la actividad o la función mediante la regulación negativa de la producción del polipéptido activo.

40 **[0066]** Por ejemplo, la inhibición de la actividad de la PARP se puede determinar usando procedimientos convencionales, incluyendo por ejemplo manchas de puntos (Affar EB et al *Anal Biochem* 1998; 259 (2):280-3), y ensayos BER que miden la actividad directa de la PARP para formar cadenas de poli ADP-ribosa, por ejemplo, mediante el uso de ensayos radiactivos con sustrato de tritio NAD o de anticuerpos específicos para las cadenas de polímeros formadas por la actividad de la PARP (K.J. Dillon et al, *Journal of Screening Biomolecular*, 8 (3): 347-352 45 (2003).

**[0067]** Por ejemplo, la expresión de la PARP se puede inhibir usando tecnología de anti-sentido o RNAi. El uso de estos enfoques para regular a la baja la expresión de genes está ahora bien establecida en la técnica.



- 5 **[0068]** Los oligonucleótidos anti-sentido pueden ser diseñados para hibridar con la secuencia complementaria de ácido nucleico, pre-ARNm o mRNA maduro, lo que interfiere con la producción del componente de la vía de reparación de la escisión de base, por lo que su expresión se reduce o se impide totalmente o substancialmente de manera completa. Además de seleccionar la secuencia de codificación, las técnicas anti-sentido pueden ser utilizadas para desarrollar secuencias de control de un gen, por ejemplo, en la secuencia de flanqueado 5', con lo que los oligonucleótidos anti-sentido pueden interferir con la expresión de secuencias de control. La construcción de las secuencias anti-sentido y su uso se describe por ejemplo en Peyman y Ulman, Chemical Reviews, 90:543-584, (1990) y Crooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:329-376, (1992).
- 10 **[0069]** Los oligonucleótidos pueden ser generados *in vitro* o *ex vivo* para administración o se puede generar ARN anti-sentido *in vivo* en las células en que se desee la baja regulación. Por lo tanto, el ADN de doble cadena se puede colocar bajo el control de un promotor en una "orientación inversa" de tal manera que la transcripción de la cadena anti-sentido del ADN produce ARN que es complementario al ARNm normal transcrito de la cadena de sentido del gen diana. La secuencia de ARN anti-sentido complementaria se piensa que entonces se una con ARNm para formar una traslación de inhibición doble del mRNA endógeno a partir del gen diana en proteína. Si es o no es el modo de acción real es todavía incierto. Sin embargo, es un hecho establecido que la técnica funciona.
- 15 **[0070]** No es necesario usar la secuencia completa que corresponde a la secuencia de codificación en orientación inversa. Por ejemplo, se pueden utilizar fragmentos de una longitud suficiente. Es una cuestión de rutina para el experto en la materia cribar fragmentos de varios tamaños y de diversas partes de las secuencias codificantes o de flanqueo de un gen para optimizar el nivel de inhibición anti-sentido. Puede ser ventajoso incluir el codón ATG metionina de iniciación, y quizás uno o más nucleótidos antes del codón de iniciación. Un fragmento adecuado pueda tener aproximadamente de 14 a 23 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 15, 16 ó 17.
- 20 **[0071]** Una alternativa al anti-sentido es el uso de una copia de todo o parte del gen diana insertado en sentido, que es la misma orientación que el gen diana, para lograr una reducción en la expresión del gen diana mediante co-supresión; Angell y Baulcombe (1997) The EMBO Journal 16,12:3675-3684 y Voinnet y Baulcombe (1997) 389 Nature: pg 553). ARN de doble cadena (dsRNA) se ha encontrado que es aún más efectivo en el silenciamiento de genes de ambas cadenas de sentido o anti-sentido en solitario (Fire A. et al Nature 391, (1998)). El silenciamiento mediado por dsRNA es específico para el gen, y a menudo es llamado interferencia de ARN (RNAi).
- 25 **[0072]** La interferencia de ARN es un proceso de dos etapas. En primer lugar, el dsRNA se separa dentro de la célula para producir ARNs cortos de interferencia (siRNAs) de aproximadamente 21-23nt de longitud con fosfato terminal 5' y proyecciones cortas 3' (~ 2nt). Los siRNAs se digieren a la secuencia del ARNm correspondiente específicamente para la destrucción (Zamore P.D. Nature Structural Biology, 8, 9, 746-750, (2001)).
- 30 **[0073]** RNAi también puede ser inducida de manera eficiente mediante el uso de dobles de siRNA sintetizados químicamente de la misma estructura con extremos de proyección 3' (Zamore P.D. et al Cell, 101, 25-33, (2000)). Dobles siRNA sintéticos han demostrado que suprimen específicamente la expresión de genes endógenos y heterólogos en una amplia gama de líneas celulares de mamíferos (Elbashir SM. et al. Nature, 411, 494-498, (2001)).
- 35 **[0074]** Otra posibilidad es utilizar ácido nucleico que en la transcripción produce una ribozima, capaz de cortar ácido nucleico en un sitio específico - por lo tanto, también es útil para influir en la expresión génica. Referencias de antecedentes para ribozimas incluyen Kashani-Sabet y Scanlon, 1995, Cancer Gene Therapy, 2 (3): 213-223, y Mercola y Cohen, 1995, Cancer Gene Therapy, 2 (1), 47-59.
- 40 **[0075]** Los procedimientos pueden comprender la administración de un inhibidor de la PARP a un individuo. Esto puede ocurrir después de haber identificado a la persona con una condición de cáncer deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 45 **[0076]** Aunque es posible que el compuesto activo se administre en solitario, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación) que comprende al menos un compuesto activo, tal como se define anteriormente, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia y opcionalmente, otros agentes terapéuticos o profilácticos.
- 50 **[0077]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de reparación por escisión de base según la definición anterior, por ejemplo, un inhibidor mezclado junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, tampones, adyuvantes, estabilizadores, u otros materiales, tal como se describe aquí, se pueden utilizar en los procedimientos que aquí se describen.
- 55 **[0078]** El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa aquí se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, con una razonable relación beneficio/riesgo. Cada portador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.
- [0079]** Los portadores adecuados, excipientes, etc. se pueden encontrar en textos farmacéuticos estándar,

por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990.

**[0080]** Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitarias y pueden prepararse por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un portador que puede constituir uno o más ingredientes adicionales. En general, las formulaciones se preparan de manera uniforme e íntimamente en asociación del compuesto activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego si es necesario dar forma al producto. Las formulaciones pueden ser en forma de líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, jarabes, tabletas, pastillas, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, pastillas, ampollas, supositorios, óvulos, cremas, geles, pastas, cremas, aerosoles, nieblas, espumas, lociones, aceites, bolos, electuarios o aerosoles.

**[0081]** El inhibidor de la PARP o composición farmacéutica que comprende el inhibidor puede ser administrada a un sujeto por cualquier vía conveniente de administración, ya sea de manera sistémica/periferia o en el sitio de acción deseado, incluyendo pero no limitado a, oral (por ejemplo, por ingestión); tópica (incluyendo por ejemplo, transdérmica, intranasal ocular, bucal y sublingual), pulmonar (por ejemplo, inhalación o terapia de insuflación con, 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, intrarraquídea, intracapsular, subcapsular, intraorbitario, intraperitoneal, intratraqueal subaracnoidea subcuticular, intraarticular, y intraesternal; por implante de un depósito, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

**[0082]** Las formulaciones adecuadas para administración oral (por ejemplo, por ingestión) pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo, en forma de polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua líquida o agua en aceite, emulsión líquida, como un bolo, como un electuario, o como una pasta.

**[0083]** Un comprimido puede hacerse por medios convencionales, por ejemplo, compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos pueden prepararse por compresión en una máquina adecuada, el compuesto activo en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, goma arábica, sorbitol, celulosa tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa), rellenos o diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de hidrógeno de calcio), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice), disgregantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, reticulado carboximetilcelulosa de sodio); tensioactivo o agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio) y conservantes (por ejemplo, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, ácido sórbico). Las tabletas moldeadas pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente pueden recubrirse o marcarse y pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo, utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Las tabletas opcionalmente pueden estar provistas de un recubrimiento entérico, para proporcionar la liberación en partes del intestino que no sea el estómago.

**[0084]** Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral (por ejemplo, por inyección, incluyendo cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), son isotónicas acuosas y no acuosas, libre de pirógenos, soluciones inyectables estériles que pueden contener antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, agentes bacteriostáticos y solutos que forman la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes y liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para tratar el compuesto en los componentes de la sangre o uno o más órganos. Ejemplos de portadores isotónicos para su uso en dichas formulaciones incluyen cloruro de sodio, solución de Ringer, o inyección de Ringer con lactato. Típicamente, la concentración del compuesto activo en la solución es de aproximadamente 1 ng/ml a 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a 1 µg/ml. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosis unitarias o contenedores sellados de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado congelado en seco (liofilizado) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles. Las formulaciones pueden ser en forma de liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para tratar el compuesto activo en los componentes de la sangre o uno o más órganos.

**[0085]** Se apreciará que dosis apropiadas de los compuestos activos, y composiciones que comprenden los compuestos activos, puede variar de paciente a paciente. La determinación de la dosis óptima generalmente implica el equilibrio entre el nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales 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 en particular, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de los compuestos, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación, y la edad, sexo, peso, condición de salud general, y de la historia clínica previa del paciente. La cantidad de compuesto y vía de administración será en última instancia a la discreción del médico, aunque en general la dosis será para alcanzar concentraciones locales en el sitio de acción que conseguir el efecto deseado sin causar perjuicios substanciales o nocivos efectos secundarios.

- 5 **[0086]** Las composiciones que comprenden inhibidores de vía de la PARP pueden ser utilizadas en los procedimientos aquí descritos, en combinación con regímenes de quimioterapia estándar que dañan el ADN de las células de cáncer. Agentes adecuados pueden incluir inhibidores de la actividad de la topoisomerasa I y II, tales como camptotecina, fármacos tales como irinotecan, topotecan y rubitecan, agentes alquilantes tales como temozolomida y DTIC (dacarbazina), y agentes de platino tales como cisplatino, doxorubicina-cisplatino-ciclofosfamida, carboplatino, y carboplatino-paclitaxel.
- [0087]** Otros agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen doxorubicina-ciclofosfamida, capecitabina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, docetaxel, 5-fluoracil-epirubicina-ciclofosfamida, paclitaxel, vinorelbina, etopósido, doxorubicina liposomal pegilada y topotecan.
- 10 **[0088]** El tratamiento de las personas que utilizan estos agentes es bien conocido en la técnica.
- [0089]** La administración *in vivo* se puede realizar en una sola dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas en intervalos apropiados) durante el curso del tratamiento. Procedimientos para determinar el medio más eficaz y la dosis de administración son bien conocidos por los expertos en la materia y variarán con la formulación que se utiliza para la terapia, el propósito de la terapia, la célula diana a tratar, y el sujeto a tratar.
- 15 **[0090]** Administraciones únicas o múltiples pueden realizarse con la dosis y el patrón es seleccionado por el médico tratante.
- [0090]** En general, una dosis adecuada del compuesto activo se encuentra en el rango de 100 mg a 250 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Cuando el compuesto activo es una sal, un éster, profármaco, o similares, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto original y, por lo tanto, el peso real que se utilizará se incrementa proporcionalmente.
- 20 **[0091]** Los procedimientos de la invención también pueden ser útiles en la investigación y la evaluación de una condición de cáncer en un individuo.
- [0092]** Un procedimiento para evaluar la actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en una condición de cáncer puede comprender:
- 25 contactar un inhibidor de la PARP con una muestra de células cancerosas obtenidas de la persona con la enfermedad, y
- determinar la cantidad de muerte celular en dicha muestra en relación con una muestra de control.
- [0093]** Un incremento en la muerte celular en la muestra en relación con las células de control que tienen niveles normales de actividad de la reparación por DSB de ADN dependiente de HR es indicativo de que el cáncer es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 30 **[0094]** La persona puede tener una condición de cáncer y la muestra puede ser una muestra de células de cáncer, por ejemplo, a partir de una biopsia del tumor.
- [0095]** Un aumento de la sensibilidad a los inhibidores de la PARP en las células de la muestra en relación con las células de control es indicativo de que el cáncer es deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 35 **[0096]** Un aumento de la sensibilidad a los inhibidores de PARP puede ser indicativo de que las células cancerosas tienen un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2, por ejemplo, una reducción o supresión de la expresión o actividad de BRCA1 o BRCA2.
- [0097]** Una condición de cáncer identificada como deficiente en la actividad de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, por ejemplo, una condición que tiene un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2, pueden ser sometida a tratamientos que están dirigidos específicamente a tales condiciones. Tratamientos adecuados pueden incluir el uso de agentes de enlaces transversales de ADN, tales como la mitomicina C, cisplatino o carboplatino.
- 40 **[0098]** Pueden ser utilizados procedimientos para predecir la respuesta a una condición de cáncer en un individuo en un tratamiento de selección de HR, por ejemplo, un tratamiento específico para cánceres que tienen un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2.
- 45 **[0099]** Un procedimiento de predicción de la respuesta de una condición de cáncer en un individuo a un tratamiento de diana de cánceres deficientes en reparación por DSB de ADN dependiente de HR puede comprender:
- contactar un inhibidor de la PARP con una muestra de células cancerosas obtenidas de la persona con la condición de cáncer, y
- determinar la cantidad de muerte celular en dicha muestra en relación con una muestra de control.
- 50 **[0100]** Un incremento en la muerte celular en la muestra en relación con las células de control que tienen niveles normales de actividad de reparación por DSB de ADN dependiente de HR (es decir, un aumento de la

sensibilidad a los inhibidores de la PARP) es indicativo de que los pacientes pueden responder bien a dicho tratamiento.

**[0101]** Los tratamientos de diana de los cánceres deficientes en reparación por DSB de ADN dependiente de HR, por ejemplo, cáncer deficientes en BRCA1 o BRCA2, pueden incluir, por ejemplo, agentes de enlaces transversales de ADN, tales como mitomicina C, cisplatino o carboplatino.

5 **[0102]** Aspectos de la presente invención se ilustrarán ahora con referencia a las figuras adjuntas que se describen a continuación y ejemplificación experimental, a modo de ejemplo y no limitativo. Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

10 **[0103]** Varios parámetros y características de la invención se indican anteriormente. Para evitar dudas, se indica que todas las combinaciones y sub-combinaciones de estos parámetros y características están comprendidos en la presente invención.

La figura 1 muestra que una reducción en el nivel de PARP1 reduce la viabilidad de células mutantes *BRCA1* y *BRCA2* en relación con células de tipo salvaje.

La figura 2 muestra los inhibidores de la PARP KU0058684, KU0058948 y KU0051529 y sus IC<sub>50</sub>s contra la actividad de la enzima PARP-1.

15 Las figuras 3 y 4 muestran curvas de supervivencia clonigénicas de las células expuestas a inhibidores de la PARP.

La Figura 3 muestra Brca1 de tipo salvaje (11C0:■), heterocigotos (Cre6: ▲) y células ES deficientes (Cre10: ●) bajo la exposición continua a los inhibidores de la PARP (KU0058684, parte superior; KU0058948, medio; KU0051529, abajo). Las barras de error representan los errores estándar de la media.

20 La figura 4 muestra Brca2 de tipo salvaje (D3■), heterocigotos (Cre 6: ▲) y células ES deficientes (Cre24: ●) bajo exposición continua a los inhibidores de la PARP (KU0058684, parte superior; KU0058948, medio; KU0051529, abajo). Las barras de error representan los errores estándar de la media.

Las figuras 5 y 6 muestran curvas de supervivencia clonigénicas después de 1, 4 y 24 horas de tiempo de exposición a KU0058684.

25 La figura 5 muestra BRCA1 de tipo salvaje (11CO: ■), heterocigotos (Cre6: ▲) y células ES deficientes (Cre10: ●) después de un tiempo de exposición de 1 (arriba), 4 (medio) y 24 horas (derecha) a KU0058684. Las barras de error representan los errores estándar de la media.

30 La figura 6 muestra Brca2 de tipo salvaje (D3■), heterocigotos (Cre6: ▲) y células ES deficientes (Cre24: ●) después de un tiempo de exposición de 1 (arriba), 4 (medio) y 24 horas (derecha) a KU0058684. Las barras de error representan los errores estándar de la media.

Las figuras 7 y 8 muestran que la inhibición de la PARP en células mutantes BRCA-1 y BRCA-2 tratadas con inhibidores de la PARP resultó en una mayor detención de G2/M.

35 La figura 7 muestra Brca1 de tipo salvaje (11CO: arriba) y células mutantes (Cre10: parte inferior) tratadas con KU0058684 durante 24h a 0 nM (izquierda), 10 nM (medio) o 1μM (derecha) y se analizaron mediante FACS.

La figura 8 muestra Brca2 de tipo salvaje (D3) y células mutantes (Cre24) tratadas con KU0058684 durante 24h a 0 nM (izquierda), 10 nM (medio) o 1μM (derecha) y se analizaron mediante FACS.

La figura 9 muestra un análisis cuantitativo de la formación de focos Rad51 inducidos por la inhibición de la PARP en células de tipo salvaje, pero no en células defectuosas en BRCA1 o BRCA2.

40 La figura 10 muestra un análisis de cometa neutro de BRCA2<sup>-/-</sup> VC8 y VC8-BAC complementado con BRCA2. El tratamiento con KU0058684 (1μM) durante 30 horas induce un incremento significativo en los DSBs de ADN, a juzgar por un aumento en momento de la cola en las células BRCA2<sup>-/-</sup>, mientras que ningún aumento significativo en el momento de la cola se observa en la línea complementada con BRCA2. Los datos promedio de 3 experimentos independientes se muestran +/- SEM, con 50 cometas anotadas para el momento de cola en cada experimento.

La figura 11 muestra un posible modelo para los efectos selectivos de la inhibición de la PARP en células mutantes BRCA1 y BRCA2.

Las figuras 12 y 13 muestran datos de fosfo-histona H3 FACS para células ES.

50 La figura 12 muestra datos de fosfo-histona H3 FACS para Brca1 de tipo salvaje (11CO: arriba) y células ES mutantes (Cre10:) y BRCA2 de tipo salvaje (D3) y células mutantes (Cre24) tratadas con KU0058684

durante 24h a 0 nM (izquierda), 10 nM (medio) o 1µM (derecha) y analizadas mediante FACS.

La figura 13 muestra fosfo-histona H3 FACS para VC8 y células VC8BAC tratadas con 0µM, 100 µM, 1 nM y 10 nM (de izquierda a derecha, respectivamente) de KU0058684 durante 24 horas.

5 Las figuras 14 y 15 muestran un análisis de los efectos de la inhibición de la PARP en otras células que carecen de función BRCA1 y BRCA2.

La figura 14 muestra curvas de supervivencia clonigénica de células deficientes en Brca2 (V-C8: ■) y complementadas (V-C8 BAC+: ▲) en continua exposición a los inhibidores de la PARP (KU0058684: parte superior, KU0058948: medio y KU0051529: parte inferior).

10 La figura 15 muestra las curvas de supervivencia clonigénica de células deficientes en BRCA2 (V-C8: ■) y complementadas (V-C8 BAC+: ▲) después de exposición durante 1 hora (arriba), 4 horas (medio) y 24 horas (parte inferior) a KU0058684. Las barras de error representan los errores estándar de la media.

La figura 16 muestra la formación de tumores en xenoinjertos ES y el efecto del tratamiento con KU0058684; línea de puntos - tipo salvaje con vehículo, línea gruesa sólida - de tipo salvaje con fármaco KU0058684, línea continua - deficiente en Brca2 con el portador, línea discontinua - deficiente en Brca2 con KU0058684.

15 La figura 17 muestra las curvas de supervivencia clonales de células de BRCA1 de tipo salvaje (MCF7-codificado) y BRCA1 silenciadas (MCF7-3.23) bajo la exposición continua a un rango de concentraciones de KU0058684 inhibidor de la PARP durante 12-14 días. El registro de la concentración del inhibidor se representa frente al registro de la fracción de sobrevivientes de las células. Las barras de error representan los errores estándar de la media.

20 La figura 18 muestra las curvas de supervivencia clonal de células de BRCA1 tipo salvaje (MCF7-codificado) y BRCA1 silenciadas (MCF7-3.23) bajo la exposición continua a un rango de concentraciones de KU0051529 inhibidor de la PARP durante 12-14 días. El registro de la concentración del inhibidor se representa frente a la fracción de registro de sobrevivientes de las células. Las barras de error representan los errores estándar de la media.

#### Ejemplos

#### Materiales y Procedimientos

#### 25 *Interferencia de ARN*

**[0104]** Se generaron construcciones de genes específicos pSUPER (T.R. Brummelkamp et al Science 296, 550-3 (2002)) que expresan las siguientes secuencias de ARNi diana: (i) ratón PARP1 5'-GCGGAGUACGCCAAGUCCA-3 '(ii) de control codificado 5'- CAUGCCUGAUCCGCUAGUC-3'.

30 **[0105]** Un fragmento de 1,6 kb que contiene el promotor *CMV IE* y eCFP (proteína fluorescente de cian mejorada) se subclonó a partir pECFP-Mito (Invitrogen) en el sitio *SapI* de las construcciones pSUPER resultantes, generando pSUPER-eCFP-PARP1 y pSUPER-eCFP-control. Células ES D3 fueron transfectadas con estos plásmidos utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, lisados celulares totales fueron generados utilizando un tampón compuesto por 20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) de glicerol e inhibidores de la proteasa. 30 µg de cada  
35 lisado se sometió a electroforesis en geles prefabricados de acrilamida al acetato Bis-Tris (Novex) y transferidos en nitrocelulosa Trans-Blot (BioRad). Las transferencias se sondaron con anticuerpo anti-PARP-1 policlonal de conejo (Cell Signalling, Cat No. 9542) o antisuero anti-GFP/CFP de conejo (Invitrogen, cat. N ° R970-01), seguido de una hibridación secundaria con IgG-HRP de anti-conejo con la posterior detección de quimioluminiscencia utilizando ECL™ (Amersham, Reino Unido).

#### 40 *Inhibidores de moléculas pequeñas de PARP:*

**[0106]** Los inhibidores PARP fueron sintetizados tal como se describe en el documento WO 02/36576. Los inhibidores químicos se disolvieron en DMSO a 10 mM y se almacenaron a -20°C en oscuridad.

#### *Líneas Celulares*

45 **[0107]** Células VC8 y derivados complementados Brca2 BAC de ratón fueron como se describe en M. Kraakman-van der Zwet et al., Mol Cell Biol 22, 669-79 (2002)). Células ES en función Brac2 se han descrito anteriormente (Tutt et al. (2002) EMBO Rep 3, 255-60). La construcción de células ES defectuosas en Brca1 se describirán en otro lugar, pero han sido previamente validadas (Foray et al. (2003) Embo J 22 2860-71). Células HBL100 fueron transfectadas con un plásmido ARNi pSUPER BRCA1 y seleccionadas con geneticina durante 3  
50 semanas. Los clones fueron seleccionados sobre la base de su expresión de BRCA1, según análisis mediante Northern blot.

*Ensayos clonogénicos*

5 **[0108]** Para la medición de la sensibilidad a la interferencia génica de ARN *Parp1*, las células ES mantenidas en placas de cultivo de tejidos recubiertas con 0,1% de gelatina fueron transfectadas como anteriormente, con pSUPER-eCFP-Parp1 o pSUPER-eCFP-control junto con un vector de expresión de la resistencia al antibiótico, blasticidina, (PEF-BSD, Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 6 pocillos. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se inició el tratamiento con blasticidina y las células volvieron a alimentarse cada tres días. Después de 10-14 días, las células fueron lavadas con PBS, se fijaron en metanol y se tiñeron con cristal violeta. Las colonias que contenían más de aproximadamente 50 células fueron contadas.

10 **[0109]** Para la medición de la sensibilidad a los inhibidores químicos, cultivos de células en crecimiento exponencial se tripsinizaron y se sembraron con densidades diferentes en placas de 6 pocillos en fibroblastos de ratón embrionario inactivados con mitomicina C y en su caso, tratados con inhibidores después de 18h. Para la exposición continua, las células fueron realimentadas cada 4 días con un nuevo medio e inhibidor. Para las exposiciones de tiempo, el inhibidor fue agregado durante el periodo especificado, entonces las células se lavaron y fueron realimentadas con un nuevo medio. Después de 10-14 días, las células fueron lavadas con PBS, se fijaron en metanol y se tiñeron con violeta cristal. Las colonias que contenían más de aproximadamente 50 células fueron contadas. Los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

*Análisis FACS*

20 **[0110]** Para la medición del contenido de ADN, las células fueron fijadas en etanol al 70%, se incubaron con ARNasa A y yoduro de propidio (PI) y se analizaron con un FACSCalibur (Becton Dickinson). Para análisis de fosfo-histona H3, las células fueron fijadas en etanol al 70%, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,25%, incubadas con anticuerpos anti-fosfo-histona H3 (Upstate Biotechnology) durante 3 horas, y luego con IgG anti-FITC de conejo 0,25% (Serotec) durante 30 minutos. El procesamiento para el análisis FACS fue como anteriormente.

*Análisis apoptótico*

25 **[0111]** Las células se tripsinizaron, conservando sobrenadante del cultivo y medio de lavado. Estos se agruparon y las células se lavaron en PBS-A frío antes de la resuspensión en  $1 \times 10^6$  células/ml en tampón de unión (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7,4)). 100 $\mu$ l de suspensión se incubó en la oscuridad con 5 $\mu$ l de Anexina V-FITC (BD Biosciences)/0,1 $\mu$ g de yoduro de propidio durante 15 minutos a temperatura ambiente, 400 $\mu$ l de tampón de unión fue añadido y se analizó inmediatamente en un FACS Calibur (BD Biosciences).

30 *Formación de focos Rad 51*

**[0112]** Células ES se cultivaron durante 48 horas en diferentes concentraciones de inhibidor de la PARP fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS y permeabilizadas con Triton X100 al 0,2% en PBS. Las células se tiñeron con una dilución 1:100 de anticuerpo policlonal anti-Rad51 de conejo (Ab 551922, BD-Pharmingen, Oxford, Reino Unido). Después del lavado, el anticuerpo primario se visualizó con IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor-555 (Alexa) y los núcleos con yoduro A-PRO-3 (Molecular Probes). Los focos Rad51 se visualizaron y fueron cuantificados usando un microscopio confocal Leica TCS-SP2.

*Ensayo de cometa*

40 **[0113]** Células VC8 y VC8-BAC se sembraron 24 horas antes del tratamiento con 1  $\mu$ M de KU0058684 durante 30 horas. Todos los trabajos se llevaron a cabo en la oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS y se rasparon antes del análisis de cometa tal como se describe (Lemay y Wood, 1999). Las células suspendidas en agarosa LMP (0,5% en PBS) se distribuyeron en portaobjetos de cometa (Trevigen, Gaithersburg) y se colocaron a 4°C hasta que cuajaron, antes de la lisis durante 45 minutos en 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, 1% de sodio lauril sarcosinato, 0,01% de Triton X-100. Las láminas fueron transferidas a TBE durante 5 minutos antes de la electroforesis a 18V durante 15 minutos. Las láminas fueron fijadas entonces en etanol al 100% durante 5 minutos y secaron al aire antes de la adición de tinte verde SYBR y la visualización por epifluorescencia usando filtros fluorescentes (Nikon). Los cometas fueron analizados utilizando el módulo de software Comet del paquete de gestión de imágenes Lucia G suministrado por Nikon. 50 cometas por punto de datos se analizaron para cada uno de tres experimentos independientes y se calculó el momento de la cola media.

*Análisis de cromosomas mitóticos*

50 **[0114]** Células ES fueron sembradas en gelatina, tratadas durante 24 horas con inhibidores químicos, seguido por tratamiento colcémido durante 1 hora. Las células fueron cosechadas, fijadas, colocadas sobre láminas, secadas y teñidas con DAPI antes de análisis de los cromosomas bajo un microscopio.

*Xenoinjertos de células ES y tratamiento con KU0058684*

**[0115]** Células ES derivadas de tumores (teratomas) fueron producidas mediante inyección subcutánea de 2

x 10<sup>8</sup> células ES en ratones desnudos (nu/nu) atímicos BALB/c de 6-8 semanas. Veinte ratones fueron inyectados con células ES deficientes en Brca2 y una cohorte idéntica con células isogénicas de tipo salvaje. Dos días después de la inyección de células, se inició el tratamiento con KU0058684 o portador. Durante tres días consecutivos, se les administraron dos dosis intraperitoneales de KU0058684 (o portador), con seis horas de diferencia, a cada uno en una dosis de 15 mg/kg de animal. Este tratamiento se detuvo durante cinco días y luego se reinició (como antes) durante otros tres días consecutivos. El crecimiento de los tumores fue monitorizado desde un volumen mínimo de 0,3 cm<sup>3</sup>. Los datos en la figura 16 representan dos experimentos separados que involucran un total de 40 animales.

*Producción líneas celulares deficientes en BRCA1*

**[0116]** Líneas celulares MCF7 y MCF7-3.23 mezcladas fueron generadas por transfección estable de células de adenocarcinoma mamario MCF7 con construcciones de genes específicos pSUPER. Las construcciones de genes específicos pSUPER se generaron expresando las siguientes secuencias de ARNi diana: (i) BRCA1 5'-GGAACCTGTCTCCACAAAG-3' humano (ii) 5'-CATGCCTGATCCGCTAGTC-3' de control mezclado. Un fragmento de 1.8kb que contiene el promotor EF1A humano y el gen de resistencia a la blasticidina (bsd) se subclonó a partir de pEFBsd (Invitrogen) en el sitio SapI de las construcciones pSUPER resultantes, generando pSUPER-BSD-BRCA1 y pSUPER-BSD mezclados. Las células MCF7 fueron transfectadas con estos plásmidos usando FuGene6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la selección en blasticidina, los clones resistentes fueron evaluados mediante PCR en tiempo real para el silenciamiento de ARNm BRCA1 (Egawa et al Oncology 2001; 61 (4): 293-8; Egawa et al Int J Cancer 20 de julio de 2001; 95 (4):255-9). Se cultivaron clones con niveles reducidos de ARNm BRCA1 (bajo la selección de blasticidina) en 8 pasos y repitió la prueba en tiempo real. La línea celular MCF7-3.23 mostró que sólo el 30% de expresión de BRCA1 en comparación con clones MCF7 posee la construcción pSUPER-Bsd-mezclada.

Resultados

*Reducción de los niveles de proteína Parp1 mediante siRNA*

**[0117]** Un plásmido (pSUPER-eCFP-Parp1) que expresa un siRNA específico de Parp1 bajo el control del promotor H1 (T.R. Brummelkamp et al, Science 296, 550-3 (2002)) and la proteína fluorescente de ciano mejorada (eCFP) bajo el control del promotor CMV IE fue transfectada en células madre de embriones de ratón D3. Como control, un plásmido que expresa un siRNA mezclado no relacionado, pSUPER-eCFP-control fue transfectado por separado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se prepararon y analizaron lisados celulares mediante western blot. Los traslados se sondaron con un anticuerpo policlonal anti-PARP-1 o un antisuero anti-GFP/CFP.

**[0118]** Los niveles de PARP1 en las células de expresión siRNA específicas de PARP1 se observaron que eran mucho más bajos que los niveles de PARP1 en las células de control. Los niveles de eCFP fueron similares en las células de expresión siRNA de PARP1 y de control.

*Reducción de la viabilidad de células deficientes en BRCA1 y BRCA2 después de interferencia génica siRNA específica para Parp1.*

**[0119]** Células madre embrionarias (ES) de ratón, el Brca1<sup>-/-</sup> y Brca2<sup>-/-</sup> de tipo salvaje fueron transfectadas con pSUPER-eCFP-Parp1 o pSUPER-eCFP-control junto con un plásmido pEF-Bsd que codifica la resistencia a la blasticidina en una relación de 10:1. Clones de resistencia a la blasticidina fueron seleccionados y cuantificados. Los resultados se muestran en la figura 1 representados como el número de colonias después de la transfección de pSUPER-eCFP-Parp1 en relación con el número después de la transfección de pSUPER-eCFP-control. Las barras de error son iguales a una desviación estándar alrededor de la media.

**[0120]** Después de la corrección de la eficacia de transfección mediante el siRNA de control, era evidente que la supervivencia de las células ES deficientes en Brca1 y Brca2 se redujo considerablemente cuando se inhibió la expresión de Parp1.

*Reducción en la viabilidad de células deficientes en BRCA1 y BRCA2 después de inhibidores químicos de PARP*

**[0121]** Los inhibidores químicos de la actividad de la Parp se emplean para confirmar la inhibición selectiva de células deficientes en Brca1 y Brca2 que se han señalado anteriormente. Se utilizaron dos inhibidores de la PARP diferentes, KU0058684, KU0058948 y un compuesto KU0051529 débilmente activo pero relacionado químicamente (figura 2). Estos nuevos inhibidores de la PARP están basados alrededor de un núcleo de ftalazin-1-ona y son inhibidores competitivos respecto al sustrato de la PARP NAD<sup>+</sup>. KU0058684 y KU0058948 son inhibidores potentes y específicos de la actividad de la polimerasa poli (ADP-ribosa) de las proteínas PARP-1 y PARP-2 y no inhiben el valor de la PARP, tanquirasa o PARP-3 en concentraciones de hasta 1 µM. Por el contrario, KU0051529 es ~ 250x menos eficaz en la inhibición de estas enzimas a pesar de estar químicamente relacionado.

**[0122]** KU0058684, KU0058948 y KU0051529 fueron usados para investigar la sensibilidad de las células deficientes en Brca1 o Brca2 en la inhibición de la actividad de la PARP. Los ensayos clonogénicos mostraron que ambas líneas celulares deficientes en BRCA1 y BRCA2 eran extremadamente sensibles a KU0058684 y KU0058948 en comparación con las células isogénicas de otro modo (figuras 3, 4). La SF50 (dosis en la que sobrevivieron el 50% de

las células) para KU0058684 fue de  $3,5 \times 10^{-8}$  M para Brca1 y  $1,5 \times 10^{-8}$  M de Brca2; para células de tipo salvaje fue de aproximadamente  $3,5 \times 10^{-8}$  M. Esto representa factores de mayor sensibilidad 57 veces y 133 veces para células mutantes de Brca1 y Brca2, respectivamente, en comparación con el tipo salvaje. Se obtuvieron resultados similares con células de ovario de hámster chino deficientes en Brca2, que mostraron una sensibilidad mejorada mayor de 1000 veces en comparación con un derivado complementado con Brca2 (figuras 14 y 15). La sensibilidad de las células mutantes de Brca1 y Brca2 a KU0058948 fue aún mayor que la de KU0058684. Por el contrario, KU0051529 no tuvo ningún efecto selectivo sobre las células que carecen de Brca1 o Brca2 de tipo salvaje en comparación con las células de tipo salvaje. Esto, junto con los datos de siRNA, demuestra que el mecanismo de sensibilidad es específicamente a través de la inhibición de la PARP. Cabe destacar que ninguno de los inhibidores selectivos ha tenido ningún efecto sobre las células heterocigotos para mutación *Brca1* o *Brca2*.

*Dependencia del transcurso del tiempo de los efectos sobre KU0058684 en la supervivencia clonigénica de células deficientes en Brca1 y Brca2*

**[0123]** Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de KU0058684 durante determinados periodos de tiempo. El inhibidor fue eliminado y los efectos fueron medidos utilizando un ensayo de clonación. Los efectos inhibitorios de KU0058684 en el crecimiento clonal fueron evidentes después de un tiempo de exposición relativamente corto, 4 h, y podían considerarse completos mediante exposición de 24h (figuras 5 y 6). Los efectos de la inhibición de la PARP resultaron ser irreversibles como una corta exposición seguida de 10-14 días en ausencia del inhibidor que impide el crecimiento.

*Efecto de la inhibición de la PARP en la detención del ciclo celular*

**[0124]** Se utilizó un análisis FACS para determinar si la inhibición de la PARP resultó en la detención del ciclo celular. Las células fueron expuestas con KU0058684 durante varios periodos, después se etiquetaron con BrdU y la proporción de células en cada fase del ciclo celular. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8. KU0058684 se observó para provocar un paro profundo de las células con un contenido de ADN tetraploide que indica la detención en G<sub>2</sub> o fase M del ciclo celular. Para caracterizar esta detención, las células fueron analizadas para el contenido de ADN y para histona H3 fosforilada, un marcador de fase M. Para caracterizar también esta detención, las células fueron analizadas para el contenido de ADN y para histona H3 fosforilada, un marcador de fase M (figuras 12 y 13). La mayoría de las células detenidas no tenían la etiqueta con anticuerpos anti-fosfo histona H3 indicando que la mayoría de las células fueron detenidas en G<sub>2</sub>.

*Formación de focos Rad51*

**[0125]** Un sello distintivo de reparación de roturas de doble cadena de Brca es la formación de focos en el núcleo que contiene Rad51. Se investigó la capacidad de KU0058684 para obtener focos Rad51 de tipo salvaje y en células deficientes en Brca1 y Brca2.

**[0126]** Las células ES de tipo salvaje defectuosas en Brca1 y Brca2 fueron expuestas a diferentes concentraciones de KU0058684 durante 48 horas. Las células fueron fijadas entonces y teñidas para focos RAD51 tal como se describe por Tarsounas (Tarsounas M et al Oncogene. 2003 22 (8) :1115-23).

**[0127]** En las células ES de tipo salvaje, KU0058684 causó la formación de focos Rad51 de una manera dependiente de la dosis (figura 9). Por el contrario, no fueron inducidos focos en células deficientes en Brca1 o Brca2. Este último hallazgo es consistente con observaciones previas, en las que los agentes que dañan el ADN no pueden causar la formación de focos Rad51 en células deficientes en Brca1 o Brca2.

**[0128]** KU0058684, por lo tanto, mostró que induce lesiones, tales como roturas en el ADN de doble cadena o lesiones que degeneran en roturas en el ADN de doble cadena, que son reparadas por un complejo que implica Rad51 y que requiere de Brca1 y Brca2. Es importante destacar que KU0051529 no indujo la formación de focos Rad51 en dosis comparables, haciendo hincapié en la especificidad del mecanismo de sensibilización.

*Ensayos de cometa*

**[0129]** Para determinar si la inhibición de la actividad de la PARP conduce a la producción de roturas de ADN de doble cadena, se realizaron ensayos de cometa neutrales en células mutantes Brca2 y sus homólogos isogénicos. Los resultados se muestran en la figura 10. Después de una exposición de 30 horas a KU0058684 1µM, hubo un aumento de 4,7 veces en el momento de la cola de las células VC8 deficientes en Brca2 y ningún aumento significativo en el momento de la cola de la línea VC8-BAC complementada. Este resultado muestra que rompe las roturas de ADN de doble cadena inducidas por la PARPi se dejan sin reparar en la línea deficiente en Brca2.

*Análisis de los cromosomas mitóticos*

**[0130]** El examen de cromosomas mitóticos de células deficientes en Brca1 y Brca2 reveló que el tratamiento con KU0058684 dio lugar a frecuentes aberraciones importantes. Estas incluían roturas cromátidas y cromosomas tri-radiales y quadri-radiales. Estos fenotipos proporcionan una indicación de la falta de reparación de las roturas de doble cadena por la conversión génica de cromátidas hermanas y el elevado uso de vías alternativas propensas a errores.



**Xenoinjertos de células ES y tratamiento con KU0058684**

**[0131]** Tumores derivados de células ES (teratomas) isogénicas y deficientes en Brca2 fueron producidos en ratones desnudos (nu/nu) BALB/c tal como se describió anteriormente.

5 **[0132]** El efecto de KU0058684 en el crecimiento de tumores de xenoinjertos de tipo salvaje y deficientes en Brca2 se midió y los resultados son los mostrados en la figura 16.

**[0133]** KU0058684 se observó que redujo drásticamente el crecimiento de tumores deficientes en Brca2 en relación con los tumores de tipo salvaje.

*Efecto de la inhibición de la PARP en líneas deficientes en células BRCA1*

10 **[0134]** Líneas celulares *MCF7-mezcladas* y MCF7-3.23 se produjeron tal como se describe anteriormente. MCF7-3.23 se encontró que tenía un 30% de expresión de BRCA1 en comparación con *MCF7-mezcladas*.

**[0135]** Células *MCF7-mezcladas* y MCF7-3.23 fueron tratadas con KU0058684 y KU0051529 y se determinó la supervivencia de las células (figuras 17 y 18). KU0058684 es un potente inhibidor de la PARP, mientras que KU0051529 es menos eficaz.

15 **[0136]** Ni *MCF7-mezcladas* ni las células MCF7 3.23-se muestra muy sensible a KU0051529 (figura 18). Sin embargo, ambas líneas celulares fueron sensibles a KU0058684.

**[0137]** Células MCF7-3.23 resultaron ser significativamente más sensibles a KU0058684 que las células *MCF7-mezcladas*.

*Interacción de la PARP con la vía de DSB de ADN dependiente de HR*

20 **[0138]** Sin limitar el alcance de la invención de ninguna manera, un posible modelo para la interacción entre PARP y la vía de DSB de ADN dependiente de HR se muestra en la figura 11.

**[0139]** Las roturas de ADN de cadena simple (SSB) se forman debido al daño oxidativo y su reparación. La inhibición de la actividad de la polimerasa PARP-1 impide la unión de la proteína XRCC1 y el hueco de las SSB posterior es llenado por polimerasa de ADN (figura 11A).

25 **[0140]** Un gran número de SSBs persisten y son encontrados mediante horquillas de replicación de ADN. La ausencia de una cadena de la plantilla en el SSB conduce a un DSB y puede provocar, dependiendo de la posición, el colapso de la horquilla de replicación (figura 11B).

30 **[0141]** La proximidad de una plantilla de cromátida hermana no dañada permite la invasión de la cromátida hermana mediante filamento de ADN de cadena simple recubierto con RAD51 y el inicio de la reparación de recombinación de cromátidas hermanas. Este proceso depende de BRCA1 y BRCA2 y está asociado con la formación de múltiples focos nucleares de RAD51. Las horquillas de replicación colapsadas se pueden reiniciar mediante un mecanismo similar (figura 11C).

**[0142]** Cuando se resuelven las uniones Holliday en los intermedios de recombinación, puede producirse un intercambio de cromátidas hermanas (SCE). El exceso de SSBs encontrados mediante las horquillas de replicación durante la inhibición de la PARP-1 conduce a un aumento en SCEs (figura 11D).

35 **[0143]** En ausencia de BRCA1 o BRCA2 funcional, la formación de focos RAD51 y la recombinación de cromátidas hermanas están muy deteriorados. El exceso de SSBs sin reparar forman DSBs de ADN durante la replicación del ADN, pero la recombinación de cromátidas hermanas no se produce. Permanecen sin reparar como roturas de cromátidas o se reparan mediante mecanismos independientes RAD51 propensos a errores, causando reordenamientos cromosómicos complejos. Estas celdas son detenidas cuando se encuentran con el punto de control de daños del ADN G2/M y se detienen de manera permanente o apoptosis (figura 11E).

40

**[0144]** Los datos de RNAi aquí proporcionados, junto con la observación de que KU0051529 fue ineficaz, demuestran que la inhibición de la PARP es responsable de los efectos de sensibilización observados.

45 **[0145]** La inhibición de la PARP induce lesiones que normalmente son reparadas por intercambio de cromátidas hermanas (SCE) (Wang ZQ, et al (1997) Genes Dev. vol. 11 (18) :2347-58 y "From DNA damage and stress signalling to cell death" G. de Murcia y S. Shall eds. Oxford University Press (2000)). La inhibición de la PARP se sabe que aumenta el SCE, sin un aumento concomitante en la conversión de genes de DSBs y, por lo tanto, no hay aumento global de la vía de recombinación dependiente de Rad51 (Schultz N et al 2003, Nucleic Acids Research, vol.31 (17): 4959-4964).

50 **[0146]** El enfoque de letalidad sintética descrito en este documento puede ser útil en el tratamiento de a) en tumores en portadores de BRCA, b) en tumores donde otros componentes de reparación por DSB de ADN dependiente de HR son defectuosos.

**[0147]** A pesar de que han sido descritas diferencias en la edad de inicio y la patología de los tumores en portadores de mutaciones BRCA, el tratamiento es el mismo que en la actualidad como para los pacientes con enfermedad esporádica. La presente invención proporciona un nuevo enfoque para estos tumores que se describe en este documento.

- 5 **[0148]** Es significativo que no se observó ningún efecto de heterocigotos. Esto es importante para el uso terapéutico de los procedimientos descritos en los portadores heterocigotos de mutaciones en la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR, incluyendo, por ejemplo, mutaciones BRCA1/2.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0149]**

- <110> KuDOS Pharmaceuticals Limited  
 Instituto de Investigación del Cáncer

5      Ashworth, Alan  
 Jackson, Stephen  
 Martin, Niall  
 Smith, Graeme
- 10     <120> Inhibidores de la reparación de daños en ADN para el Tratamiento del Cáncer

<130> NRSCP6262513
- <140> PCT/GB2004/005025

15     <141> 30/11/2004
- <150> US 60/526, 244  
 <151> 12/01/2003  
 <150> GB 0327844.7

20     <151> 01/12/2003
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.1

25     <210> 1  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial
- 30     <220>  
 <223> secuencia diana RNAi
- <400> 1

35     gcggaguacg ccaagucca 19
- <210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia diana RNAi

<400> 2

caugccugau ccgcuaguc 19

10

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia diana RNAi

<400> 3

20

19 ggaacctgtc tccacaaag

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diana RNAi

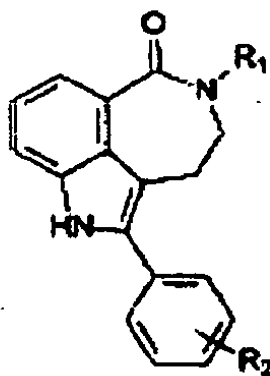
30

<400> 4

catgctgat ccgctagtc 19

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de un inhibidor de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer de deficiente en vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en un individuo,
- 5 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo que consiste en:
- nicotinamidas,
  - benzamidas que no sean 3-aminobenzamida,
  - isoquinolinonas,
  - dihidroisoquinolinonas,
- 10 benzimidazoles, diferentes de indoles benzimidazol-carboxamidas, que no sea un indol lactámico tricíclico que tiene la estructura;



- en donde  $R_1$  es H y  $R_2$  es 4'-H, 4'-Cl, 4'-F, 4'-CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o 3'CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,
- ftalazinonas,
- 15 quinazolinonas, diferentes de quinazolin-4-[3H]-ona isoindolinonas,
- fenantridinas,
- fenantridinonas, diferentes de 6 (5H) fenantridinona, benzopironas,
- derivados del ácido hidroxímico insaturado,
- piradizinas,
- 20 cafeína, teofilina y timidina.
2. Utilización de un inhibidores de la poli (ADP -ribosa) polimerasa (PARP) en la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer de deficiente en vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en un individuo, en la que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo que consiste en:
- nicotinamidas;
- 25 benzamidas seleccionadas entre el grupo que consiste en 3-hidroxibenzamida, 3-nitrosobenzamida, 3-metoxibenzamida y 3-cloroprocainamida, 4-aminobenzamida, y 1, 5-di [(3-carbamoilfenil) aminocarboniloxi] pentano;
- isoquinolinonas;
  - dihidroisoquinolinonas;
- 30 bencimidazoles e indoles seleccionados entre el grupo que consiste en benzoxazol-4-carboxamidas, 2-cicloalquilbenzimidazol-4-carboxamidas, quinoxalinecarboxamidas, imidazopiridinacarboxamidas, 2-fenilindoles, 2-benzoxazoles sustituidos, 2-fenil bencimidazol, 2-(3-metoxifenil) bencimidazol, 1, 3, 4, 5 tetrahidro-azepino [5, 4, 3-cd] indol-6-ona, 3-dihidro diazapinoindolinonas sustituidas, tetrahidro diazapinoindolinona, 5,6,-dihidroimidazo [4, 5, 1-j, k] [1, 4] benzodiazopin-7(4H)-ona, 2-fenil-5 ,6-dihidro-imidazo [4,5,1-jk] [1,4] benzodiazepin-7(4H)-ona y 2, 3, dihidro-isoindol-1-ona;

- fthalazinonas;
- quinazolinonas seleccionadas entre el grupo que consiste en 4-hidroxiquinazolina,
- isoindolinonas;
- fenantridinas;
- 5 fenanthridinonas seleccionadas entre el grupo que consiste en 5 [H] fenanthridin-6-onas sustituidas, tieno [2, 3-c] isoquinolonas, N-(6-oxo-5, 6 dihidrofenanthridin-2-il)-2-(N, N-dimetilamino) acetamida y 4, 9-dihydrocyclopenta sustituido [1mn] fenantridina-5-onas;
- benzopironas;
- derivados de ácido hidroxímico insaturados;
- 10 piridazinas;
- cafeína, teofilina y timidina.
3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho cáncer comprende una o más células cancerosas que tienen una capacidad reducida o abrogada para reparar el DSB de ADN mediante HR en relación con las células normales.
- 15 4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el procedimiento comprende la etapa de identificar una condición de cáncer en un individuo como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
5. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho cáncer se identifica como un cáncer deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la determinación de actividad de reparación por DSB de ADN dependiente de HR de las células cancerosas del individuo en relación con las células normales.
- 20 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que se determina la actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en las células cancerosas mediante la medición de la formación de focos que contienen Rad51 en el núcleo en respuesta a agentes de daños de ADN o inhibidores de la PARP.
- 25 7. Utilización según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que dicho cáncer es identificado como un cáncer deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la determinación de la actividad de uno o más componentes de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en células cancerosas del individuo respecto a las células normales.
8. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho cáncer se identifica como un cáncer deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR determinando la presencia en células cancerosas del individuo de una o más mutaciones o polimorfismos en una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente de la vía de reparación por
- 30 DSB de ADN dependiente de HR.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que dicha una o más mutaciones o polimorfismos reducen o suprimen la función del componentes de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
10. Utilización según la reivindicación 8, en la que dicha una o más mutaciones o polimorfismos reducen o suprimen la expresión del componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 35 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dichas células cancerosas tienen un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2.
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dichas células cancerosas son deficientes en BRCA1 o BRCA2.
13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dichas células cancerosas son homocigotos para una mutación en BRCA1 o BRCA2.
- 40 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho individuo es heterocigoto para una mutación en un gen que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que dicho individuo es heterocigoto para una mutación en BRCA1 y/o BRCA2.
- 45 16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho cáncer es cáncer de mama, ovario, páncreas o próstata.
17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho inhibidor de la PARP es una ftalazin-1(2H)-ona o un análogo o derivado de la misma.

18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que dicho medicamento también comprende un agente de quimioterapia que daña el ADN.

19. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que dicho tratamiento también comprende la administración de un agente de quimioterapia que daña el ADN.

5 20. Inhibidor de la PARP para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer deficiente en vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en un individuo, en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo que consiste en:

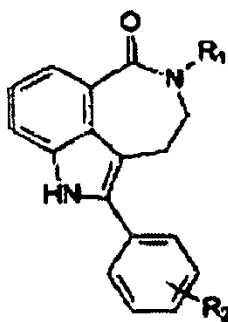
nicotinamidas,

benzamidas que no sean 3-aminobenzamida,

10 isoquinolinonas,

dihidroisoquinolinonas,

benzimidazoles, que no son indoles benzimidazol-carboxamidas, que no son un indol lactámico tricíclico que tiene la estructura,



15 en la que R<sub>1</sub> es H y R<sub>2</sub> es 4'-H, 4'-Cl-, 4'-F-, 4'-CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o 3'CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

ftalazinonas,

quinazolinonas, que no sean quinazolin-4-[3H]-onas isoindolinonas,

fenantridinas,

fenantridinonas, diferentes de 6(5H) fenantridinona, benzopironas,

20 derivados de ácido hidroxímico insaturados,

piradizinas,

cafeína, teofilina y timidina.

21. Inhibidor de la PARP para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer de deficiente en vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en un individuo,

25 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona del grupo que consiste en:

nicotinamidas;

benzamidas seleccionadas entre el grupo que consiste en 3-hidroxibenzamida, 3-nitrosobenzamida, 3-metoxibenzamida y 3-cloroprocainamida, 4-aminobenzamida, y 1, 5-di [(3-carbamoilfenil) aminocarboniloxi] pentano;

isoquinolinonas;

30 dihidroisoquinolinonas;

bencimidazoles e indoles seleccionados entre el grupo que consiste en benzoxazol-4-carboxamidas, 2-cicloalquilbenzimidazol-4-carboxamidas, quinoxalinecarboxamidas, imidazopiridinacarboxamidas, 2-fenilindoles, 2-benzoxazoles sustituidos, 2-fenil bencimidazol, 2-(3-metoxifenil) bencimidazol, 1, 3, 4, 5 tetrahidro-azepino [5, 4, 3-cd] indol-6-ona, 3-dihidro-diazapinoindolinonas sustituidas, tetrahidro-diazapinoindolinona, 5,6,-dihidroimidazo [4, 5, 1-j, k] [1, 4] benzodiazopin-7(4H)-ona, 2-fenil-5 ,6-dihidro-imidazo [4,5,1-jk] [1,4] benzodiazepin-7(4H)-ona y 2, 3, dihidro-isoindol-

35

- 1-ona;
- fthalazinonas;
- quinazolinonas seleccionadas entre el grupo que consiste en 4-hidroxiquinazolina,
- isoindolinonas;
- 5 fenantridinas;
- fenanthridinonas seleccionadas entre el grupo que consiste en 5 [H] fenanthridin-6-onas sustituidas, tieno [2, 3-c] isoquinolonas, N-(6-oxo-5, 6 dihidrofenanthridin-2-il)-2-(N, N-dimetilamino) acetamida y 4, 9-dihydrocyclopenta sustituido [1mn] fenantridina-5-onas;
- benzopironas;
- 10 derivados de ácido hidroxímico insaturados;
- piridazinas;
- cafeína, teofilina y timidina.
- 15 **22.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 20 ó 21, en el que dicho cáncer comprende una o más células cancerosas que tienen una capacidad reducida o abrogada para reparar el DSB de ADN mediante HR en relación con las células normales
- 23.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que el tratamiento comprende la etapa de identificación de una condición de cáncer en un individuo como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 20 **24.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 23, en el que dicho cáncer se identifica como un cáncer deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la determinación de la actividad de reparación por DSB de ADN dependiente de HR de las células cancerosas del individuo en relación con las células normales.
- 25.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 24, en el que la actividad de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en las células cancerosas se determina mediante la medición de la formación de focos que contienen Rad51 en el núcleo en respuesta a los agentes que dañan el ADN o a los inhibidores de la PARP.
- 25 **26.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 23 ó 24, en el que dicho cáncer se identifica como un cáncer deficiente de reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante la determinación de la actividad de uno o más componentes de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR en células cancerosas del individuo en relación con las células normales.
- 30 **27.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 23, en el que dicho cáncer se identifica como un cáncer deficiente de reparación por DSB de ADN dependiente de HR determinando la presencia en células cancerosas del individuo de una o más mutaciones o polimorfismos en una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 28.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 27, en el que dicha una o más mutaciones o polimorfismos reducen o suprimen la función del componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 35 **29.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 28, en el que dicha una o más mutaciones o polimorfismos reducen o suprimen la expresión del componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 30.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 29, en el que dicho que dichas células cancerosas tienen un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2.
- 40 **31.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 30, en el que dichas células cancerosas son deficientes en BRCA1 o BRCA2.
- 32.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 31, en el que dichas células cancerosas son homocigotos para una mutación en BRCA1 o BRCA2.
- 33.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 32, en el que dicho individuo es heterocigoto para una mutación en un gen que codifica un componente de la vía de reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 45 **34.** Inhibidor de la PARP según la reivindicación 33, en el que dicho individuo es heterocigoto para una mutación en BRCA1 y/o BRCA2.
- 35.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 34, en el que dicho cáncer es cáncer de mama,



ovario, páncreas o próstata.

**36.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 35, en el que dicho inhibidor de la PARP es una ftalazin-1(2H)-ona.

5 **37.** Inhibidor de la PARP según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 36, en el que dicho tratamiento también comprende la administración de un agente quimioterapéutico que daña el ADN.

**38.** Procedimiento para evaluar un individuo que tiene una condición de cáncer, que comprende:

identificar una célula cancerosa obtenida del individuo como deficiente en la reparación por DSB de ADN dependiente de HR en relación con las células normales, y

proporcionar un inhibidor de la PARP adecuado para la administración a dicho individuo,

10 en el que el inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo que consiste en:

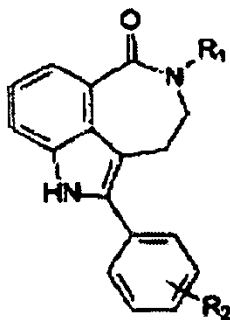
nicotinamidas,

benzamidas que no sean 3-aminobenzamida,

isoquinolinonas,

dihidroisoquinolinonas,

15 benzimidazoles, que no son indoles benzimidazol-carboxamidas, que no son un indol lactámico tricíclico que tiene la estructura,



20 en la que R<sub>1</sub> es H y R<sub>2</sub> es 4'-H, 4'-Cl-, 4'-F-, 4'-CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o 3'CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ftalazinonas,

quinazolinonas, que no sean quinazolin-4-[3H]-onas isoindolinonas,

fenantridinas,

fenantridinonas, diferentes de 6(5H) fenantridinona, benzopironas,

25 derivados de ácido hidroxímico insaturados,

piradizinas,

cafeína, teofilina y timidina.

**39.** Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la célula cancerosa se identifica como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR mediante,

30 poner en contacto un inhibidor de la PARP con una muestra de células cancerosas obtenidas del individuo que tiene la condición de cáncer, y,

determinar la cantidad de muerte celular en dicha muestra.

**40.** Procedimiento de predicción de la respuesta de una condición de cáncer en un individuo a un tratamiento dirigido a

un cáncer deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR que comprende,

poner en contacto un inhibidor de la PARP con una muestra de células cancerosas obtenidas del individuo que tiene la condición de cáncer y,

determinar la cantidad de muerte celular en dicha muestra.

- 5 **41.** Procedimiento según la reivindicación 40, en el que el inhibidor de la PARP es un fragmento de péptido de la PARP.
- 42.** Procedimiento según la reivindicación 40, en el que el inhibidor de la PARP es un ácido nucleico que codifica toda o parte de la secuencia de aminoácidos de la PARP, o el complemento del mismo.
- 10 **43.** Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicho inhibidor de la PARP se selecciona entre el grupo formado por nicotinamidas, benzamidas, isoquinolinonas, dihidroisoquinolinonas, benzimidazoles, indoles, ftalazinonas, quinazolinonas, isoindolinonas, fenantridinas, fenantridinonas, benzopironas, derivados de ácido hidroxímico insaturados, piridazinas, cafeína, teofilina y timidina.
- 44.** Procedimiento según la reivindicación 40, en el que dicho inhibidor de la PARP es una ftalazin-1(2H)-ona.
- 45.** Procedimiento según la reivindicación 40, que comprende la identificación del cáncer como deficiente en reparación por DSB de ADN dependiente de HR.
- 15 **46.** Procedimiento según la reivindicación 45, en el que el cáncer se identifica como teniendo un fenotipo deficiente en BRCA1 o BRCA2.

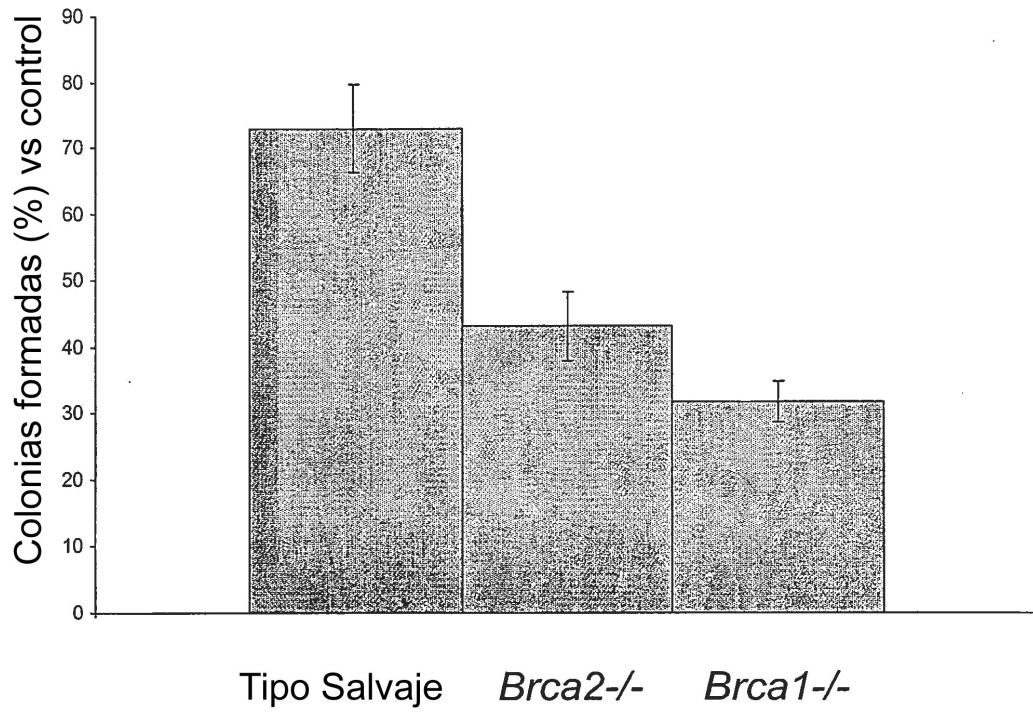
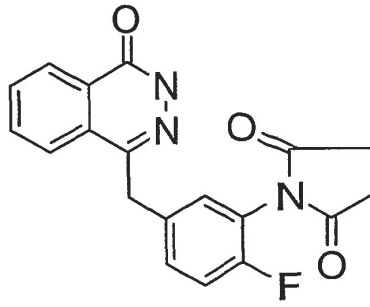
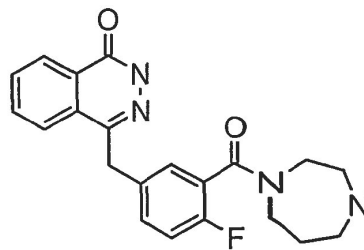


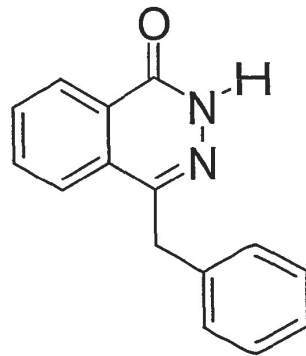
Figura 1



KU-0058684  
PARP-1 IC<sub>50</sub> = 3.2nM



KU-0058948  
PARP-1 IC<sub>50</sub> = 3.4nM



KU-0051529  
PARP-1 IC<sub>50</sub> = 3.4nM

Figura 2

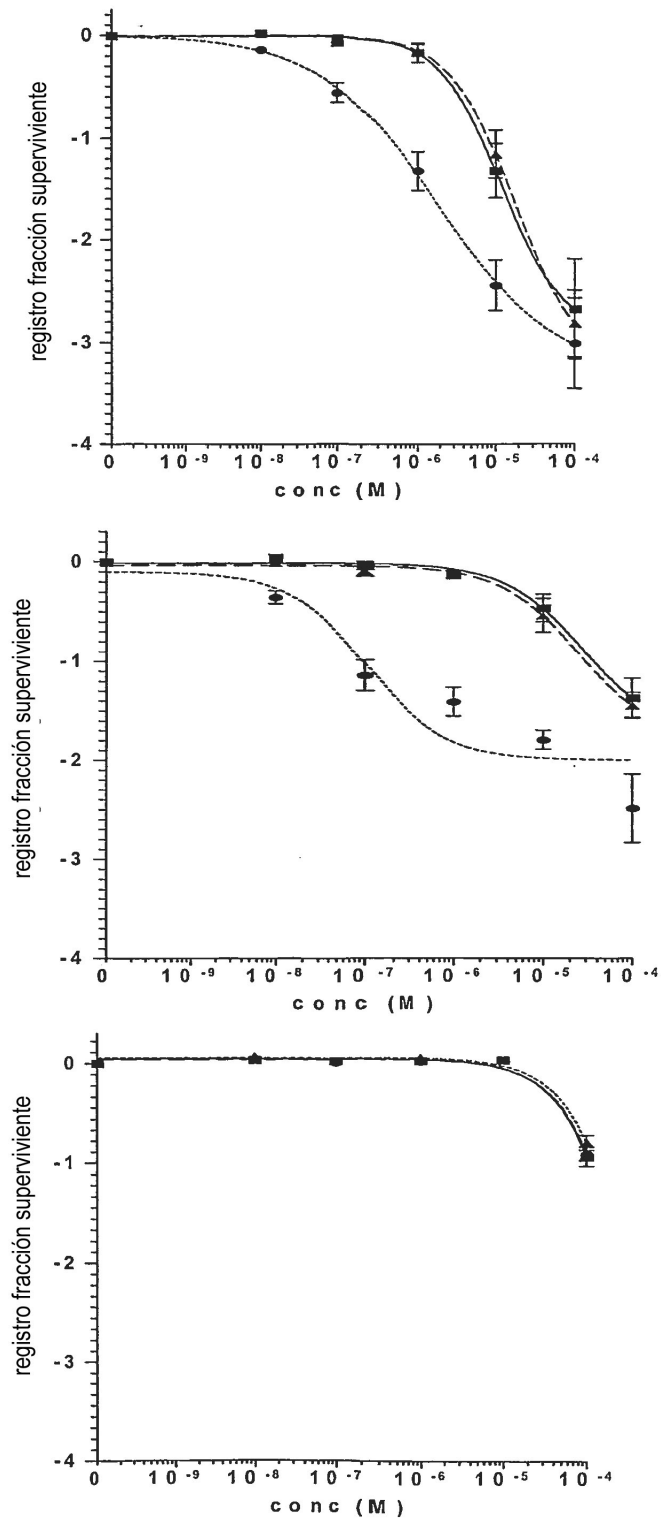


Figura 3

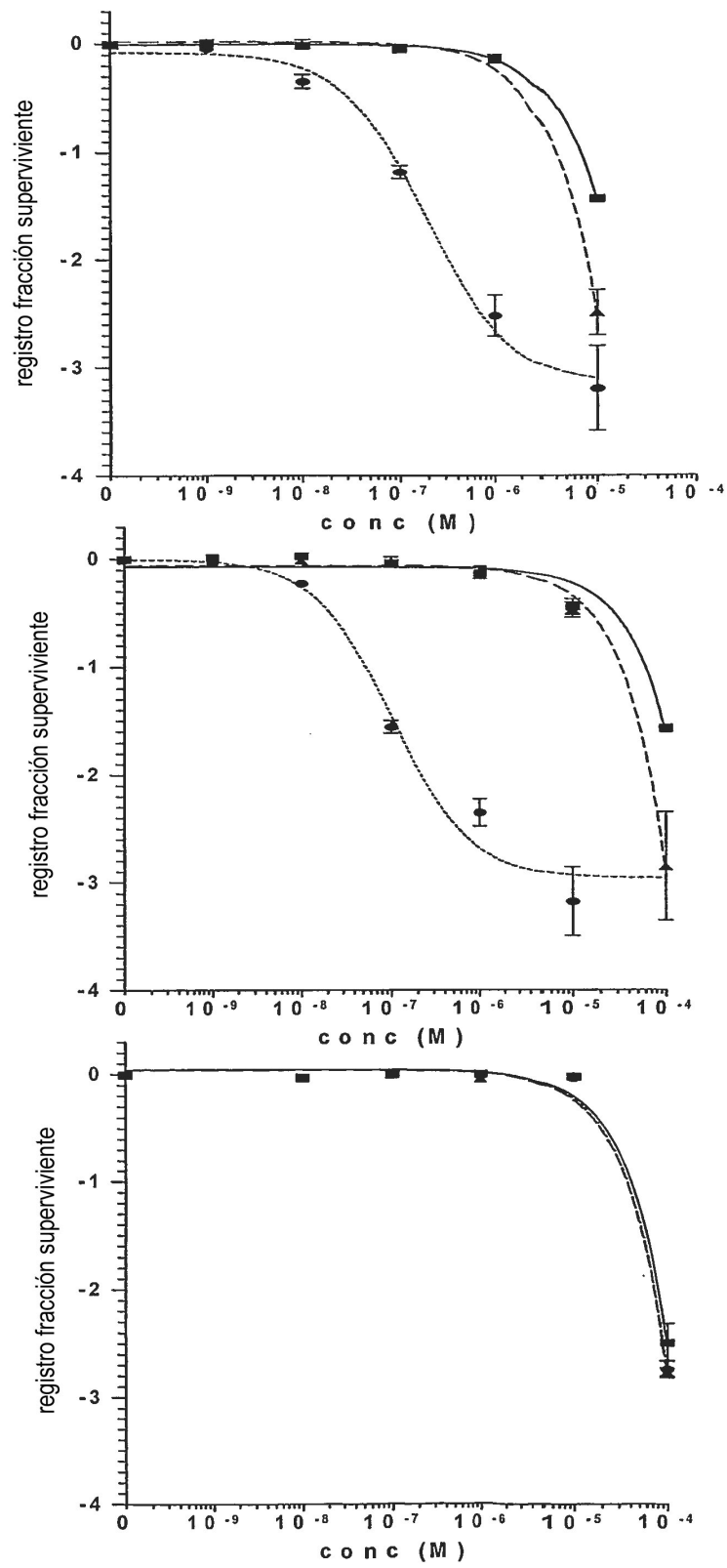


Figura 4

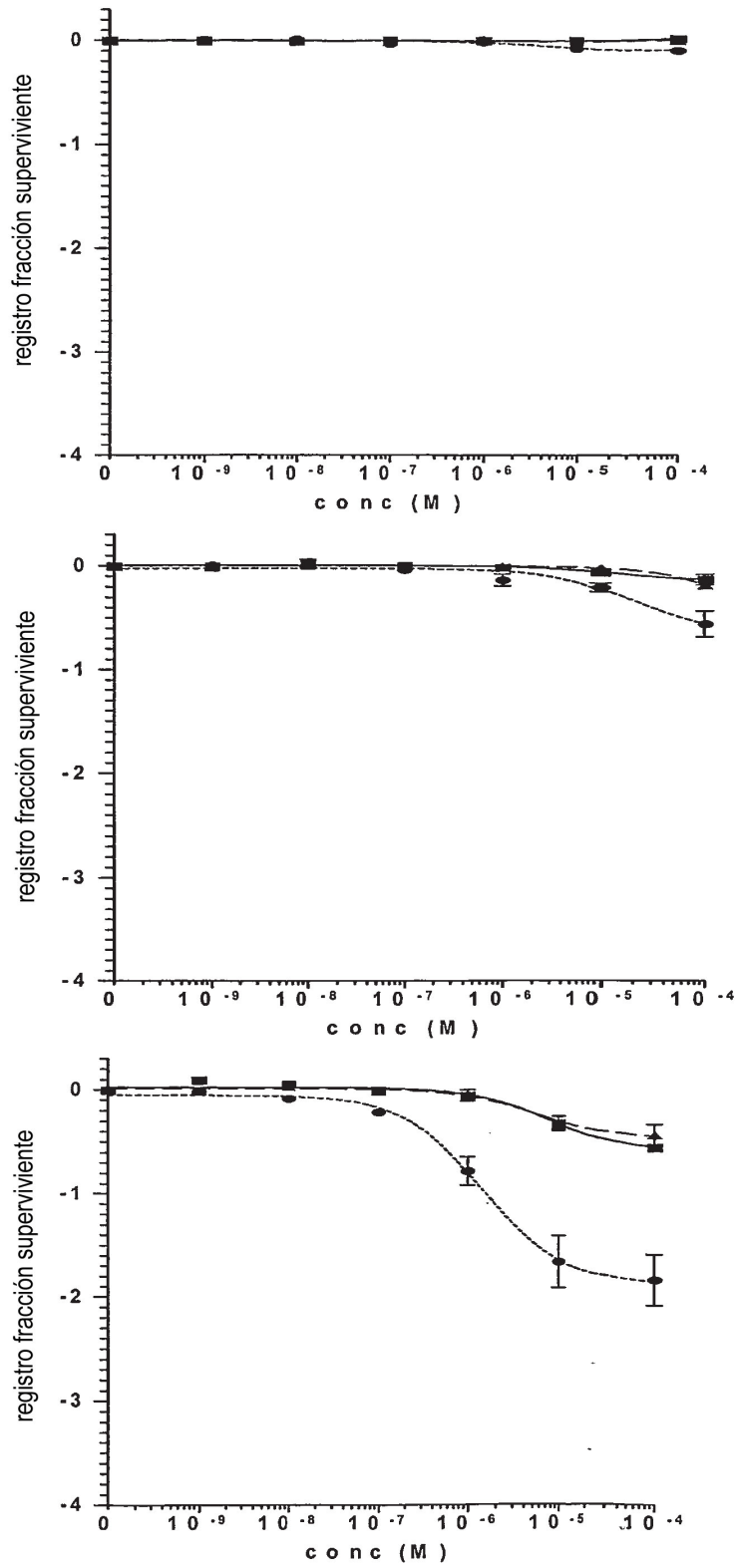


Figura 5

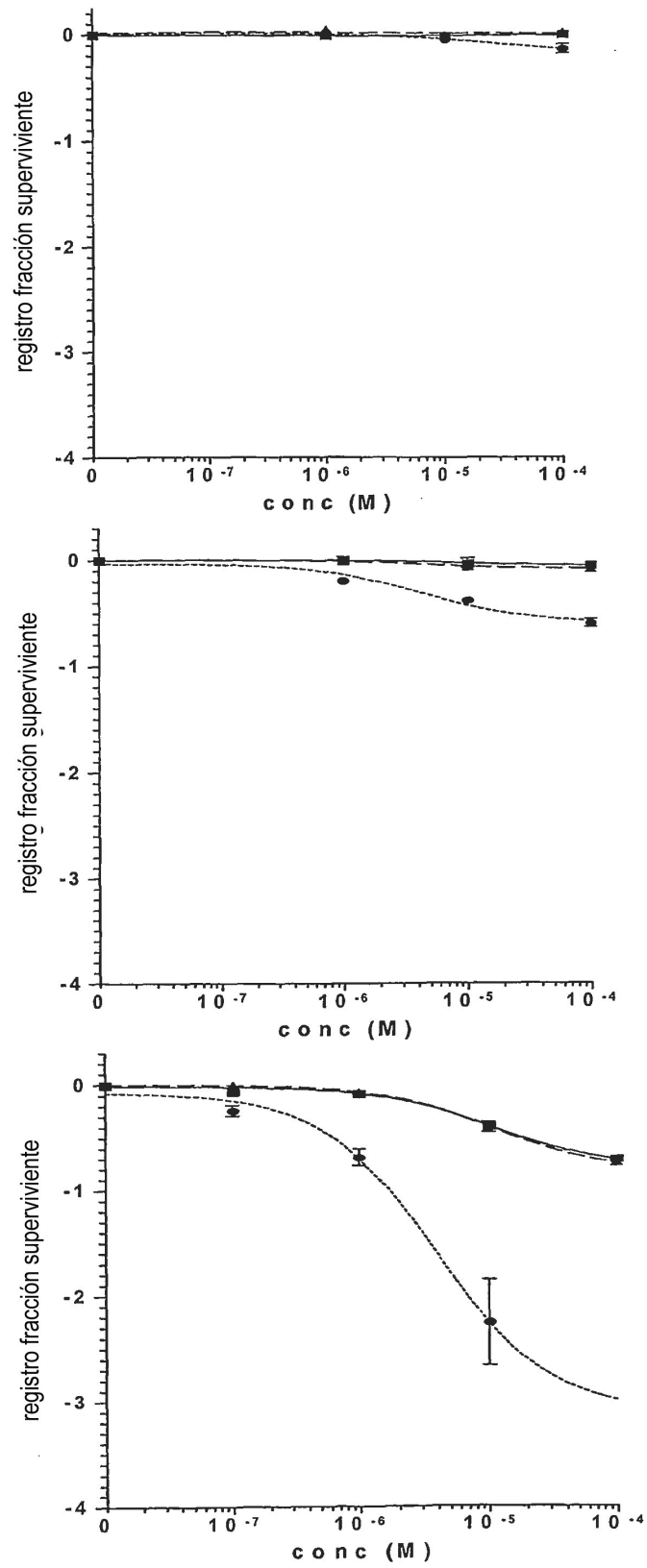


Figura 6



Figura 7

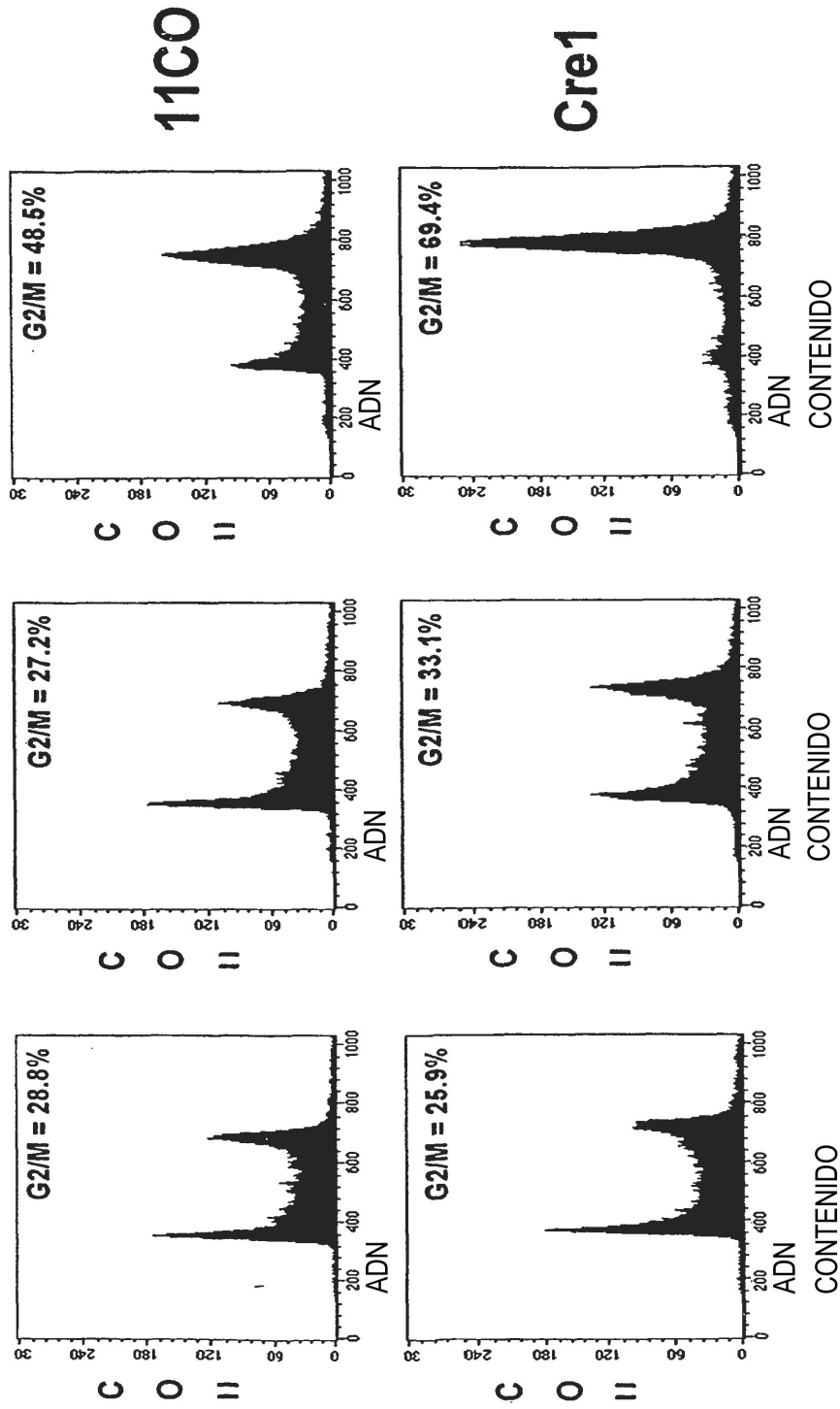
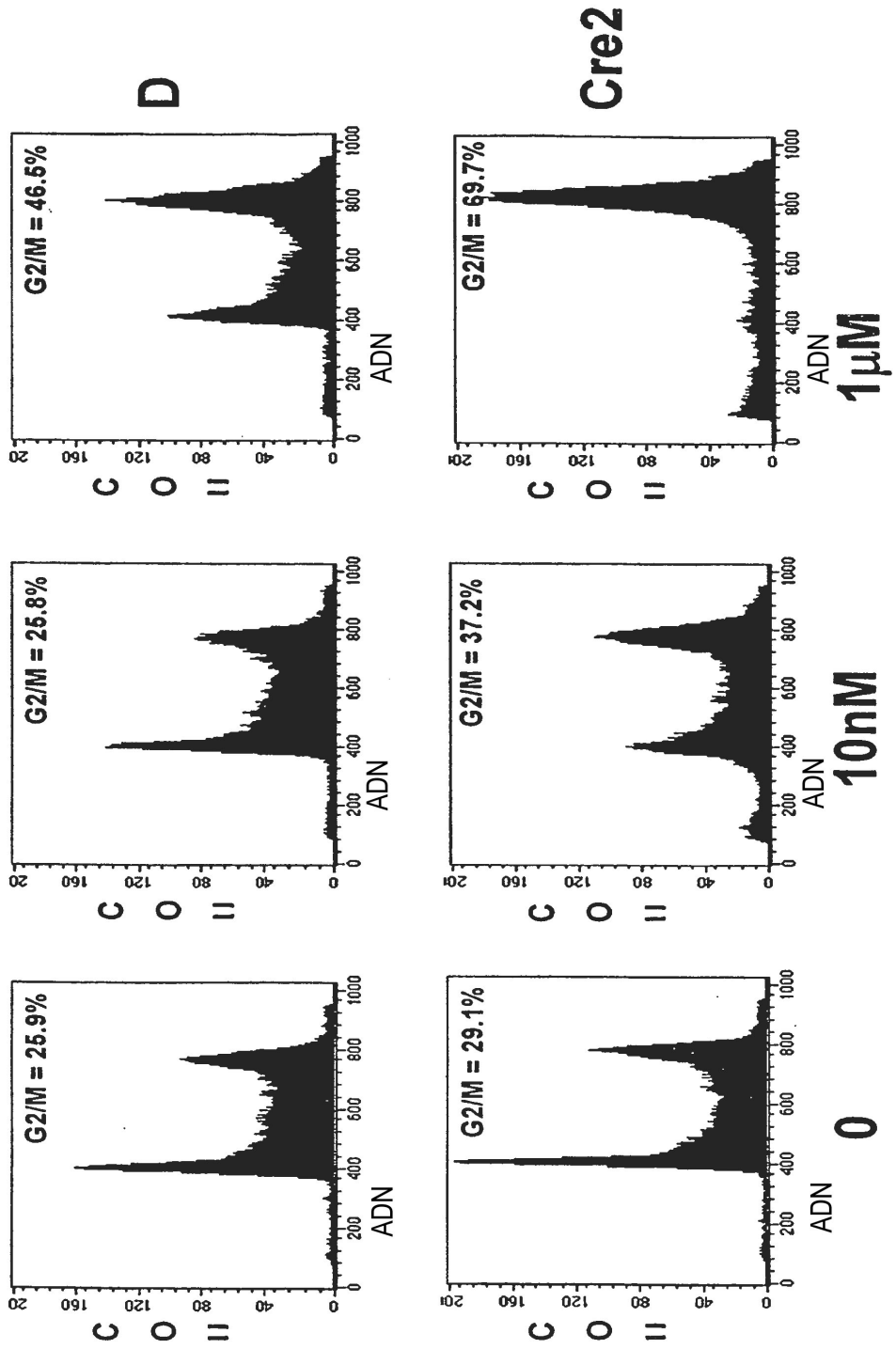


Figura 8



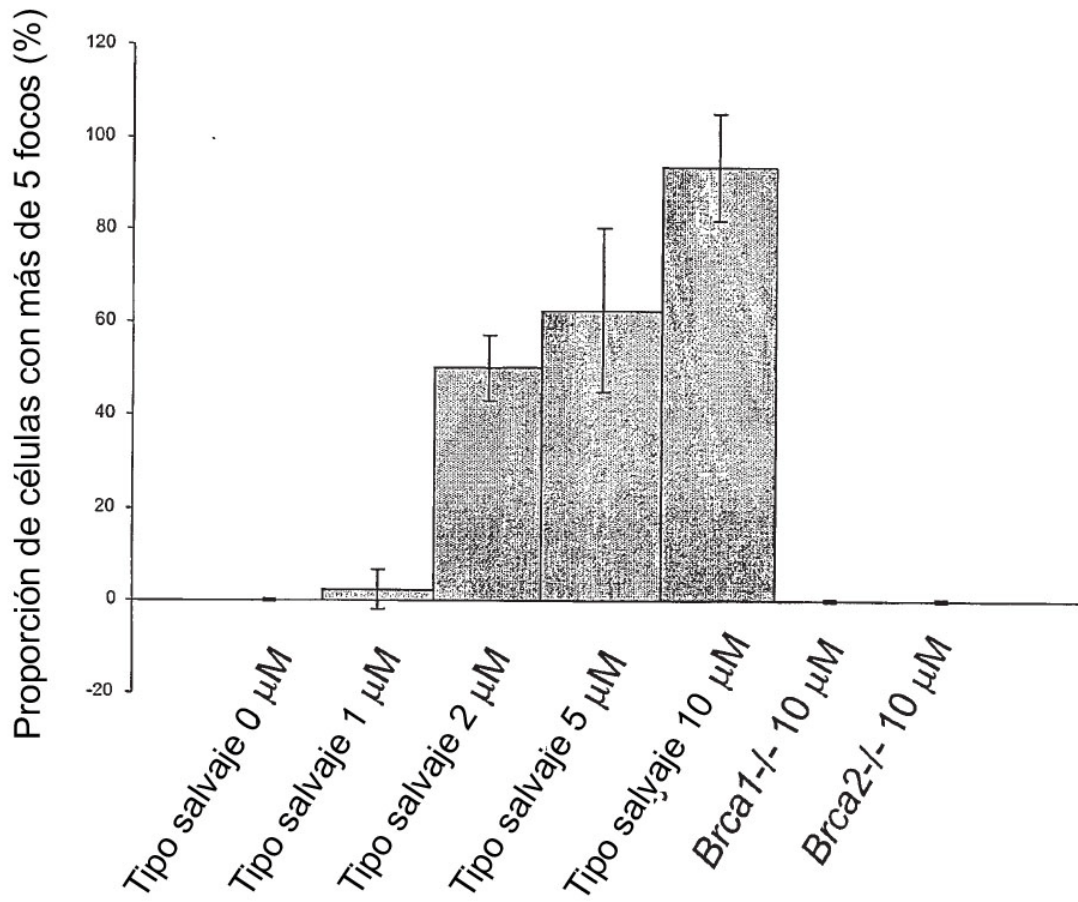


Figura 9

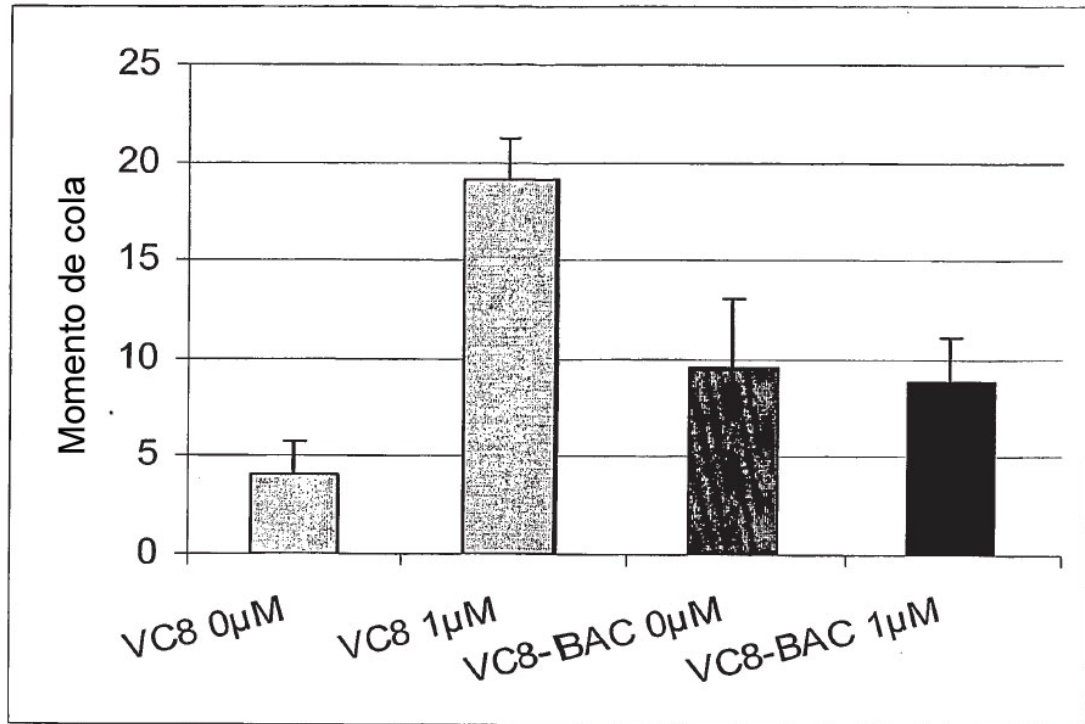


Figura 10

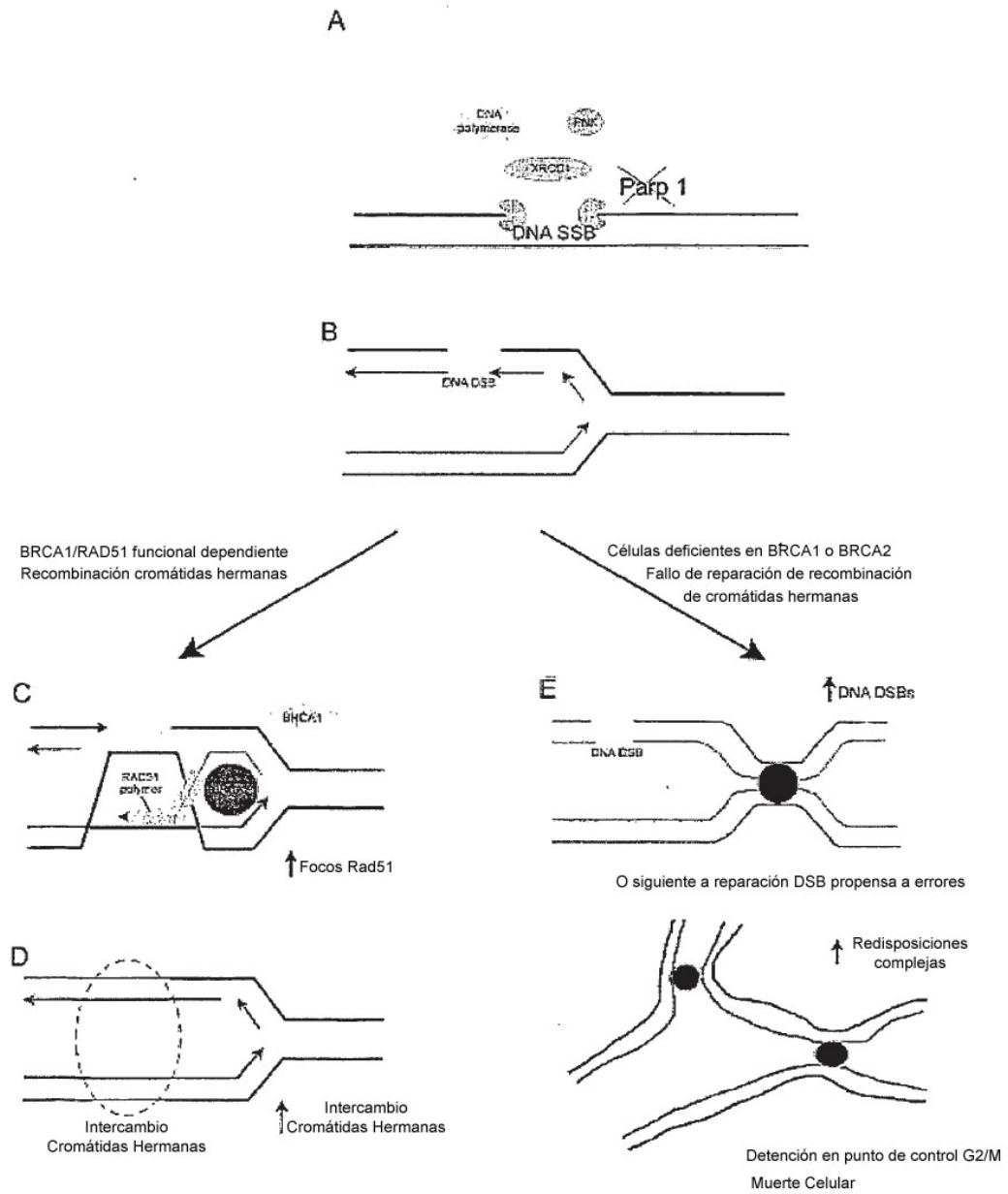


Figura 11

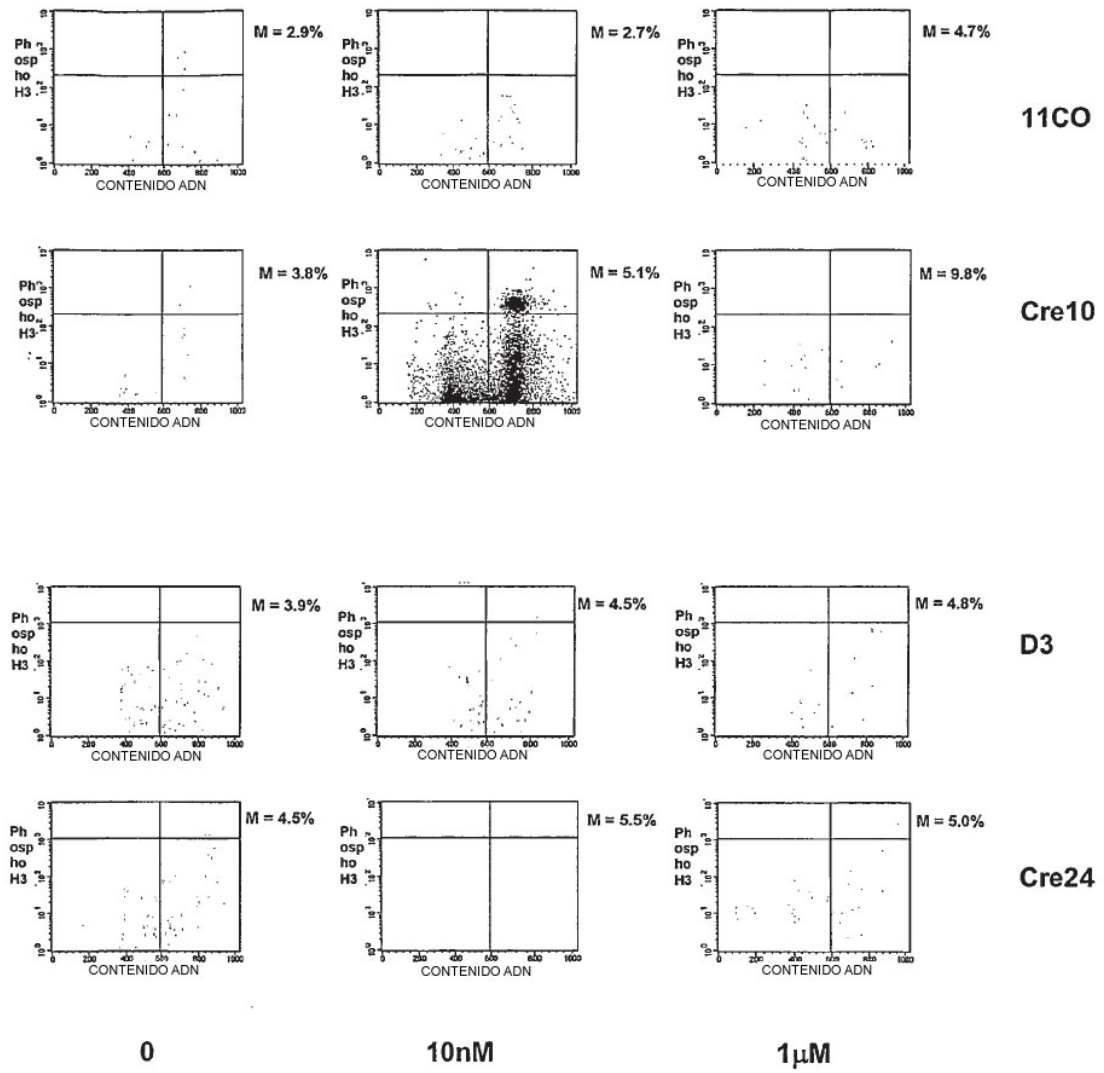


Figura 12

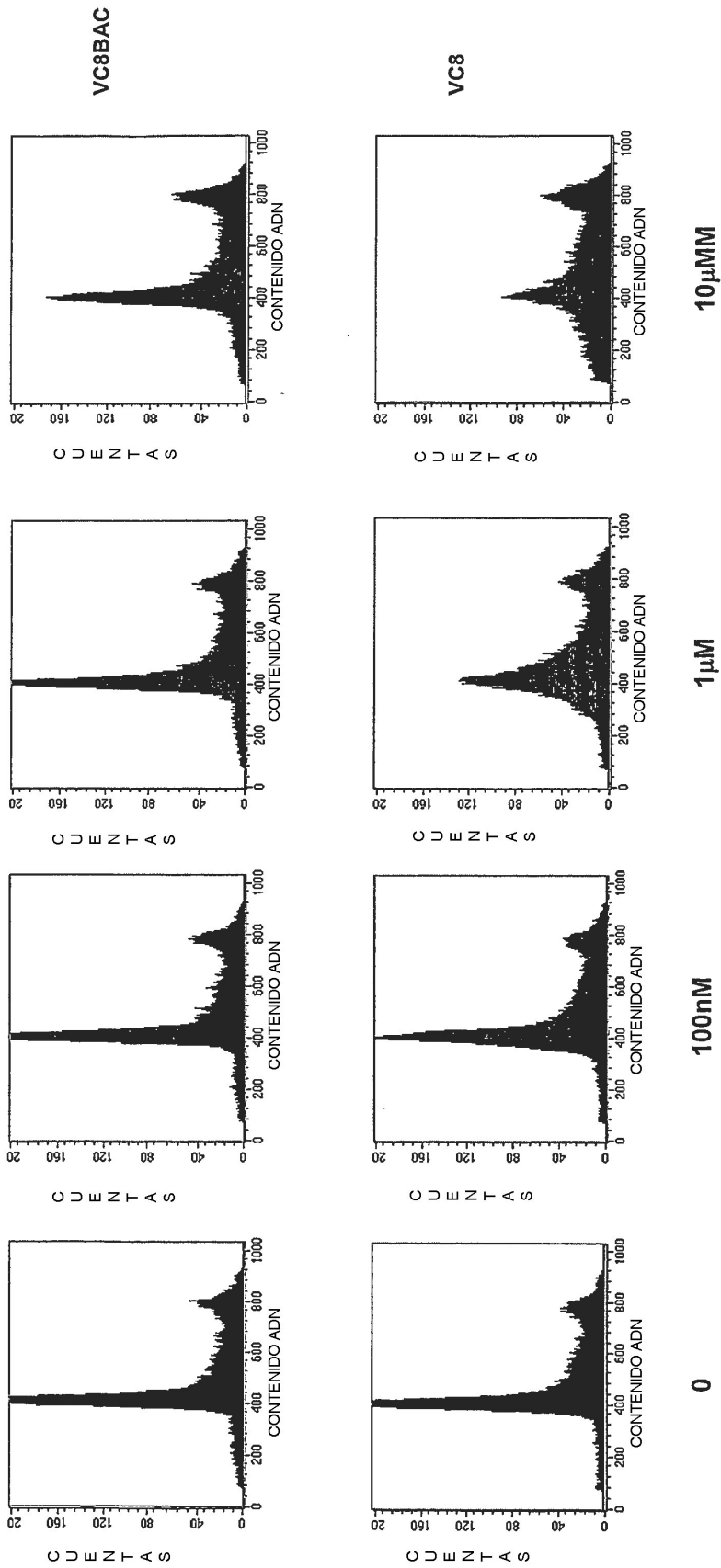


Figura 13

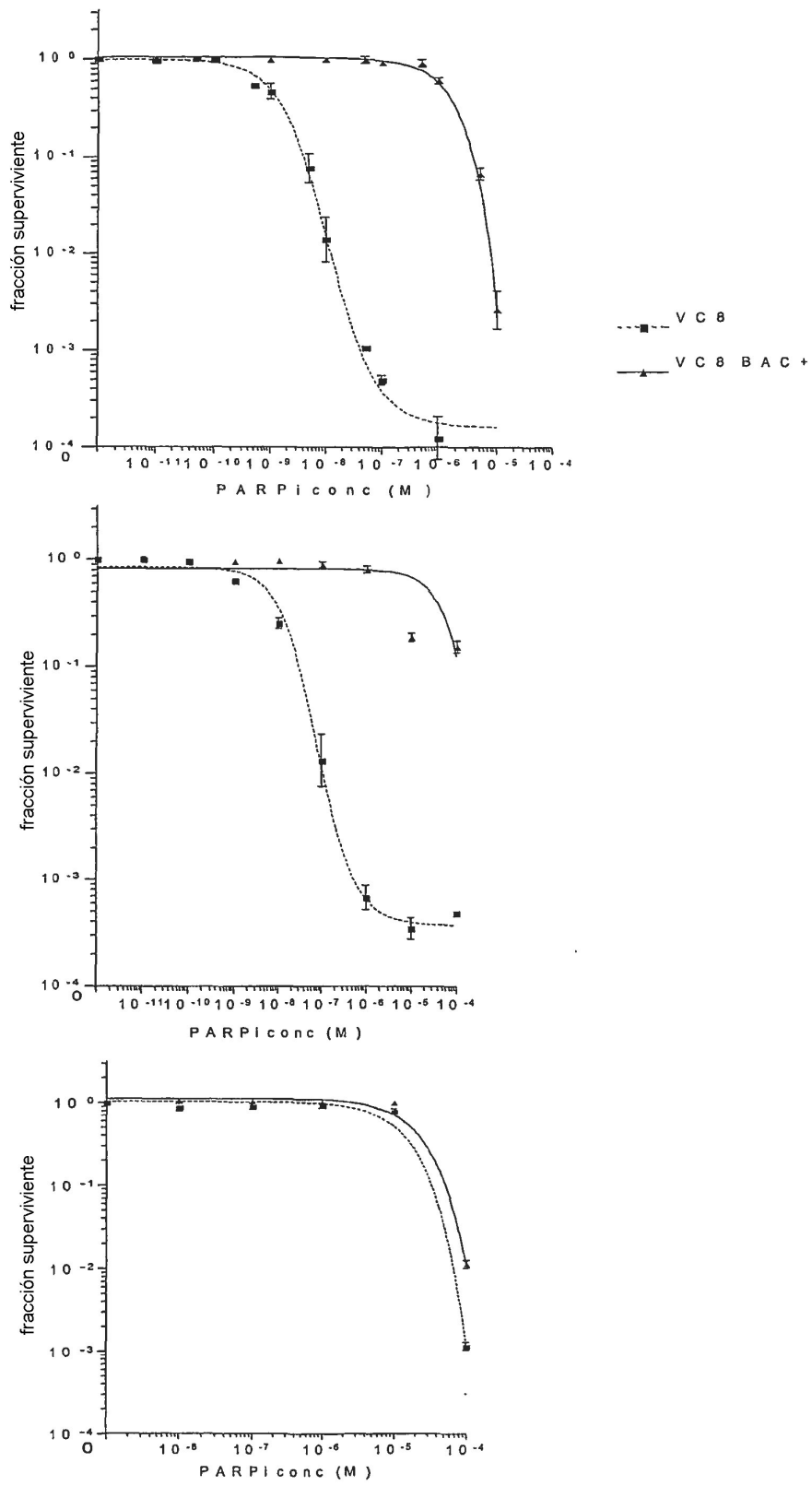


Figura 14



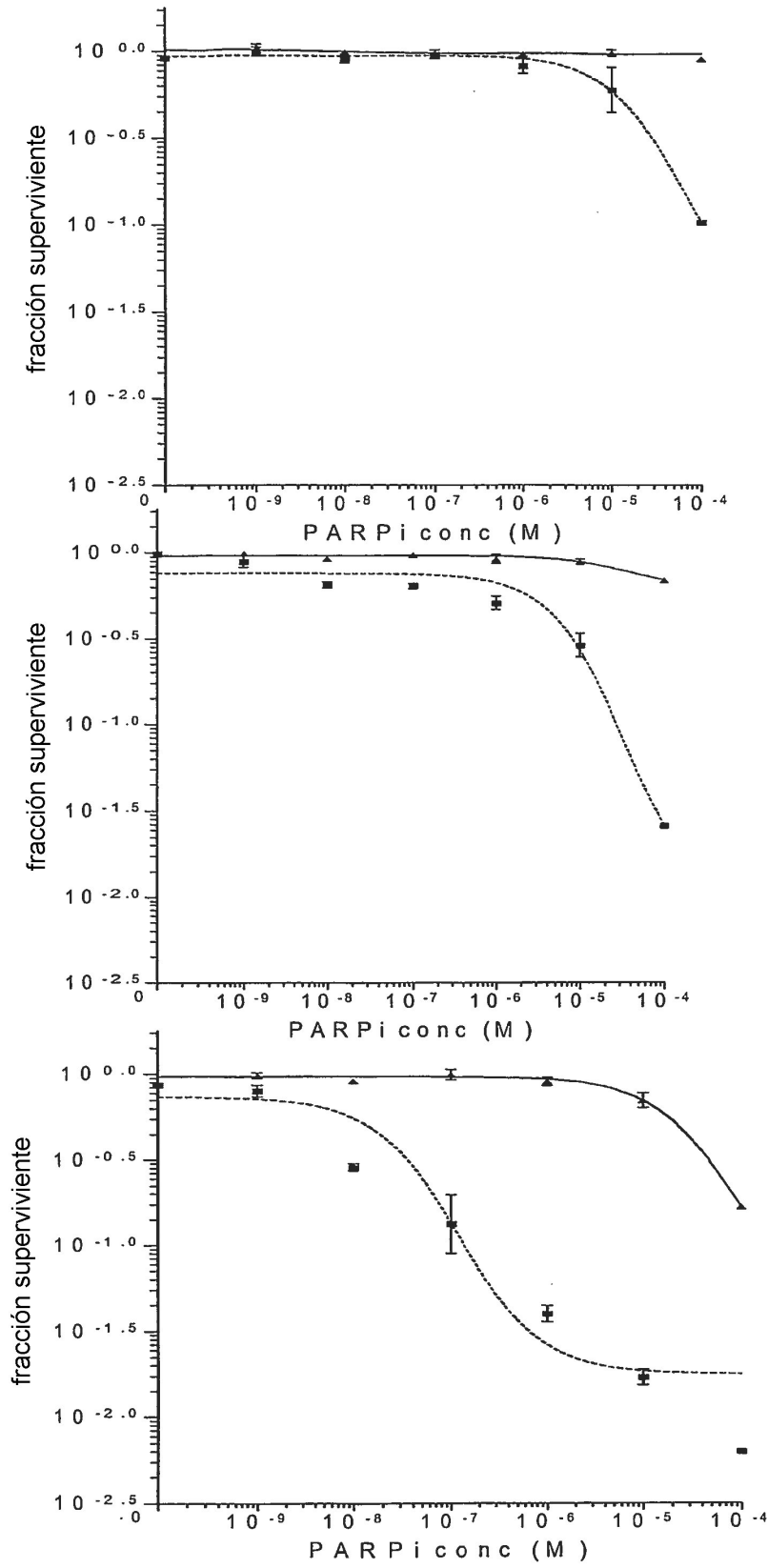


Figura 15

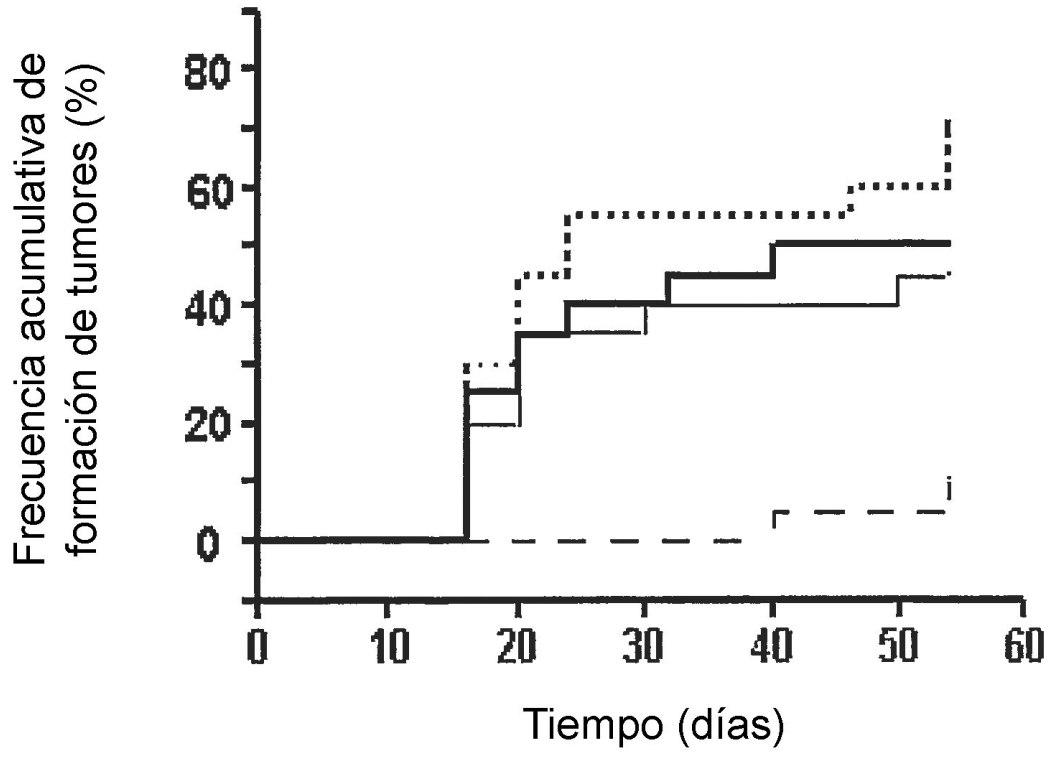


Figura 16

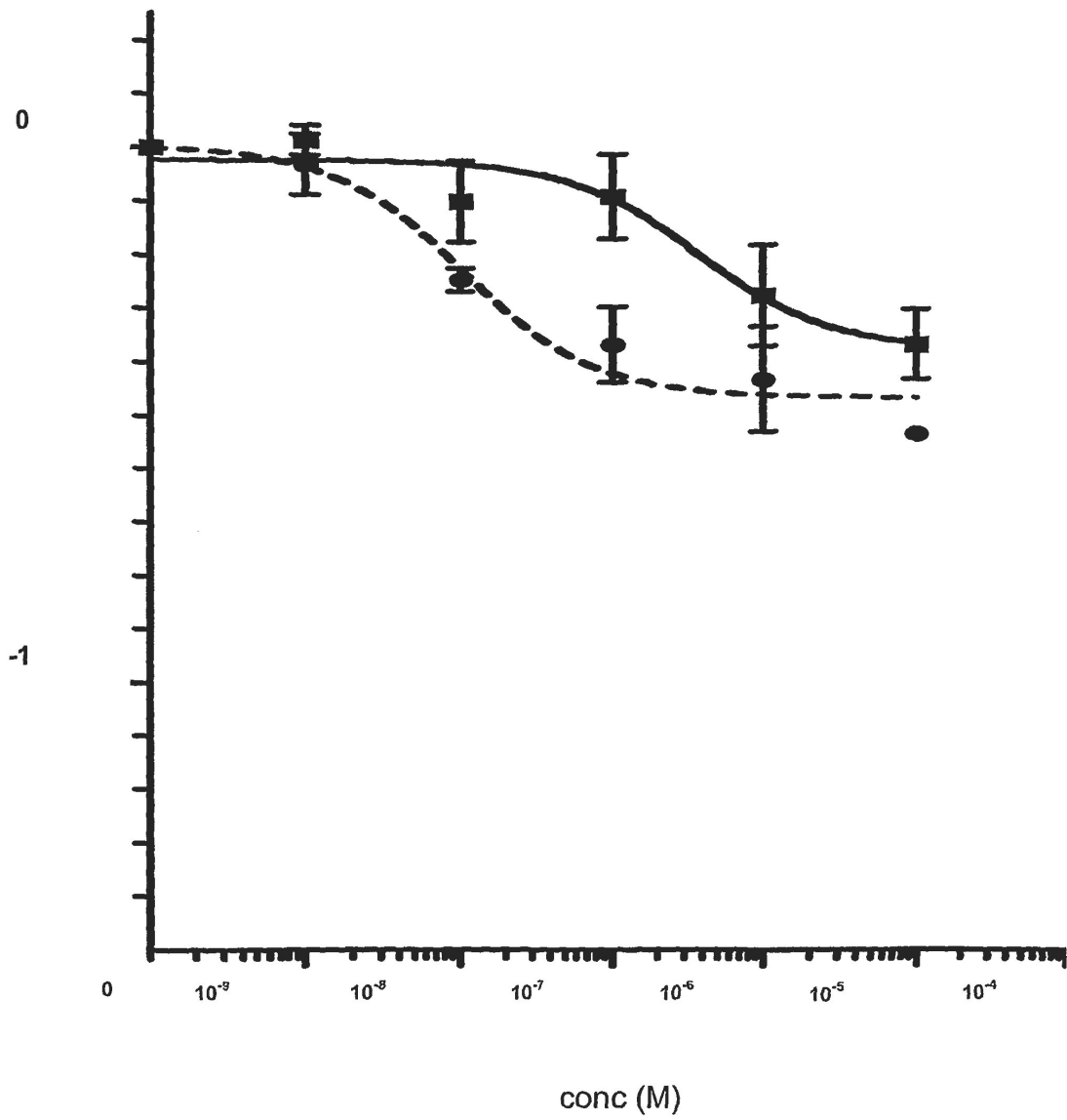


Figura 17

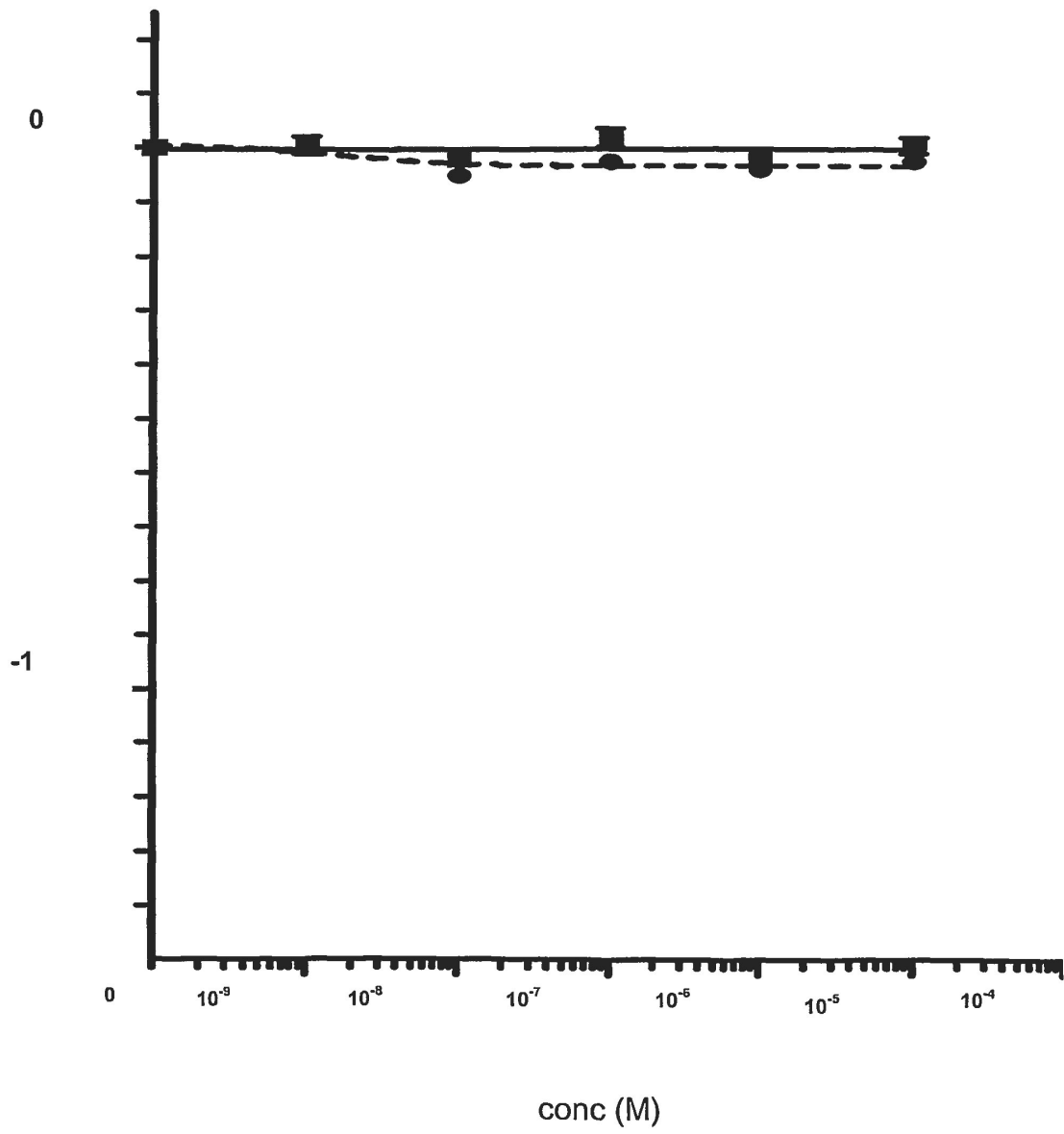


Figura 18