

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 359**

51 Int. Cl.:

C07D 209/44 (2006.01)

C07C 65/05 (2006.01)

C07C 69/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2007** **E 12187611 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2546233**

54 Título: **Derivados de hidrobencamida como inhibidores de la Hsp90**

30 Prioridad:

12.10.2006 GB 0620259
12.10.2006 US 829243 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2018

73 Titular/es:

ASTEX THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Milton Road, Cambridge
Cambridgeshire CB4 0QA , GB

72 Inventor/es:

FREDERICKSON, MARTYN;
LYONS, JOHN, FRANCIS;
THOMPSON, NEIL, THOMAS;
VINKOVIC, MLADEN;
WILLIAMS, BRIAN;
WOODHEAD, ANDREW, JAMES y
WOOLFORD, ALISON, JO-ANNE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 662 359 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

Derivados de hidrobencamida como inhibidores de la Hsp90

5 Esta invención se relaciona con combinaciones que comprenden nuevas formas de sal y cristalina de los compuestos que inhiben o modulan la actividad de la proteína de choque térmico Hsp90 y el uso de las combinaciones en el tratamiento o profilaxis de condiciones o estados de enfermedad mediados por la Hsp90. Se divulga además nuevos procesos para preparar los compuestos y nuevos intermedios químicos.

Antecedentes de la invención

10 En respuesta al estrés celular que incluye calor, toxinas, radiación, infección, inflamación, y oxidantes, todas las células producen un conjunto común de proteínas de choque térmico (Hsps) (Macario & de Macario 2000). La mayoría de las proteínas de choque térmico actúan como chaperonas moleculares. Las chaperonas unen y estabilizan las proteínas en etapas intermedias de plegado y permiten que las proteínas se plieguen a sus estados funcionales. La Hsp90 es la Hsp citosólica más abundante en condiciones normales. Existen dos tipos de isoformas humanas de Hsp90, una forma inducible mayor Hsp90 α y una forma menor expresada constitutivamente Hsp90 β y otras dos chaperonas estrechamente relacionadas las cuales están restringidas en su ubicación intracelular (GP96/GRP94 retículo endoplasmático; TRAP1 mitocondria). El término HSP90 como se usa en la presente incluye todos esos análogos a menos que se declare. La Hsp90 une proteínas en una etapa tardía de plegado y se distingue de otras Hsps en la que la mayoría de sus sustratos de proteínas se involucran en la transducción de la señal. La Hsp90 tiene un sitio de unión del ATP distinto, incluyendo un pliegue Bergerat característico de la girasa bacteriana, topoisomerasas e histidina quinasas. Se ha demostrado que se hidroliza el ATP unido en el bolsillo N-terminal de la Hsp90. Esta actividad ATPasa resulta en un cambio conformacional en la Hsp90 que se necesita para permitir cambios conformacionales en la proteína del cliente.

15 Un dominio de dimerización y un segundo sitio de unión del ATP, que pueden regular la actividad ATPasa, se encuentra cerca del c-terminal de Hsp90. La dimerización de la HSP90 parece ser crítica para la hidrólisis de ATP. La activación de la Hsp90 se regula además a través de interacciones con una variedad de otras proteínas chaperonas y pueden aislarse en el complejo con otras chaperonas que incluyen Hsp70, Hip, Hop, p23, y p50cdc37. Muchas otras proteínas co-chaperonas han demostrado además unir la HSP90. Un modelo simplificado ha surgido en el que la unión de ATP al bolsillo amino terminal altera la conformación de la Hsp90 para permitir la asociación con un complejo multichaperona. Primero, la proteína cliente está unida a un complejo Hsp70/Hsp40. Este complejo se asocia después con la Hsp90 a través de Hop. Cuando ADP se sustituye por ATP, se altera la conformación de Hsp90, se liberan Hop y Hsp70 y un conjunto diferente de co-chaperonas se recluta incluyendo p50cdc37 y p23. La hidrólisis de ATP resulta en la liberación de estas co-chaperonas y la proteína cliente del complejo maduro. Los antibióticos ansamicina herbimicina, geldanamicina (GA) y 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG) son inhibidores del sitio de unión del ATP que bloquean la unión de ATP y previenen la conversión al complejo maduro (Grenert y otros, 1997. J Biol Chem., 272:23834-23850).

25 A pesar de que la Hsp90 se expresa ubicuamente, GA tiene una afinidad de unión superior para Hsp90 derivada de tumor contra las líneas celulares normales (Kamal y otros, Nature 2003; 425: 407-410). GA muestra además actividad citotóxica más potente en las células tumorales y es secuestrada a concentraciones superiores dentro de los tumores en modelos de xenoinjertos en ratón. (Brazidec J. Med. Chem. 2004, 47, 3865-3873). Además, la actividad ATP-asa de la Hsp90 es elevada en las células cancerosas y es una indicación del nivel aumentado de estrés en estas células. Se ha reportado además que la amplificación génica de Hsp90 ocurre en las etapas más avanzadas del cáncer (Jolly y Morimoto JNCI Vol. 92, núm. 19, 1564-1572, 2000).

35 La inestabilidad genética aumentada asociada con el fenotipo del cáncer conduce a un aumento en la producción de proteínas no nativas o mutantes. La vía ubiquitina sirve además para proteger a la célula de proteínas no nativas o mal plegadas, dirigiendo estas proteínas a la degradación proteasomal. Las proteínas mutantes son no nativas por su naturaleza, y por lo tanto tienen el potencial para mostrar inestabilidad estructural y una necesidad aumentada para el sistema de chaperona. (Giannini y otros, Mol Cell Biol. 2004; 24(13):5667-76).

40 Existe alguna evidencia de que principalmente la Hsp90 se encuentra dentro de los complejos multichaperona "activados" en las células tumorales en comparación con los complejos "latentes" en las células normales. Uno de los componentes del complejo multichaperona es la co-chaperona cdc37. Cdc37 une Hsp90 en la base del sitio de unión de ATP y podría afectar las tasas de disociación de los inhibidores unidos a Hsp90 en el estado "activado" (Roe y otros, Cell 116, (2004), págs. 87-98). Se cree que la proteína cliente unida a la forma Hsp90-Hsp70 del complejo chaperona es más susceptible a la ubiquitinación y que dirige al proteasoma para la degradación. Las ligasas ubiquitina E3 se han identificado con motivos de chaperonas que interactúan y una de estas (CHIP) demostró promover la ubiquitinación y degradación de las proteínas cliente de Hsp90 (Connell y otros, 2001. Xu y otros, 2002).

Proteínas cliente de Hsp90

El número de proteínas cliente de Hsp90 reportadas ahora superan 100. Ya que muchas de sus proteínas clientes se involucran en la señalización de la proliferación celular y supervivencia, Hsp90 ha despertado mayor interés como un objetivo de oncología. Dos grupos de proteínas clientes, proteínas quinasas de la señalización celular y factores de transcripción, particularmente sugieren que la regulación de Hsp90 puede tener beneficios potenciales como una terapia contra el cáncer.

Las proteínas clientes de la proteína quinasa Hsp90 implicadas en la proliferación celular y la supervivencia incluyen las siguientes:

c-Src

El Src celular (c-Src) es un receptor de tirosina quinasa necesario para la mitogénesis iniciada por múltiples receptores de factor de crecimiento, incluyendo los receptores para el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), factor-1 estimulante de colonias (CSF-1R), y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGFR). El C-Src se sobreexpresa y activa además en muchos de los mismos carcinomas humanos que sobreexpresan EGFR y ErbB2. El Src se necesita además para el mantenimiento de la homeostasis normal de los huesos a través de su regulación de la función osteoclástica.

p185erbB2

El ErbB2 (Her2/neu) es un receptor tirosina quinasa sobreexpresado en una variedad de malignidades que incluyen cánceres de mama, ovario, próstata, y gástrico. ErbB2 se identificó originalmente como un oncogén y la inhibición de Hsp90 resulta en la poliubiquitinación y degradación de erbB2.

Quinasa mitótica Polo

Las quinasas tipo Polo (Plk) son reguladores importantes de la progresión del ciclo celular durante la fase-M. Las Plk se involucran en el ensamblaje del aparato del huso mitótico y en la activación de complejos CDK/ciclina. Las Plk1 regulan la desfosforilación de tirosina de las CDK a través de la fosforilación y activación de Cdc25C. La activación de CDK1 a su vez conduce a la formación del huso y entrada en la fase M.

Akt (PKB)

Akt se involucra en las vías que regulan el crecimiento celular estimulando la proliferación celular y suprimiendo la apoptosis. La inhibición de Hsp90 por ansamicinas resulta en una reducción en la vida media de Akt a través de la ubiquitinación y degradación proteasomal. La unión de cdc37 a Hsp90 se necesita además para la regulación hacia abajo de Akt. A continuación del tratamiento con ansamicina las células de cáncer se detienen en la fase G2/M del ciclo celular de 24 horas después del tratamiento y continúan a la apoptosis 24-48 horas más tarde. Las células normales se detienen además 24 horas después del tratamiento con ansamicina, pero no continúan adelante a la apoptosis.

c-Raf, B-RAF, Mek

La vía de la quinasa RAS-RAF-MEK-ERK-MAP media las respuestas celulares a señales de crecimiento. RAS se muta a una forma oncogénica en aproximadamente 15% de los cánceres humanos. Los tres genes RAF son serina/treonina quinasas que se regulan uniendo RAS.

EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se implica en el crecimiento celular, diferenciación, proliferación, supervivencia, apoptosis, y migración. La sobreexpresión de EGFR se ha encontrado en muchos cánceres diferentes y mutaciones activadoras de su dominio quinasa parecen ser patogénicos en un subconjunto de adenocarcinomas del pulmón.

Flt3

La tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3) es un receptor tirosina quinasa involucrado en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La activación de Flt3 conduce además a la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y cascadas de transducción de señales RAS.

c-Met

El c-met es un receptor tirosina quinasa que se une al factor de crecimiento de hepatocito (HGF) y regula tanto la motilidad celular como el crecimiento celular. c-met se sobreexpresa en tumores, incluyendo cáncer de tiroides, estómago, páncreas y colon. El HGF se detecta además alrededor de los tumores, incluyendo las metástasis hepáticas. Esto sugiere que c-met y HGF desempeñan un importante papel en la invasión y metástasis.

Cdk1, Cdk6 , Cdk4 , Cdk2

5 Cdk1, Cdk2, Cdk4, y Cdk6 conducen el ciclo celular. La actividad de las CDK se regula por su unión a subunidades específicas tales como ciclinas, factores inhibidores y de ensamblaje. La especificidad de sustrato y momento de las actividades de CDK se dicta por su interacción con ciclinas específicas. Cdk4/ciclina D y son Cdk6/ciclina D son activas en la fase G1, Cdk2/ciclina E y Cdk2/ciclina A en la fase S, y Cdc2/ciclina A y Cdc2/ciclina B en la fase G2/M.

La quinasa tipo 4 dependiente de ciclina (CDK4), desempeña un papel clave para permitir a las células atravesar G1 a la fase de transición S del ciclo celular y se activa constitutivamente en muchos cánceres humanos. El activador de CDK4, ciclina D1, se sobreexpresa y un inhibidor de CDK4, p16, se suprime en una variedad de tumores humanos.

10 Los inhibidores de Cdk1/Cdk2 que se han desarrollado en forma reversible bloquean las células normales ya sea en la fase G1/S o el límite G2/M. La detención G2/M es generalmente menos adecuadamente tolerada por las células y, por consiguiente, se someten a la muerte celular apoptótica. Ya que se conoce que Hsp90 afecta además las vías de supervivencia celular, este efecto puede ser amplificado adicionalmente con un inhibidor de Hsp90.

Wee-1

15 La proteína quinasa Wee-1 lleva a cabo la fosforilación inhibidora de CDC2 en la tirosina 15 (Tyr15). Esto se necesita para la activación del punto de regulación de la fase G2 en respuesta al daño del ADN.

Los factores de transcripción de Hsp90 implicados en la proliferación celular y supervivencia incluyen los siguientes:

Mutante p53

20 P53 es una proteína supresora de tumor que causa la detención del ciclo celular e induce la apoptosis. P53 se muta en aproximadamente la mitad de todos los cánceres. El mutante p53 se asocia con Hsp90 y se regula hacia abajo en líneas de cáncer tratadas con inhibidores de Hsp90, mientras que no se afectaron los niveles de p53 de tipo salvaje.

Receptor de progesterona/receptor de estrógeno/ receptor de andrógeno

25 Aproximadamente el 70% de las mujeres post-menopáusicas que desarrollan cáncer de mama tienen tumores que expresan el receptor de estrógeno. El tratamiento de primera línea de esos pacientes se dirige a prevenir la señalización a través de esta vía y así inhibir el crecimiento del tumor. Esto puede hacerse por ablación ovárica, tratamiento con agonistas hormonales que liberan gonadotropina, inhibición de la aromataasa o tratamiento con agonistas específicos que se unen al receptor de estrógeno pero previenen además la señalización. Finalmente los pacientes desarrollan resistencia a estas intervenciones frecuentemente como consecuencia de la diafonía entre el receptor de estrógeno y los receptores del factor de crecimiento localizados en la membrana celular. Los receptores de estrógeno en estado de desligamiento se unen con Hsp90 lo cual facilita la unión de la hormona. A continuación de la unión al complejo maduro del receptor de Hsp90 puede unirse el receptor ligado a los elementos de respuesta a hormona (HRE) en las regiones reguladoras de los genes objetivos involucrados en el mantenimiento de la proliferación celular. La inhibición de Hsp90 inicia la degradación del proteosoma del receptor de estrógeno previniendo así a través de esta vía la señalización adicional del crecimiento. Los cánceres de próstata son malignidades hormona-dependientes que responden a las intervenciones terapéuticas que reducen los niveles circulantes de testosterona o previenen la unión de la testosterona al receptor de andrógeno. Aunque los pacientes responden inicialmente a estos tratamientos la mayoría posteriormente desarrollan resistencia a través de la restauración de la señalización a través del receptor de andrógeno. Antes de la unión de ligandos el receptor de andrógeno existe en un complejo con Hsp90 y otras co-chaperonas que incluyen p23 e inmunofilinas. Esta interacción mantiene el receptor de andrógeno en una conformación de alta afinidad de unión de ligandos. La inhibición de Hsp90 conduce a la degradación del proteosoma del receptor de andrógeno y otras co-chaperonas que pueden sensibilizar el tumor a terapias hormonales adicionales.

Los receptores mutados de la hormona esteroide que surgieron por ejemplo durante la terapia anti-hormonal y que pueden ser resistentes a dichas terapias tienen posibilidades de tener una dependencia mayor de HSP90 para su estabilidad y función de unión de la hormona.

45 Hif-1a

El factor-1a (HIF-1a) inducible por hipoxia es un factor de transcripción que controla la expresión de los genes que desempeñan un papel en la angiogénesis. HIF-1a se expresa en la mayoría de las metástasis y se conoce que se asocia con la Hsp90. El tratamiento con ansamicina de líneas celulares de carcinoma renal conduce a la ubiquitinación y degradación proteasomal de HIF-1a.

50 Los inhibidores de Hsp90 son capaces de afectar a un gran número de objetivos importantes para la transducción de señales en la proliferación de células tumorales. Los inhibidores de la transducción de señales que regulan las

actividades de un solo objetivo, no pueden ser tan eficaces debido a la redundancia de la vía de señalización y el rápido desarrollo de resistencia.

Regulando los objetivos múltiples involucrados en los inhibidores de HSP90 de la señalización celular y proliferación celular pueden resultar beneficioso en el tratamiento de un amplio espectro de trastornos proliferativos.

5 ZAP70

ZAP-70, un miembro de la familia de la proteína tirosina quinasa Syk-ZAP-70, se expresa normalmente en las células T y células asesinas naturales y tiene un papel crítico en la iniciación de la señalización de la célula T. Sin embargo, este se expresa además de manera aberrante en aproximadamente 50% de los casos de CLL, usualmente en los casos con genes receptores de célula-B no mutados. El estatus mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IgV_H*) en las células leucémicas de la leucemia linfocítica crónica (CLL) es un importante factor pronóstico. La expresión de ZAP-70 en las células CLL se correlaciona con el estatus mutacional de *IgV_H*, progresión de la enfermedad, y supervivencia. CLL positiva a ZAP-70 es más agresiva que CLL negativa a ZAP-70 indicando que ZAP-70 puede ser un impulsor clave de la malignidad en esta enfermedad. ZAP-70 físicamente se asocia con HSP90 en los linfoblastos B-CLL así la inhibición de Hsp90 puede sensibilizar estas células con la quimioterapia existente o terapia con anticuerpo monoclonal.

Proteínas de choque térmico y resistencia a fármacos antitumorales

Se ha reconocido que la conformación terciaria nativa de cualquier polipéptido dado se determina por su secuencia primaria (aminoácido). Sin embargo, como se explicó anteriormente, ahora está claro que el plegado apropiado *in vivo* de muchas proteínas requiere el apoyo de las proteínas de choque térmico (Hsp) que actúan como chaperonas moleculares. Si bien esta función de la chaperona es importante para la función celular normal en todas las condiciones, se convierte crucial en células que están estresadas (por ejemplo, calor, hipoxia o acidosis).

Tales condiciones prevalecen en las células tumorales, que existen en un entorno hostil del huésped. La sobre-regulación de las Hsp frecuentemente se observa en tales células por lo tanto es probable que represente un mecanismo por el cual las células malignas mantienen la integridad de sus proteomas bajo condiciones que comprometen el plegado de la proteína. Así, los moduladores o inhibidores de las proteínas de estrés generalmente (y Hsp90 particularmente) representan una clase de quimioterapéuticos con la única capacidad de inhibir simultáneamente las múltiples vías de señalización aberrante. Por lo tanto, pueden ejercer efectos antitumorales a la vez que eliminan (o reducen la incidencia de) la resistencia con relación a otros paradigmas de tratamiento.

Adicionalmente, las intervenciones terapéuticas contra el cáncer de todo tipo aumentan necesariamente las tensiones impuestas sobre las células tumorales objetivo. En la mitigación de los efectos perjudiciales de tales tensiones, las Hsp están directamente involucradas en la resistencia a los efectos de los fármacos anticancerígenos y regímenes de tratamiento. Así, los moduladores o inhibidores de la función de la proteína de choque generalmente (y Hsp90 particularmente) representan una clase de quimioterapéuticos con el potencial para: (i) sensibilizar las células malignas a los fármacos y/o tratamientos contra el cáncer; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a los fármacos y/o tratamientos contra el cáncer; (iii) revertir la resistencia a los fármacos y/o tratamientos contra el cáncer; (iv) potenciar la actividad de los fármacos y/o tratamientos contra el cáncer; (v) retardar o prevenir la aparición de la resistencia a los fármacos y/o tratamientos contra el cáncer.

Inhibidores de HSP90 como agentes anti-fúngico, antiprotozo y anti-parasítico

Las infecciones fúngicas se han convertido en una principal causa de preocupación en los últimos años debido al número limitado de agentes antifúngicos disponibles, y el aumento de la incidencia de las especies que son resistentes a los agentes antifúngicos establecidos, tales como los azoles. Además, la población en crecimiento de los pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, pacientes tales como los pacientes de trasplante de órganos, pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia, pacientes quemados, pacientes con SIDA, o pacientes con cetoacidosis diabética) ha generado un aumento de la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas por agentes fúngicos tales como especies de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* y, en ocasiones, especies de *Fusarium*, *Trichosporon* y *Dreschlera*.

Por consiguiente, existe una necesidad de nuevos agentes antifúngicos que se puedan usar para tratar los crecientes números de pacientes con infecciones fúngicas y particularmente infecciones debido a los hongos que se han convertido en resistentes a los fármacos antifúngicos existentes.

La HSP90 se conserva a través de la evolución y se encuentra en bacteria (por ejemplo HTPG en *E.coli*) y levadura (por ejemplo, HSC82 y HSP82). Aunque los clientes no se identificaron formalmente para la forma de *E. coli*, como se describió anteriormente en levadura, y todos los organismos superiores la familia HSP90 mostró que funciona como una chaperona para muchas proteínas esenciales.

- La infección por una variedad de patógenos está asociada con una respuesta de anticuerpos a HSP90. Por ejemplo en pacientes infectados con *Candida albicans* el fragmento C-terminal de HSP90 de 47kDa es un epítipo inmunodominante. Además esta respuesta de anticuerpos está asociada con buen pronóstico lo que sugiere un efecto protector contra la infección. Los anticuerpos recombinantes a un epítipo en este polipéptido son además protectores contra la infección en modelos de ratón de candidiasis invasiva. (Ver Mathews y otros *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003 vol 47, 2208 - 2216 y las referencias en la misma). Igualmente la HSP90 expresada superficialmente sirve como un antígeno en la enfermedad de Chagas, ascariasis, leishmaniasis, toxoplasmosis e infección debida a *Schistosoma mansoni* y se ha postulado que los anticuerpos para HSP90 expresan protección contra la infección por *Plasmodium* y Malaria.
- El Mycograb (NeuTec Pharma/Novartis) es un anticuerpo monoclonal humano recombinante contra la proteína de choque térmico 90 que se está desarrollando como un tratamiento para la candida y ha mostrado respuestas significativas en los primeros ensayos. Además, los inhibidores naturales del producto HSP90 Geldanamycin, Herbimycin y Radicol se identificaron originalmente por su actividad antifúngica. Las proteínas esenciales claves se identificaron como clientes de HSP90 en diversos patógenos humanos (ver Cowen y Lindquist, *Science*. 30 de septiembre de 2005;309(5744):2175-6.) Así la HSP90 puede desempeñar un papel importante en el crecimiento de los agentes patógenos tales como especies de *Candida*, y los inhibidores de HSP90 pueden ser útiles como tratamientos para una variedad de enfermedades infecciosas incluyendo candidiasis.
- Se encontró además que la Hsp90 aumenta la capacidad de los hongos de desarrollar resistencia a los fármacos antifúngicos (ver Cowen LE, Lindquist S. "Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi". *Science*. 30 de septiembre de 2005;309 (5744):2185-9). Por lo tanto, la co-administración de un inhibidor de Hsp90 con un fármaco antifúngico puede mejorar la eficacia del fármaco antifúngico y reducir la resistencia previniendo la aparición de fenotipos resistentes.
- Inhibidores de HSP90 en el tratamiento de dolor, condiciones neuropáticas y apoplejía
- Cdk5 es un miembro de la familia Cdk de serina/treonina quinasas, la mayoría de las cuales son reguladoras claves del ciclo celular. La actividad de Cdk5 se regula a través de la asociación con sus activadores específicos de neuronas, p35 y p39. La última evidencia sugiere que CDK5 puede fosforilar la proteína tau y un número de otras proteínas neuronales tales como NUDE-1, sinapsina1, DARPP32 y el complejo Munc18/Sintaxina1A. La evidencia sugiere además que la actividad aberrante de Cdk5 inducida por la conversión de p35 a p25 desempeña un papel en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPD). La hiperfosforilación anormal de tau después del tratamiento con A β ₁₋₄₂ desestabiliza los microtúbulos, contribuyendo a la degeneración de neuritas y la formación de filamentos helicoidales apareados (PHF) que contienen enredos neurofibrilares (NFT), una de las lesiones principales de AD. Se encontró además que cdk5 es necesaria para el desarrollo neuronal apropiado
- La proteína p35 que actúa como un regulador de la actividad de CDK5 se identificó recientemente como una proteína cliente de HSP90 y por lo tanto la actividad de CDK5 se puede regular por los cambios en el nivel y actividad de HSP90. Así, la inhibición de HSP90 puede conducir a pérdida de p35, una inhibición de CDK5, una reducción de la proteína tau fosforilada en individuos sensibles y que traerá beneficios a los que sufren de la Enfermedad de Alzheimer.
- Además la inhibición de HSP90 usando agentes conocidos mostró que reduce in vitro la acumulación de agregados de proteína tau en los sistemas celulares. (Dickey y otros *Curr Alzheimer Res.* abril 2005;2(2):231-8).
- Cdk5 demostró tener un papel de mediador en la señalización del dolor Tanto Cdk5 como p35 mostraron que se expresan en neuronas nociceptivas. En ratones knock-out a p35, que muestran la actividad de Cdk5 sustancialmente reducida, la respuesta al estímulo térmico doloroso es retardada (Pareek, T.K., y otros, *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 103:791-796 (2006). Además la administración de la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5) inhibidor de roscovitina mostró que atenúa las respuestas nociceptivas inducidas por la formalina en ratas (Wang, Cheng-haung, y otros, *Acta Pharmacologica Sinica.*, 26:46-50 (2005). La activación de la calpaína es dependiente de calcio y se sabe que se afecta por la activación del receptor del canal de calcio NMDA (Amadoro, G; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2892-2897 (2006)). Los antagonistas del receptor de NMDA se conocen por ser clínicamente efectivos contra las condiciones de dolor neuropático (Christoph, T; y otros, *Neuropharmacology*, 51,12-17 (2006)). Esta eficacia puede estar vinculada con el efecto del receptor de NMDA relacionado con la afluencia de calcio en la actividad de la calpaína y su efecto subsiguiente en la actividad de Cdk5. Como tal los compuestos que modulan la actividad de Cdk5 serán útiles para el tratamiento o prevención del dolor y así la modulación del regulador p35 de CDK5 por inhibición de HSP90 puede conducir a la inhibición de CDK5.
- Se desea disponer de un agente para el tratamiento paliativo del dolor, es decir, el alivio del dolor adicionalmente al alivio del dolor como resultado de la mejoría de la enfermedad subyacente o condición médica, que es la causa del dolor.

Diversas Cdk (especialmente las Cdk 4, 5 & 6) mostraron estar involucradas con o median la muerte neuronal después del ataque de hipoxia o isquémico (Rashidan, J.; y otros; Proceedings of the National Academy of Sciences., 102:14080-14085 (2005). Además, el inhibidor de Cdk flavopiridol mostró que reduce significativamente la muerte neuronal en un modelo de isquemia cerebral focal en rata (Osuga, H.; y otros; Proceedings of the National Academy of Sciences., 97:10254-10259 (2000). Los inhibidores de CDK5 mostraron tener efectos protectores tanto en los paradigmas necróticos como apoptóticos de la muerte celular neuronal (Weishaupt, J.; y otros; Molecular y Cellular Neuroscience., 24:489-502 (2003).

La apoplejía es un evento cerebrovascular, que ocurre cuando se interrumpe el flujo sanguíneo normal al cerebro, y el cerebro recibe demasiada o muy poca sangre. La apoplejía es una de las principales causas de muerte en el mundo, y es además una de las más comunes de discapacidad neurológica.

El accidente cerebrovascular isquémico, que es el tipo más común de apoplejía, resulta de la insuficiente circulación de la sangre cerebral causada por la obstrucción de la afluencia de sangre arterial. Normalmente, el suministro adecuado de sangre cerebral está garantizado por un sistema de arterias dentro del cerebro. Sin embargo, diversos trastornos que incluyen inflamación y aterosclerosis, pueden causar un trombo, es decir, un coágulo de sangre que se forma en un vaso sanguíneo. El trombo puede interrumpir el flujo sanguíneo arterial, provocando isquemia cerebral y consiguientes síntomas neurológicos. El accidente cerebrovascular isquémico puede ser causado además por el alojamiento de un émbolo (una burbuja de aire) desde el corazón en el vaso intracraneal, causando presión de perfusión disminuida o viscosidad de la sangre aumentada con flujo sanguíneo cerebral inadecuado. Un émbolo puede causarse por varios trastornos, incluyendo fibrilación auricular y aterosclerosis.

Un segundo tipo de apoplejía, el accidente cerebrovascular hemorrágico, involucra hemorragia o ruptura de una arteria que va al cerebro. El accidente cerebrovascular hemorrágico resulta del sangramiento en el tejido cerebral, incluyendo el espacio epidural, subdural o subaracnoideo del cerebro. Un accidente cerebrovascular hemorrágico típicamente resulta de la ruptura del vaso arteriosclerótico que se expuso a la hipertensión arterial o trombosis.

Una oportunidad para la intervención en la apoplejía es la prevención o reducción de riesgo de apoplejía en pacientes con riesgo de accidente cerebrovascular. Hay muchos factores de riesgo conocidos para la apoplejía, que incluyen la inflamación vascular, aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia y fibrilación auricular. Los pacientes en riesgo se trataron con agentes para controlar la presión sanguínea o manejar el nivel de lípidos en sangre, y trataron con agentes antiplaquetarios (tal como, clopidogrel) y anticoagulantes. Una segunda oportunidad es el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo. Sin embargo, las terapias farmacológicas actuales para tratar el accidente cerebrovascular agudo están limitadas a restaurar el flujo sanguíneo dentro de un margen terapéutico estrecho de menos de tres horas después de la apoplejía. Existe una necesidad de agentes que sean eficaces dentro de un margen terapéutico más largo. Otra oportunidad es la recuperación o restablecimiento después del periodo de accidente cerebrovascular agudo, es decir, la reducción o prevención del daño celular secundario en la penumbra. Existe una necesidad de agentes que sean eficaces en la reducción o prevención del daño celular secundario después de la apoplejía.

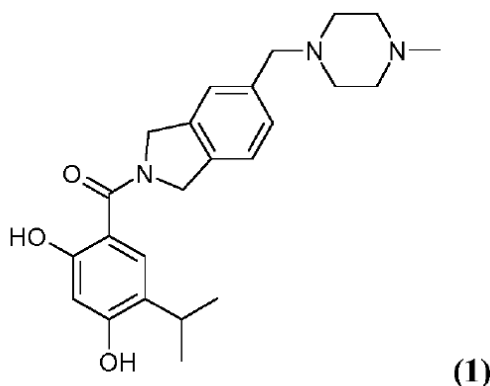
Puede desearse obtener un único agente farmacéutico que se pueda usar en más de una de las oportunidades anteriormente mencionadas para tratar la apoplejía. Dicho agente se puede administrar a pacientes en riesgo de apoplejía, y se puede administrar además a pacientes que padecen de accidente cerebrovascular agudo, o pacientes sometidos a tratamiento de recuperación o restablecimiento después del periodo de accidente cerebrovascular agudo. Dicho agente puede orientar además más de un mecanismo distinto de la cascada bioquímica de la apoplejía.

Inhibidores de HSP90 y el tratamiento de la hepatitis C y otras enfermedades virales

La infección de una célula huésped con el ARN/ADN viral resulta en un redireccionamiento sustancial de la síntesis de proteínas celulares hacia proteínas virales claves codificadas por el ácido nucleico viral. La carga aumentada de proteína sintética da lugar a una tensión en la célula como consecuencia de la demanda aumentada de energía y precursores sintéticos. La sobre-regulación de proteínas de choque térmico es frecuentemente una consecuencia de la infección viral al menos en parte debido a esta tensión. Una función de la inducción de HSP puede ser para ayudar en la estabilización y plegamiento de los altos niveles de proteína 'foránea' que se generan en la preparación para la replicación del virus. Un trabajo reciente en particular sugirió que la HSP90 es necesaria para la generación estable de la proteasa NS2/3 funcional en las células infectadas con el replicón de Hepatitis C (VHC). Los inhibidores de HSP 90 mostraron bloquear la replicación viral en sistemas in vitro. (Nagkagawa, S, Umehara T, Matsuda C, y otros Biochem. Biophys. Res Commun. 353 (2007) 882-888; Waxman L, Witney, M y otros PNAS 98 (2001) 13931 - 13935).

Nuestra solicitud anterior PCT/GB2006/001382, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia, describe isoindolina amidas de ácidos 2,4-dihidroxibenzoicos como inhibidores de la Hsp90. Uno de los compuestos específicamente descritos y ejemplificados en PCT/GB2006/001382, es el compuesto (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona que tiene la estructura mostrada más

abajo. Este compuesto puede referirse por conveniencia en esta solicitud como Compuesto 1 o el compuesto de la fórmula (1).



Sumario de la invención

- 5 La invención proporciona la sal de ácido láctico ácido (en especial la sal de L-lactato), y formas cristalinas de la misma, del compuesto de la fórmula (1), que presentan actividad inhibitora o moduladora de Hsp90 y que serán útiles en la prevención o tratamiento de estados o condiciones de la enfermedad mediada por Hsp90. La solicitud divulga además nuevos procedimientos para preparar el compuesto de la fórmula (1) y sus sales de adición ácida (particularmente la sal de L-lactato) y análogos de los mismos, e intermediarios químicos. Además se incluyen dentro del alcance de la invención los usos terapéuticos de la sal.

Preferencias y Definiciones Generales

- 15 En esta especificación, los términos "compuestos de la invención" o "compuesto de la invención", a menos que el contexto indique otra cosa, se refieren colectivamente a (a) la sal de adición ácida del compuesto (1) que es la sal de lactato (particularmente la sal de L-lactato), y (b) las formas cristalinas de la sal de adición ácida del compuesto de fórmula (1) que es la sal de lactato (particularmente la sal de L-lactato).

- 20 En esta especificación, los términos "combinaciones de la invención" o "combinación de la invención", a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere a (a) combinaciones de la sal de adición ácida del compuesto (1) que es la sal de lactato (particularmente la sal de L-lactato), y uno o más agentes terapéuticos diferentes, y (b) combinaciones de las formas cristalinas de la sal de adición ácida del compuesto (1) que es la sal de lactato (particularmente la sal de L-lactato), y uno o más agentes terapéuticos diferentes.

- 25 Como se usa en la presente, el término "tratamiento" y los términos relacionados "tratar" y "tratando" se refieren al tratamiento profiláctico o preventivo así como al tratamiento curativo o paliativo del dolor. Así, el término abarca situaciones donde el dolor ya está siendo experimentado por un sujeto o paciente, así como situaciones donde el dolor no está siendo experimentado en el presente pero se espera que surja. El término "tratamiento", "tratar", "tratando" y términos relacionados abarcan además la reducción o prevención completa y parcial del dolor. Así, por ejemplo, los compuestos de la invención pueden prevenir el dolor existente de agravarse, o reducirlo o incluso eliminar el dolor. Cuando se usa en un sentido profiláctico, los compuestos pueden prevenir cualquier dolor en desarrollo o pueden disminuir el grado de dolor que se puede desarrollar.

- 30 Como se usa en la presente, el término "modulación" según se aplica a la actividad de la proteína de choque térmico Hsp90, pretende definir un cambio en el nivel de actividad biológica de la proteína de choque térmico. Así, la modulación abarca los cambios fisiológicos que producen un aumento o disminución en la actividad competente de la proteína de choque térmico. En el último caso, la modulación se puede describir como "inhibición". La modulación puede surgir directa o indirectamente, y puede mediar por cualquier mecanismo y en cualquier nivel fisiológico, incluyendo por ejemplo, en el nivel de la expresión génica (incluyendo por ejemplo, transcripción, traducción y/o modificación post-traducciona), en el nivel de la expresión de genes que codifican elementos reguladores que actúan directa o indirectamente sobre los niveles de actividad de la proteína de choque térmico. Así, la modulación puede implicar la expresión elevada/suprimida, o sobre o sub-expresión de la proteína de choque térmico, incluyendo la amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y/o expresión aumentada o disminuida por un efecto transcripcional, así como hiper-(o hipo-) actividad y (des)activación de la proteína de choque térmico (incluyendo (des)activación) por mutación(es). Los términos "modulado", "modulación" y "modular" son interpretados en consecuencia.

- 40 Como se usa en la presente, el término "mediado", como se usa por ejemplo con relación a la proteína de choque térmico según se describe en la presente (y aplica por ejemplo a diversos procesos fisiológicos, enfermedades,

estados, condiciones, terapias, tratamientos o intervenciones) pretende funcionar limitadamente tal que los diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, condiciones, terapias, tratamientos o intervenciones en los que el término se aplica sean aquellos donde la proteína de choque térmico Hsp90 desempeña un papel biológico. En los casos donde el término se aplica a una enfermedad, estado o condición, el papel biológico desempeñado por la proteína de choque térmico Hsp90 puede ser directo o indirecto, puede ser necesario y/o suficiente para la manifestación de los síntomas de la enfermedad, estado o condición (o su etiología o progresión). Así, la actividad de la proteína de choque térmico Hsp90 (y, particularmente, los niveles aberrantes de la actividad de la proteína de choque térmico Hsp90, por ejemplo sobre-expresión de Hsp90) no tiene necesariamente que ser la causa proximal de la enfermedad, estado o condición: más bien, se contempla que las enfermedades, estados o condiciones mediados por la proteína de choque térmico Hsp90, incluyen aquellas que tienen etiologías multifactoriales y progresiones complejas en las que la Hsp90 sólo está parcialmente involucrada. En los casos donde se aplica el término al tratamiento, prevención o intervención (por ejemplo, en los "tratamientos mediados por Hsp90" y "profilaxis mediada por Hsp90" de la invención), el papel desempeñado por la Hsp90 puede ser directo o indirecto, y puede ser necesario y/o suficiente para el funcionamiento del tratamiento, profilaxis o resultado de la intervención. Así, un estado o condición de la enfermedad mediada por la Hsp90 incluye el desarrollo de resistencia a cualquier fármaco o tratamiento contra el cáncer (en particular incluyendo resistencia a uno o más de los inhibidores de la señalización descritos en la presente).

Como se usa en la presente, el término "modulación" como se aplica a la actividad de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) pretende definir un cambio en el nivel de actividad biológica de la quinasa(s). Así, la modulación abarca los cambios fisiológicos que producen un aumento o disminución en la actividad competente de la quinasa. En último caso, la modulación puede ser descrita como "inhibición". La modulación puede surgir directa o indirectamente, y puede medirse por cualquier mecanismo y en cualquier nivel fisiológico, incluyendo por ejemplo, en el nivel de la expresión génica (incluyendo por ejemplo, transcripción, traducción y/o modificación post-traduccional), en el nivel de la expresión de genes que codifican elementos reguladores que actúan directa o indirectamente sobre los niveles de actividad de la proteína quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), o en el nivel de actividad de la enzima (por ejemplo, quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) (por ejemplo, por mecanismos alostéricos, inhibición competitiva, inactivación del sitio activo, interrupción de las vías de retroalimentación inhibitoria etc.). Así, la modulación puede implicar la expresión elevada/suprimida, o sobre o sub-expresión de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), incluyendo la amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y/o expresión aumentada o disminuida por un efecto transcripcional, así como hiper-(o hipo-) actividad y (des)activación de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) incluyendo (des)activación por mutación(es). Los términos "modulado", "modulación" y "modular" son interpretados en consecuencia.

Como se usa en la presente, el término "mediado", como se usa por ejemplo, en conjunto con la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) como se describe en la presente (y aplica por ejemplo a diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, condiciones, terapias, tratamientos o intervenciones) pretende funcionar limitadamente tal que los diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, condiciones, terapias, tratamientos o intervenciones en los que el término se aplica sean aquellos donde la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) desempeña un papel biológico. En los casos donde el término se aplica a una enfermedad, estado o condición, el papel biológico desempeñado por la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) puede ser directo o indirecto, puede ser necesario y/o suficiente para la manifestación de los síntomas de la enfermedad, estado o condición (o su etiología o progresión). Así, la actividad de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) (y particularmente los niveles aberrantes de actividad de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), por ejemplo, la sobre-expresión de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5)) no tiene necesariamente que ser la causa proximal de la enfermedad, estado o condición: más bien, se contempla que las enfermedades, estados o condiciones mediadas por CDK5, incluyen aquellas que tienen etiologías multifactoriales y progresiones complejas en las que CDK5 sólo está parcialmente involucrada. En los casos donde se aplica el término al tratamiento, profilaxis o intervención (por ejemplo, en los "tratamientos mediados por CDK5" de la invención), el papel desempeñado por CDK5 puede ser directo o indirectamente, y puede ser necesario y/o suficiente para el funcionamiento del tratamiento, profilaxis o resultado de la intervención.

El término "intervención" es un término de la materia usado en la presente para definir cualquier agencia que produce un cambio fisiológico en cualquier nivel. Así, la intervención puede comprender la inducción o represión de cualquier proceso fisiológico, evento, vía bioquímica o evento celular/bioquímico. Las intervenciones de la invención típicamente producen (o contribuyen a) la terapia, tratamiento o profilaxis de una enfermedad o condición.

Como se usa en la presente, el término "combinación" como se aplica a dos o más compuestos y/o agentes (referido además en la presente como los *componentes*), pretende definir el material en el que dos o más que compuestos/agentes se asocian. Los términos "combinado" y "combinar" en este contexto son interpretados en consecuencia.

La asociación de dos o más compuestos/agentes en una combinación puede ser física o no física. Los ejemplos de compuestos/agentes combinados físicamente asociados incluyen:

- composiciones (por ejemplo formulaciones unitarias) que comprenden dos o más compuestos/agentes en la mezcla (por ejemplo dentro de la misma dosis unitaria);
- 5 • composiciones que comprenden el material en el que dos o más compuestos/agentes están químicamente/físicamente vinculados (por ejemplo por entrecruzamiento, aglomeración molecular o unión a una porción de vehículo común);
- composiciones que comprenden material en el que dos o más compuestos/agentes están químicamente/físicamente co-empaquetados (por ejemplo, partículas dispuestas en o dentro de vesículas lipídicas (por ejemplo micro- o nanopartículas) o emulsión en gotas);
- 10 • kits farmacéuticos, paquetes farmacéuticos o paquetes para el paciente en el que dos o más compuestos/agentes están co-empaquetados o co-presentados (por ejemplo, como parte de una matriz de dosis unitarias);

Los ejemplos de compuestos/agentes combinados no-físicamente asociados incluyen:

- material (por ejemplo una formulación no-unitaria) que comprende al menos uno de dos o más compuestos/agentes juntos con las instrucciones para la asociación extemporánea de al menos un compuesto para formar una asociación física de dos o más compuestos/agentes;
- 15 • material (por ejemplo una formulación no-unitaria) que comprende al menos uno de dos o más compuestos/agentes juntos con las instrucciones para la terapia de combinación con dos o más compuestos/agentes;
- material que comprende al menos uno de dos o más compuestos/agentes juntos con las instrucciones para la administración de una población de pacientes en la que el otro(s) de dos o más compuestos/agentes ha sido (o está siendo) administrado;
- 20 • material que comprenden al menos uno de dos o más compuestos/agentes en una cantidad o en una forma específicamente adaptada para su uso en conjunto con el otro(s) de dos o más compuestos/agentes.

25 Como se usa en la presente, el término "en conjunto" puede referirse a los compuestos/agentes que se administran como parte del mismo régimen de tratamiento completo. Como tal, la dosificación de cada uno de dos o más compuestos/agentes puede diferir: cada uno se puede administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes. Por lo tanto, se apreciará que los compuestos/agentes de la combinación se pueden administrar de forma secuencial (por ejemplo, antes o después) o simultáneamente, ya sea en la misma formulación farmacéutica (es decir, juntos), o en diferentes formulaciones farmacéuticas (es decir, por separado). Simultáneamente en la misma formulación es como una formulación unitaria mientras que simultáneamente en diferentes formulaciones farmacéuticas no es unitaria.

30 Las dosificaciones de cada uno de dos o más compuestos/agentes en una terapia de combinación puede diferir además de la vía de administración.

35 Como se usa en la presente, el término "kit farmacéutico" define una matriz de uno o más dosis unitarias de una composición farmacéutica junto con los medios de dosificación (por ejemplo dispositivo de medición) y/o medios de suministro (por ejemplo inhalador o jeringa), opcionalmente todos contenidos en el embalaje común externo. En los kits farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no-unitarias. La(s) dosis unitaria(s) puede estar contenida dentro de un empaque plástico transparente. El kit farmacéutico puede comprender además opcionalmente las instrucciones para el uso.

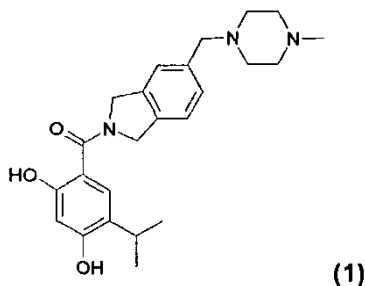
40 Como se usa en la presente, el término "paquete farmacéutico" define una matriz de una o más dosis unitarias de una composición farmacéutica, opcionalmente contenidas dentro de un paquete común externo. En los paquetes farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no-unitarias. La(s) dosis unitaria(s) puede estar contenida dentro de un empaque plástico transparente. El paquete farmacéutico puede comprender además opcionalmente las instrucciones para el uso.

45 Como se usa en la presente, el término "paquete para el paciente" define un paquete, recetado a un paciente, que contiene las composiciones farmacéuticas para el curso completo de tratamiento. Los paquetes para pacientes contienen usualmente uno o más empaque(s) plástico transparente. Los paquetes para el paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, donde un farmacéutico divide un suministro del paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en la que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete para el paciente, normalmente ausente en las recetas del paciente. La inclusión de un prospecto ha demostrado mejorar el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico

50

Sales de adición ácidas

En un primer aspecto, la invención proporciona una sal de adición ácida de un compuesto de la fórmula (1)



5 que tiene el nombre químico (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona, en donde la sal de adición ácida es una sal formada con ácido láctico, y uno o más agentes terapéuticos diferentes.

Los términos "sal" y "sal de adición ácida" pueden usarse indistintamente en esta solicitud como los términos "sales" y "sales de adición ácida". Los términos "sal" y "sales" como se usan en la presente se refieren a las sales de adición ácidas a menos que el contexto lo indique de cualquier otra forma.

10 Las referencias al compuesto (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona y sus sales de adición ácidas incluyen dentro de su alcance todos los solvatos, tautómeros e isótopos de estos y, donde el contexto lo admita, N-óxidos y otras formas iónicas.

La sal es la sal formada con ácido láctico, es decir la sal de lactato y particularmente la sal de L-lactato.

En el estado sólido, las sales de la invención pueden ser cristalinas o amorfas o una mezcla de estas.

En una realización, las sales son amorfas.

15 En un sólido amorfo, no existe la estructura tri-dimensional que existe normalmente en una forma cristalina y las posiciones de las moléculas son esencialmente aleatorias con relación a la otra en forma amorfa, ver por ejemplo Hancock y otros J. Pharm. Sci. (1997), 86, 1).

En otra realización, las sales son sustancialmente cristalinas.

20 Las sales de la presente invención pueden ser sintetizadas como parte del compuesto original por métodos químicos convencionales tales como los métodos descritos en Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, y Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 páginas, agosto del 2002. Generalmente, tales sales pueden prepararse reaccionando la forma de base libre del compuesto de la fórmula (1) con el ácido adecuado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una sal de adición ácida de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona, el método comprende formar una solución de (2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre en un solvente (típicamente un solvente orgánico) r mezcla de solventes, y tratar la solución con un ácido para formar un precipitado de la sal de adición ácida.

30 El ácido puede añadirse como una solución en un solvente miscible que es miscible con el solvente en el que se disuelve la base libre. El solvente en el que la base libre se disuelve inicialmente puede ser uno en el que la sal de adición ácida de los mismos es insoluble. Alternativamente, el solvente en el que la base libre se disuelve inicialmente puede ser uno en el que la sal de adición ácida es al menos parcialmente soluble, un solvente diferente en el cual la sal de adición ácida es menos soluble posteriormente que se añade de modo que la sal precipita de la solución.

35 En un método alternativo para formar una sal de adición ácida, la (2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona se disuelve en un solvente que comprende un ácido volátil y opcionalmente un co-solvente, y así formar una solución de la sal de adición ácida con el ácido volátil, y la solución resultante se concentra o evapora después para aislar la sal. Un ejemplo de una sal de adición ácida que puede prepararse de esta forma es la sal de acetato.

40 La sal típicamente se precipita del solvente orgánico como es formada y por lo tanto se puede aislar por separación del sólido de la solución, por ejemplo, por filtración.

Una forma de sal se puede convertir en la base libre y opcionalmente en otra forma de sal por métodos bien conocidos por la persona experta. Por ejemplo, la base libre se puede formar pasando la solución de sal a través de una columna que contiene una fase estacionaria con amina (por ejemplo, una columna de Strata-NH₂). Alternativamente, una solución de la sal en agua se puede tratar con bicarbonato de sodio para descomponer la sal y precipitar la base libre. La base libre se puede combinar después con otro ácido por uno de los métodos descritos anteriormente o en otra parte de la presente descripción.

Las sales tales como las sales de adición ácida tienen un número de ventajas sobre la base libre correspondiente. Por ejemplo, las sales tendrán una o más de las siguientes ventajas sobre la base libre en que ellas:

- serán más solubles y por tanto serán mejores para la administración i.v. (por ejemplo, por infusión)
- tendrán mejor estabilidad (por ejemplo, vida en estante mejorada);
- tendrán mejor estabilidad térmica;
- serán menos básicas y por lo tanto mejores para la administración i.v.;
- tendrán ventajas para la producción;
- tendrán solubilidad mejorada en solución acuosa;
- tendrán mejores propiedades fisicoquímicas;
- pueden tener actividad contra el cáncer mejorada; y
- pueden tener un índice terapéutico mejorado.

Las ventajas particulares de la sal de L-lactato del compuesto de la fórmula (1) son que:

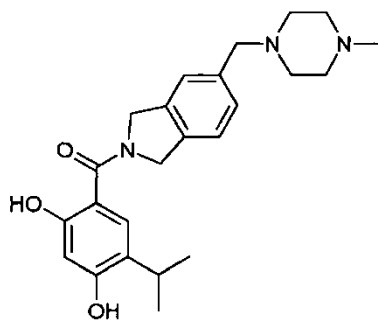
- no está hidratada y por lo tanto es más fácil de formular;
- tiene menos formas polimórficas que la base libre y otras formas de sal probadas (es decir, las sales formadas con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico);
- es no higroscópica; y
- tiene una velocidad de solubilidad mejor que la base libre y otras sales probadas.

El término "estable" o "estabilidad" como se usa en la presente incluye estabilidad química y estabilidad en estado sólido (física). El término 'estabilidad química' significa que el compuesto puede almacenarse en una forma aislada, o en la forma de una formulación en la cual este se proporciona en mezcla con por ejemplo, portadores, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables como se describe en la presente, bajo condiciones normales de almacenamiento, con poca o ninguna degradación o descomposición química' por ejemplo por un periodo de seis meses o más, más usualmente doce meses o más, por ejemplo dieciocho meses o más. 'Estabilidad en estado sólido' significa que el compuesto puede almacenarse en una forma sólida aislada, o en la forma de una formulación sólida en la cual se proporciona en mezcla con, por ejemplo, portadores, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables como se describe en la presente, bajo condiciones normales de almacenamiento, con poca o ninguna transformación en estado sólido (por ejemplo, hidratación, deshidratación, solvatación, desolvatación, cristalización, recristalización o transición de fase en estado sólido).

Los términos "no higroscópico" y "sin higroscopicidad" y los términos relacionados como se usa en la presente se refieren a sustancias que absorben menos que 5% en peso (con relación a su propio peso) de agua cuando se exponen a condiciones de alta humedad relativa, por ejemplo 90% de humedad relativa, y/o no experimentan cambios en la forma cristalina en condiciones de alta humedad y/o no absorben agua en el cuerpo del cristal (agua interna) en condiciones de alta humedad relativa.

Formas cristalinas

En otro aspecto, la invención proporciona una combinación que comprende una sal de adición ácida de un compuesto de la fórmula (1)



(1)

que es una sal de lactato en forma sustancialmente cristalina y uno o más agentes terapéuticos diferentes.

En una realización, la forma cristalina se selecciona de:

FL1: caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 16.81, y

- 5 FL2: caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 22.34.

Por "sustancialmente cristalino" se entiende que la sal de lactato de un compuesto de fórmula (1) son de 50% a 100% cristalinos, y más particularmente la sal de lactato de un compuesto de la fórmula (1) pueden ser al menos 50% cristalinos, o al menos 60% cristalinos, o al menos 70% cristalinos, o al menos 80% cristalinos, o al menos 90% cristalinos, o al menos 95% cristalinos, o al menos 98% cristalinos, o al menos 99% cristalinos, o al menos 99.5% cristalinos, o al menos 99.9% cristalinos, por ejemplo 100% cristalinos.

10

Con mayor preferencia la sal de lactato de un compuesto de la fórmula (1) son aquellas (o pueden ser seleccionados del grupo que consiste de aquellos) que son 95% a 100 % cristalinos, por ejemplo al menos 98% cristalinos, o al menos 99% cristalinos, o al menos 99.5% cristalinos, o al menos 99.6% cristalinos o al menos 99.7% cristalinos o al menos 99.8% cristalinos o al menos 99.9% cristalinos, por ejemplo 100% cristalinos.

- 15 Las formas cristalinas de la invención, en el estado sólido, pueden ser solvatadas (por ejemplo hidratadas) o no solvatadas (por ejemplo, anhidras).

En una realización, las formas cristalinas son no solvatadas (por ejemplo, anhidras).

El término "anhidro" como se usa en la presente no excluye la posibilidad de la presencia de alguna agua en o en la sal (por ejemplo, un cristal de la sal). Por ejemplo, puede haber algo de agua presente en la superficie de la sal (por ejemplo, cristal de sal), o cantidades menores dentro del cuerpo de la sal (por ejemplo, cristal). Típicamente, una forma anhidra contiene menos de 0.4 moléculas de agua por molécula de compuesto, y contiene con mayor preferencia menos de 0.1 moléculas de agua por molécula de compuesto, por ejemplo 0 moléculas de agua.

20

En otra forma realización, las formas cristalinas son solvatadas. Donde las formas cristalinas son hidratados, pueden contener, por ejemplo, hasta tres moléculas de agua de cristalización, más usualmente hasta dos moléculas de agua, por ejemplo, una molécula de agua o dos moléculas de agua. Los hidratos no estequiométricos se pueden formar además en el cual el número de moléculas de agua presente es menor que uno o de lo contrario, es un número no entero. Por ejemplo, donde hay menos de una molécula de agua presente, puede haber, por ejemplo 0.4, o 0.5, o 0.6, o 0.7, o 0.8, o 0.9 moléculas de agua presente por molécula del compuesto.

25

Otros solvatos incluyen alcoholatos tales como etanolatos e isopropanolatos.

- 30 Las formas cristalinas descritas en la presente, los cristales individuales de los mismos y sus estructuras cristalinas forman además aspectos de la invención.

Las formas cristalinas y sus estructuras cristalinas se puede caracterizar usando una serie de técnicas, que incluyen cristalografía de rayos X de un cristal sencillo, difracción de polvo de rayos X (XRPD), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía de infrarrojos, por ejemplo, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). El comportamiento de los cristales en las condiciones de humedad variable se puede analizar por los estudios de sorción gravimétrica de vapor y además por XRPD.

35

La determinación de la estructura cristalina de un compuesto puede realizarse por cristalografía de rayos X la que puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos convencionales, tales como los descritos en la presente y en Fundamentals of Crystallography, C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti y M. Catti, (International Union of Crystallography/Oxford University Press, 1992 ISBN 0-19-855578-4 (p/b), 0-19-85579-2 (h/b)). Esta técnica involucra el análisis e interpretación de la difracción de rayos X de un cristal sencillo.

40

Alternativamente, la estructura cristalina de un compuesto puede ser analizada por la técnica en estado sólido de difracción de polvo de rayos X (XRPD). La XRPD puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos convencionales tales como los descritos en la presente y en Introduction to X-ray Powder Diffraction, Ron Jenkins y Robert L. Snyder (John Wiley & Sons, Nueva York, 1996). La presencia de picos definidos (en contraposición al ruido de fondo aleatorio) en un difractograma de XRPD indica que el compuesto tiene un grado de cristalinidad.

Un patrón de polvo de rayos X del compuesto se caracteriza por el ángulo de difracción (2θ) y los parámetros de espaciado interplanar (d) de un espectro de difracción de rayos-X. Estos están relacionados por la ecuación de Bragg, $n\lambda=2d \sin \theta$, (donde $n=1$; λ =longitud de onda del cátodo usado; d =separador interplanar; y θ =ángulo de difracción). En la presente, los separadores interplanares, el ángulo de difracción y el patrón completo son importantes para la identificación del cristal en la difracción de polvo de rayos X, debido a las características de los datos. La intensidad relativa no se debe interpretar estrictamente, dado que puede variarse en función de la dirección del crecimiento del cristal, tamaños de partícula y condiciones de medición. Además, los ángulos de difracción usualmente promedian los que coinciden en el intervalo de $2\theta \pm 0.2^\circ$. Los picos promedian los picos máximos e incluyen picos no más grande que la mitad de los ángulos de difracción distintos a los indicados anteriormente.

El compuesto de la fórmula (1) y sus sales de adición ácida existen en una serie de formas cristalinas diferentes y estas se describen con más detalles a continuación y se caracterizan en los ejemplos.

Formas cristalinas de la base libre de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona (ejemplos comparativos)

Se encontró que la base libre del compuesto de la fórmula (1) existe en al menos seis formas cristalinas diferentes de las cuales tres (las formas designadas en la presente como FB1, FB2 y FB5) son inestables en el aire, y tres (las formas designadas en la presente como FB3, FB4 y FB6) son estables en el aire. Las características de las formas cristalinas de la base libre se describen en el Ejemplo 6A más abajo.

Forma FB1

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción pico ($2\theta/^\circ$) a 5.52.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) de 15.21, 16.11, 16.72, 18.21 y 20.29.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) de 9.44, 11.05, 11.99, 17.09, 19.23, 19.73, 21.09 y 26.72.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 1 en la presente.

En otro aspecto, se proporciona un método para preparar la forma cristalina FB1, el método comprende disolver (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en *n*-butanol para formar una solución saturada y después añadir di(isopropilo) éter para precipitar la forma cristalina FB1.

La forma de cristal FB1 es inestable en el aire y se convierte a la forma FB3 (ver más abajo) en la que se queda.

En consecuencia, se proporciona un método para la preparación de la forma cristalina FB3 como se define en la presente, el método comprende exponer la forma FB1 al aire por un periodo suficiente para permitir que tenga lugar la transformación a FB3.

Forma FB2

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción pico ($2\theta/^\circ$) a 5.35.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 14.68, 17.00, 18.61, 19.86 y 20.15.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 6.73, 10.40, 10.67, 18.26, 18.87, 19.24, 21.13, 21.44 y 26.86.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 2 en la presente.

Se proporciona un método para preparar la forma cristalina FB2, el método comprende disolver (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en THF para formar una solución saturada y después añadir acetato de isopropilo para precipitar la forma cristalina FB2.

5 La forma de cristal FB2 es además inestable en el aire y se convierte a la forma FB3 (ver más abajo) en la que se queda.

En consecuencia, se proporciona un método para la preparación de la forma cristalina FB3 como se define en la presente, el método comprende exponer la forma FB2 al aire por un periodo suficiente para permitir que tenga lugar la transformación a FB3.

Forma FB3

10 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta/^\circ$) pico a 6.05.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 12.15, 13.60, 15.77, 17.82, 18.89, 19.64, 20.20 y 20.93.

15 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 7.87, 9.15, 10.22, 16.62, 17.16, 22.19, 23.33 y 24.53.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 3 en la presente.

La Forma FB3 es estable en el aire a 40 °C y con 75% humedad relativa por al menos un mes y es por lo tanto adecuada para usar en composiciones farmacéuticas sólidas. En consecuencia, en otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica sólida que comprende 2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre en forma cristalina FB3 como se define en la presente.

20

Forma FB4

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta/^\circ$) pico a 6.29.

25 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 8.91, 9.96, 14.11, 16.11, 17.11, 18.48, 19.91, 21.57, 22.46, 23.59 y 24.88.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta/^\circ$) a 12.62, 17.40, 17.88, 19.33, 20.35 y 27.25.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 4 en la presente.

30 A partir de los estudios de cristalografía de rayos X, se encontró que la forma FB4 tiene una estructura cristalina que pertenece al grupo espacial tetragonal $P4_2/n$ y tiene parámetros de la red cristalina a 293 K $a=b=28.2$, $c=6.0$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. El diagrama de empaque del cristal se muestra en la Figura 5.

En consecuencia, se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-[5-(4-metilo-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre la cual es cristalina y:

(a) tiene una estructura cristalina como se expone en la Figura 5; y/o

35 (b) tiene una estructura cristalina definida por las coordenadas en la Tabla 5 en la presente; y/o

(c) tiene parámetros de la red cristalina a 293 K $a=b=28.2$, $c=6.0$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; y/o

(d) tiene una estructura cristalina que pertenece a un grupo espacial tetragonal tal como $P4_2/n$.

40 La forma cristalina FB4 es un dihidrato estable y puede usarse para la preparación de composiciones farmacéuticas sólidas. En consecuencia, se proporciona una composición farmacéutica sólida que comprende 2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre en forma cristalina FB4 como se define en la presente.

Se proporciona un método para preparar la forma cristalina FB4, el método comprende disolver (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en etanol para formar una solución saturada y después añadir di(isopropilo) éter para precipitar la forma cristalina FB4.

Forma FB5

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 7.12.

5 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 9.71, 10.14, 13.73, 16.58, 18.71, 19.46, 20.15 y 22.35.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 11.50, 14.60, 15.34, 16.94, 21.97, 23.43 y 26.36.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 6 en la presente.

10 Se proporciona un método para preparar la forma cristalina FB5, el método comprende disolver (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en isopropanol para formar una solución saturada y después añadir acetato de isopropilo para precipitar la forma cristalina FB5.

Forma FB6

15 En otra realización, la invención proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 18.66.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 9.09, 9.68, 16.08, 16.46, 16.94, 18.13, 20.05 y 22.48.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 4.60 y 26.53.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 7 en la presente.

20 Formas cristalinas de las sales formadas entre (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona y ácido clorhídrico (ejemplos comparativos)

Se encontró que las sales de ácido clorhídrico del compuesto de la fórmula (1) existen en al menos cinco formas cristalinas diferentes de las cuales una (la forma designada en la presente como FH3) es estable en el aire, y cuatro (las formas designadas en la presente como FH1, FH2, FH4 y FH5) son inestables en el aire.

25 Forma FH1

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de hidrocloreto en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 7.34.

30 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 5.59, 7.99, 10.33, 14.32, 15.29, 18.59 y 25.32.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 11.70, 13.95, 14.72, 16.37, 16.82, 19.99, 20.40, 20.82, 21.26, 22.57, 23.01, 24.60, 25.82, 27.10, 28.27 y 28.78.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 8 en la presente.

35 Se proporciona un método para preparar la forma cristalina FH1, el método comprende añadir acetato de etilo/HCl y metanol a la base libre de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona para dar una solución y después eliminar los solventes para dejar la sal de di-hidrocloreto.

Forma FH2

40 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de hidrocloreto en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 3.40.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 6.81, 9.03, 11.84, 15.70, 16.10, 18.13, 20.84, 23.19, 23.94, 24.78 y 25.65.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 6.04, 13.01, 13.69, 16.59, 17.17, 21.39, 21.87, 24.78, 25.97, 26.94, 27.59, 28.06 y 29.53. Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 9 en la presente.

- 5 La forma FH2 puede prepararse por precipitación de una solución de DMF saturado forma FH1 usando acetona como el anti-solvente. En consecuencia, se proporciona un método para preparar la forma cristalina FH2, el método comprende formar la solución saturada de la forma FH1 en DMF y después añadir acetona para precipitar la forma FH2.

Forma FH3

- 10 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de hidrocloreto en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 9.35.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 10.40, 10.78, 12.51, 14.78, 18.74, 19.09, 21.68, 22.32, 23.07, 24.86, 25.14 y 29.02.

- 15 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 5.83, 10.78, 11.35, 11.71, 13.35, 13.81, 14.10, 17.18, 17.65, 19.46, 20.11, 21.18, 23.71, 26.49, 27.03, 28.09, 28.70 y 29.52.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 10 en la presente.

- 20 La forma FH3 puede prepararse añadiendo HCl en dioxano a una solución etanólica de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre. En consecuencia, se proporciona un método para preparar la forma de sal de hidrocloreto FH3, el método comprende (i) disolver 2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre en etanol, (ii) añadir a esto una solución de cloruro de hidrógeno en dioxano; (iii) evaporar la mezcla resultante hasta secarla; (iv) disolver el residuo en etanol caliente: agua (9:1; 5 ml); (v) sembrar la solución y agitar la solución por un periodo de al menos dos horas (por ejemplo al menos 4 ó 6 ó 8 ó 10 ó 12 ó 14 horas), y eliminar la forma precipitada FH3.

Forma FH4

- 25 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de hidrocloreto en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 11.62.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 7.04, 11.62, 15.54, 16.68, 18.54, 20.73, 22.26, 22.94, 23.77 y 25.07.

- 30 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 9.89, 12.30, 13.27, 14.14, 16.06, 17.99, 19.24, 23.36, 24.63, 25.72, 26.91 y 27.63.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 11 en la presente.

- 35 La forma FH4 puede prepararse por precipitación a partir de la solución de DMF usando 1,4-dioxano como el anti-solvente. En consecuencia, en otro aspecto, se proporciona un método para preparar la forma cristalina FH4, el método comprende formar la solución saturada de la forma FH1 en DMF y después añadir 1,4-dioxano para precipitar la forma FH4.

Forma FH5

- 40 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de hidrocloreto en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 2.32.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 6.15, 11.79, 15.79, 20.81, 22.76 y 23.76.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 12 en la presente.

- 45 La forma FH5 puede prepararse por precipitación de una solución metanol saturada usando acetona como el anti-solvente.

Formas cristalinas de las sales formadas entre (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona y ácido L-láctico

Las sales de ácido láctico del compuesto de la fórmula (1) existen en una forma inestable (FL3) y dos formas estables (FL1 y FL2).

Forma FL1

5 En otra realización, la invención proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 16.81.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 6.53, 13.10, 14.13, 14.40, 17.22, 18.65, 19.52, 19.82, 22.33, 22.84 y 23.09.

10 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 6.18, 8.39, 11.08, 15.21, 16.21, 20.49, 20.76, 21.13, 22.02, 23.94, 25.19, 26.41, 26.95 y 27.81.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 13 en la presente.

15 La Forma FL1 puede prepararse suspendiendo la base libre (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona en una mezcla de etanol y EtOAc (por ejemplo, en una relación en volumen de 3:5); añadiendo ácido L-láctico a la mezcla (por ejemplo, en donde el ácido L-láctico está en la forma de una solución en etanol); clarificando la mezcla (por ejemplo, calentando hasta transparencia y/o filtrando cualquier resto sólido) agitando la mezcla clarificada con la siembra y extracción de la forma cristalizada FL1, por ejemplo por filtración.

Forma FL2

20 En otra realización, la invención proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 22.34.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 8.03, 10.71, 11.98, 13.13, 15.39, 16.09, 16.61, 17.26, 18.17, 18.82, 20.40, 21.01, 21.53, 22.34, 22.56, 23.71 y 27.70.

25 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 24.30, 24.65, 26.56 y 28.29.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 14 en la presente.

A partir de los estudios de cristalografía de rayos X, se encontró que la forma FL2 tiene una estructura cristalina que pertenece al grupo espacial monoclinico $P2_1$ y tiene parámetros de la red cristalina a 293 K $a=5.8$ $b=16.6$, $c=14.9$ Å, $\beta = 98^\circ$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$. El diagrama de empaque del cristal para FL2 se muestra en la Figura 15 en la presente.

30 En consecuencia, en otra realización, la invención proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona L-lactato que es cristalina y:

(a) tiene una estructura cristalina como se expone en la Figura 15; y/o

(b) tiene una estructura cristalina definida por las coordenadas en la Tabla 16 en la presente; y/o

(c) tiene parámetros de la red cristalina a 293 K $a=5.8$ $b=16.6$, $c=14.9$ Å, $\beta = 98^\circ$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$; y/o

35 (d) tiene una estructura cristalina que pertenece a un grupo espacial monoclinico tal como $P2_1$.

40 La forma cristalina FL2 es un hidrato estable que es nominalmente un trihidrato, ya que existen tres cristales, las posiciones de agua están en la unidad asimétrica pero no se encuentran 100% ocupadas a la temperatura ambiente y humedad. La forma FL2 se puede usar para la preparación de composiciones farmacéuticas sólidas. En consecuencia, en otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica sólida que comprende (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol -2-il]-metanona L-lactato en forma cristalina FL2 como se definió en la presente.

45 La forma FL2 puede prepararse por precipitación a partir de una solución metanólica saturada acuosa usando acetona como el anti-solvente. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar la forma cristalina FL2, el método comprende formar la solución saturada de la forma FL1 en metanol:agua (preferiblemente en una relación 9:1) y después añadir acetona para precipitar la forma FL2.

Forma FL3

En otra realización, la invención proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 5.53.

5 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 11.07, 13.16, 16.69, 17.17, 18.00, 18.49, 19.28, 21.05, 22.47 y 22.84.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 8.36, 13.85, 19.79, 20.34, 21.47, 21.93, 24.56, 26.28, 27.06, 27.47 y 29.11.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 16 en la presente.

10 La forma FL3 es una forma inestable que puede prepararse por precipitación a partir de una solución de THF saturada usando heptano como el anti-solvente. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar la forma cristalina FL3, el método comprende formar una solución saturada de la forma FL1 en THF y después añadir heptano para precipitar la forma FL3.

Formas cristalinas de las sales formadas entre (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona y ácido sulfúrico (ejemplos comparativos)

15 Las sales de sulfúrico existen en dos formas inestables (FS1 y FS2) y cuatro formas estables (FS3, FS4, FS5 y FS6).

Una sal 1:1 puede prepararse disolviendo (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona base libre en ácido sulfúrico y después evaporando hasta que esté seco.

Forma FS1

20 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 4.79.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 10.02, 11.28, 14.38, 15.27, 16.91, 18.29, 20.12, 21.76 y 22.32.

25 Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 10.68, 12.89, 17.64, 18.86, 19.28, 20.82, 21.21, 22.89, 23.83, 24.22, 24.42, 25.13 y 29.04. Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 17 en la presente.

La forma FS1 se puede preparar preparando una solución saturada de la sal 1:1 (ver anteriormente) en agua a temperatura ambiente y añadiendo lentamente después el acetonitrilo para precipitar la forma FS1.

30 En consecuencia, se proporciona un método para preparar la forma cristalina FS1, el método comprende formar una solución saturada de la forma de la sal 1:1 en agua y después añadir acetonitrilo para precipitar la forma FS1.

Forma FS2

35 Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 7.43.

Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 7.03, 8.67, 11.76, 13.84, 17.50 y 23.20.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 4.17, 8.09, 9.27, 9.65, 10.41, 10.98, 12.53, 14.55, 15.39, 16.24, 16.89, 18.05, 18.93, 19.47, 24.21, 25.21, 25.75, 26.62 y 27.67.

40 Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 18 en la presente.

Se proporciona un método para preparar la Forma FS2, el método comprende disolver el Compuesto (1) en H_2SO_4 concentrado y añadir acetonitrilo (por ejemplo, 4 volúmenes relativos al H_2SO_4) para precipitar la forma FS2.

Forma FS3

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 5.43.

5 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 10.30, 11.24, 14.26, 14.91, 16.41, 17.53, 18.38, 18.61, 19.01, 19.92, 21.77, 22.67, 24.23 y 25.36.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 4.81, 12.94, 13.98, 15.62, 19.38, 20.27, 20.71, 21.19, 23.79, 27.38 y 28.82.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 19 en la presente.

La Forma FS3 puede prepararse dejando que la forma FS1 se seque por 2 días al aire.

10 Forma FS4

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 7.48.

15 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 7.16, 7.97, 8.82, 9.09, 9.37, 10.45, 11.77, 14.36, 16.21, 16.99, 17.28, 17.59, 18.90, 23.13, 23.68 y 23.96.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 4.64, 8.42, 13.25, 13.54, 15.03, 17.96, 19.43, 19.83, 21.36, 24.77, 25.64, 26.19, 26.73, 27.20, 27.76 y 28.64.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 20 en la presente.

La Forma FS4 puede prepararse incubando la forma FS2 por varias semanas a 40°C y 75% RH.

20 Forma FS5

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 7.99.

25 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 7.11, 9.33, 9.57, 10.45, 11.64, 13.27, 14.28, 15.60, 16.98, 17.65, 18.01, 18.80, 23.21, 23.51, 23.92, 25.06 y 26.24.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 4.70, 14.65, 15.12, 19.32, 19.83, 21.08, 24.30, 27.28 y 28.67.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 21 en la presente.

La Forma FS5 puede prepararse dejando que la forma FS2 se seque al aire.

30 Forma FS6

Se proporciona (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de sulfato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta^\circ$) pico a 4.82.

35 Preferiblemente, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 9.98, 14.45, 15.38, 16.97, 18.18, 20.23, 20.93 y 22.29.

Con mayor preferencia, el patrón de XRPD exhibe además picos en los ángulos de difracción ($2\theta^\circ$) a 11.35, 12.92, 17.52, 19.42, 21.31, 21.66, 21.89, 22.84, 23.04, 23.94, 24.51, 25.26 y 29.18.

Con la máxima preferencia, el patrón de XRPD es sustancialmente como se muestra en la Figura 22 en la presente.

40 La Forma FS6 puede prepararse preparando una solución saturada de la sal 1:1 (ver anteriormente) en DMF y después añadir tolueno para precipitar la forma FS6.

Usos farmacéuticos de las sales de adición ácida y formas cristalinas del Compuesto (1)

En otros aspectos, la invención proporciona la combinación para usar:

- en medicina
 - como un inhibidor de Hsp90; o
 - en el tratamiento de una enfermedad o condición que comprende o surge a partir del crecimiento anormal de la célula en un mamífero; o
- 5 ● en un método para inhibir la Hsp90, el método comprende poner en contacto la Hsp90 con la combinación; o
- para usar en el tratamiento de trastornos proliferativos seleccionados de un carcinoma de vejiga, mama, colon, riñón, epidermis, hígado, pulmón, esófago, vesícula, ovario, páncreas, estómago, útero, tiroides, próstata sistema gastrointestinal, o piel; un tumor hematopoyético de linaje linfoide; a un tumor hematopoyético de linaje mieloide; cáncer folicular de tiroides; un tumor de origen mesenquimal; un tumor del sistema nervioso central o periférico; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xerodermia pigmentosa; keratoacantoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi; o
- 10 ● en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngico, protozoárico o parasítico, distinto de un estado de enfermedad o condición debido al Plasmodium falciparum; o
- 15 ● en la fabricación de un medicamento para la coadministración con un agente anti-fúngico, agente antiprotoso o agente anti-parasítico, preferiblemente un agente anti-fúngico, para prevenir, reducir o invertir el desarrollo de resistencia al agente anti-fúngico, agente antiprotoso o agente anti-parasítico; o
- en un método para prevenir o reducir el desarrollo de resistencia al agente anti-fúngico en un paciente, el método comprende administrar al paciente una combinación de un agente anti-fúngico, agente antiprotoso o agente anti-parasítico y la combinación; o
- 20 ● en la fabricación de un medicamento para usar en la reducción o eliminación del dolor en un paciente que padece de dolor; o
- en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una cualquiera o más de nocicepción, dolor somático, dolor visceral, dolor agudo, dolor crónico, hiperalgesia, alodinia, dolor post operativo, dolor debido a hipersensibilidad, dolor de cabeza, dolor inflamatorio, dolor neurológico, dolor musculoesquelético, dolor relacionado con cáncer o dolor vascular; o
- 25 ● en un método para prevenir o reducir el daño neuronal en un paciente que padece de apoplejía, el método comprende administrar al paciente una cantidad neuroprotectora efectiva de la combinación; o
- en la fabricación de un medicamento para la prevención o reducción del riesgo de apoplejía en pacientes con riesgo de apoplejía; o
- 30 ● en la profilaxis o tratamiento de una infección viral o enfermedad viral; o
- para usar en bloquear o inhibir la replicación viral en un organismo huésped; o
 - en un método para bloquear o inhibir la replicación viral en un organismo huésped, el método comprende administrar al organismo huésped la combinación; o
- 35 ● en un método para: (i) sensibilizar las células malignas a un fármaco anticancerígeno; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a un fármaco anticancerígeno; (iii) revertir la resistencia a un fármaco anticancerígeno; (iv) potenciar la actividad de un fármaco anticancerígeno; (v) retardar o prevenir la aparición de la resistencia a un fármaco anticancerígeno, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación; o
- en un método para el tratamiento de un cáncer el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación, el método se caracteriza por la ausencia de resistencia al fármaco; o
- 40 ● en un método para la profilaxis o tratamiento o alivio o reducción de la incidencia de un estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90 en un sujeto que se somete a tratamiento con un agente terapéutico, el método comprende administrar al sujeto la combinación, en donde estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90 es el desarrollo de resistencia a dicho agente terapéutico; o
- 45 ● en un método para: (i) sensibilizar las células malignas a un agente contra el cáncer ; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a un agente contra el cáncer; (iii) revertir la resistencia a un agente contra el cáncer; (iv) potenciar la actividad de un agente contra el cáncer; (v) retardar o prevenir la aparición de la resistencia a un agente

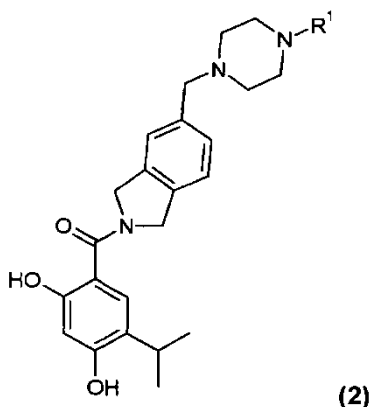
contra el cáncer, el método comprende administrar al sujeto que se somete al tratamiento con dicho agente contra el cáncer la combinación; o

- en un método para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que se somete al tratamiento con un agente contra el cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación, el método se caracteriza por la ausencia de resistencia al fármaco para el agente contra el cáncer.

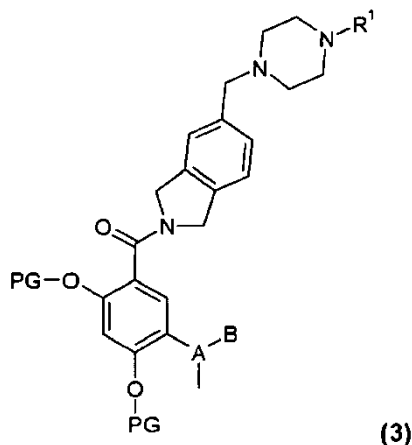
Nuevos Procesos

La solicitud también divulga nuevos procesos para preparar un compuesto de la fórmula (1), análogos de estos, y sus sales de adición ácidas (por ejemplo una sal de L-lactato) y además nuevos procesos para preparar productos intermedios claves en la síntesis del compuesto de la fórmula (1).

- 10 En consecuencia, en otro aspecto, la invención divulga un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (2):



en donde R¹ es C₁₋₄ alquilo; el proceso comprende someter a hidrogenación catalítica un compuesto de la fórmula (3):



- 15 en donde PG es un grupo protector removible bajo las condiciones de hidrogenación y A-B es CH-CH₃ o C=CH₂ y, cuando el producto del proceso es una base libre, después de eso opcionalmente convertir el compuesto de la fórmula (2) en una sal de adición ácida (por ejemplo una sal de L-lactato).

El grupo protector PG es preferiblemente un grupo bencilo.

- 20 La porción A-B puede ser CH-CH₃ o C=CH₂.

En una realización, la porción A-B es C=CH₂.

En otra realización, la porción A-B es CH-CH₃.

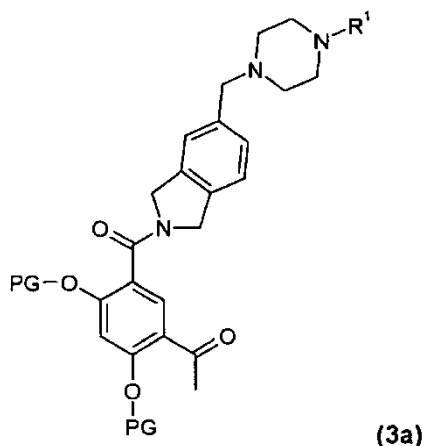
La hidrogenación catalítica se realiza típicamente usando un catalizador de paladio, por ejemplo, paladio sobre carbono (paladio en carbón).

El proceso anterior puede usarse para preparar un compuesto de fórmula (1) o sus homólogos etilo, propilo y butilo. Preferiblemente el proceso se usa para preparar los compuestos en donde R¹ es metilo o etilo.

En una realización, R¹ es metilo, es decir el proceso se usa para preparar el compuesto de la fórmula (1).

En otra realización, R¹ es etilo.

- 5 Los compuestos de la fórmula (3) pueden prepararse por la reacción de un compuesto de la fórmula (3a):



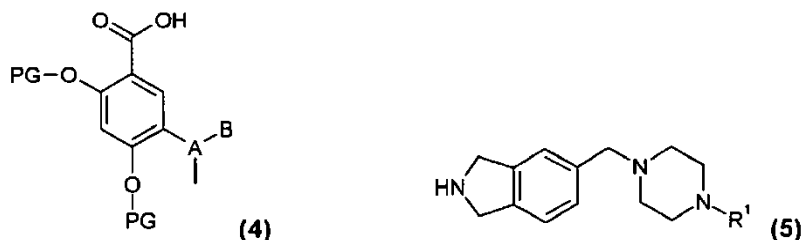
- 10 con un reactivo de Wittig u otro reactivo adecuado para convertir el grupo -C(=O)-CH_3 en un grupo $\text{-C(=CH}_2\text{)-CH}_3$. Por ejemplo, el compuesto de acetofenona (3a) puede reaccionar con el reactivo de Wittig MePPh_3Br en presencia de una base tal como butil litio o terc-butóxido de potasio en THF para dar un compuesto de la fórmula (3) en donde A-B es C=CH_2 .

Así, en otro aspecto, la invención divulga un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (3) como se define en la presente, el proceso comprende la reacción de un compuesto de la fórmula (3a) como se definió anteriormente con un reactivo de Wittig u otro reactivo adecuado para convertir el grupo -C(=O)-CH_3 en un grupo $\text{-C(=CH}_2\text{)-CH}_3$.

- 15 Como alternativa, y con mayor preferencia, los compuestos de la fórmula (3) pueden prepararse por la reacción de un ácido benzoico sustituido de la fórmula (4) más abajo, o una forma activada o derivado del mismo, con un isoindolina de la fórmula (5) más abajo.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención divulga un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (3) como se define en la presente, el proceso comprende:

- 20 (a-i) la reacción de un compuesto de la fórmula (4), o una forma activada o derivado del mismo con un compuesto de la fórmula (5):



bajo condiciones de formación de amida.

- 25 La invención divulga además un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (2) como se define en la presente, el proceso comprende:

(a-i) la reacción de un compuesto de la fórmula (4) como se define en la presente, o una forma activada o derivado del mismo con un compuesto de la fórmula (5) como se define en la presente, bajo condiciones de formación de amida para dar un compuesto de la fórmula (3); y

(b) someter el compuesto de la fórmula (3) a hidrogenación catalítica para eliminar los grupos protectores PG y, cuando A-B es C=CH₂, reducir el grupo A-B a un grupo isopropilo y, cuando el producto del proceso es una base libre, después de eso opcionalmente convertir el compuesto de la fórmula (2) en una sal de adición ácida (por ejemplo una sal de L-lactato).

5

Antes de reaccionar ácido benzoico (4) con la isoindolina (5), el ácido benzoico puede convertirse primero en un cloruro ácido por tratamiento con cloruro de tionilo, o por la reacción con cloruro de oxalilo en presencia de una cantidad catalítica de dimetil formamida, o por la reacción de una sal de potasio del ácido con cloruro de oxalilo. El cloruro ácido puede reaccionar después con la isoindolina (5) en presencia de una base no interferente tal como trietilamina. La reacción puede llevarse a cabo a alrededor de la temperatura ambiente en un solvente polar tal como dioxano.

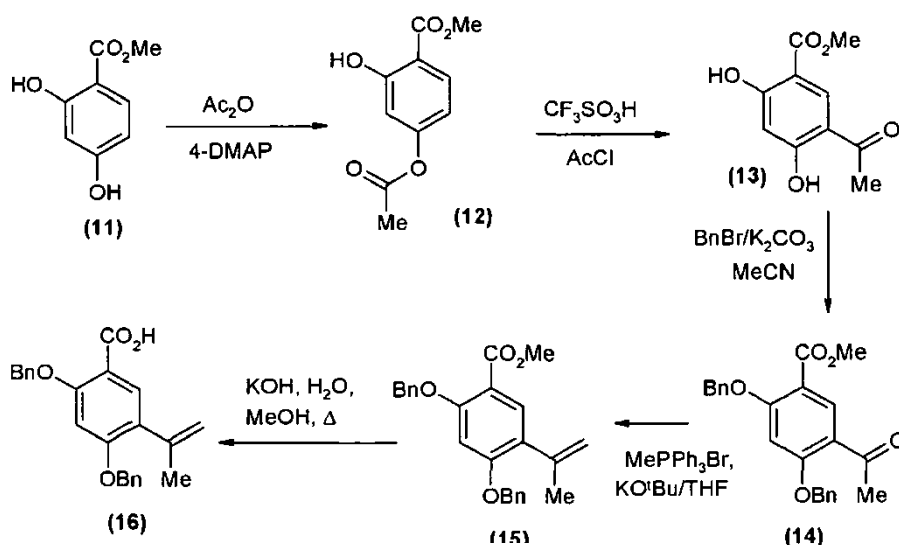
Como una alternativa para usar el método del cloruro ácido descrito anteriormente, el ácido benzoico (4) puede reaccionar con la isoindolina (5) en presencia de reactivos de acoplamiento amida del tipo usado comúnmente en la formación de enlaces amida o péptido. Los ejemplos de tales reactivos incluyen 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sheehan y otros, J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, 1067), 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida (referidos en la presente como EDC o EDAC pero también conocidos en la materia como EDCI y WSCDI) (Sheehan y otros, J. Org. Chem., 1961, 26, 2525), agentes de acoplamiento basados en uronio tales como *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) y agentes de acoplamiento basados en fosfonio tal como 1-benzo-triazoliloxitris-(pirrolidino)fosfonio hexafluorofosfato (PyBOP) (Castro y otros, Tetrahedron Letters, 1990, 31, 205). Los agentes de acoplamiento basados en carbodiimida son usados de manera favorable en conjunto con 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) (L. A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc., 1993, 115, 4397) o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Konig y otros, Chem. Ber., 103, 708, 2024-2034). Los reactivos de acoplamiento preferidos incluyen EDC (EDAC) y DCC en conjunto con HOAt o HOBt.

Un reactivo de acoplamiento particular comprende EDC en conjunto con HOBt.

25 Un agente de acoplamiento preferido es 1,1'-carbonildiimidazol (CDI).

La reacción de acoplamiento se realiza típicamente en un solvente no acuoso, no prótico tal como, acetonitrilo, dioxano, dimetilsulfóxido, diclorometano, dimetilformamida o *N*-metilpirrolidina, o en un solvente acuoso opcionalmente junto con uno o más co-solventes miscibles. La reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente. La reacción puede llevarse a cabo en presencia de una base no interferente, por ejemplo, una amina terciaria tal como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina.

Los compuestos de la fórmula (4) en donde A-B es C=CH₂ pueden prepararse por la secuencia de reacciones mostradas en el Esquema 1.



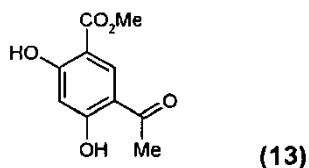
ESQUEMA 1

El material de partida para el Esquema 1 es metil éster del ácido 2,4-dihidroxibenzoico (11) el cual es monoacetilado por la reacción con anhídrido acético en presencia de N,N-dimetilo-4-aminopiridina para dar el di-éster (12). La conversión del di-éster (12) a la acetofenona sustituida (13) se logra reaccionando el compuesto (12) con ácido trifluorometanosulfónico y opcionalmente cloruro de acetilo para dar la acetofenona (13). La acetofenona (13) se trata con bromuro de bencilo en presencia de una base tal como carbonato potásico para dar el compuesto de dibencilo (14) el cual reacciona después con el reactivo de Wittig MePPh₃Br en presencia de una base tal como butil litio o terc-butóxido de potasio en THF para dar el compuesto de isopropenil (15). La hidrólisis del éster al ácido carboxílico (16) es típicamente llevada a cabo por tratamiento con un hidróxido de metales alcalinos acuoso tal como hidróxido de sodio potasio. La reacción de hidrólisis puede llevarse a cabo usando un cosolvente orgánico tal como un alcohol (por ejemplo, metanol) y la mezcla de reacción se calienta típicamente a una temperatura no extrema, por ejemplo, hasta aproximadamente 50-90°C.

Los compuestos de la fórmula (4) donde A-B es CH-CH₃ pueden prepararse como se describe en el Esquema 1 excepto que el compuesto de isopropenil (15) se reduce al compuesto isopropilo correspondiente por hidrogenación catalítica, y el compuesto dihidroxi resultante es después re-bencilado por reacción con bromuro de bencilo en presencia de una base como se describió anteriormente.

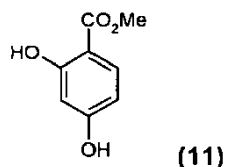
La secuencia de reacción ilustrada en el Esquema 1 anteriormente da lugar a rendimientos que son significativamente mejores que los rendimientos en las etapas correspondientes en el Esquema 4 de PCT/GB2006/001382 y hacen uso de los reactivos y condiciones que son más adecuadas para la síntesis a escala de fabricación. Además, y lo más importante desde la perspectiva de síntesis a gran escala, la secuencia de reacción mostrada en el Esquema 1 evita la necesidad de purificación cromatográfica.

En consecuencia, la invención divulga un proceso ("Proceso Intermedio A") para la preparación de un compuesto de la fórmula (13):



cuyo proceso comprende:

(i) la reacción de un compuesto de la Fórmula (11):

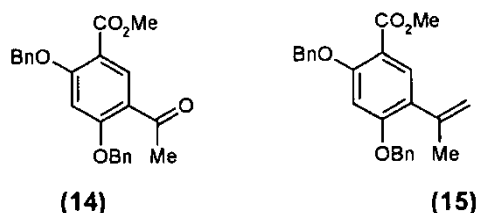


con (a) anhídrido acético en presencia de 4-dimetilaminopiridina (típicamente con calor, por ejemplo, a una temperatura de hasta aproximadamente 60 °), seguido por (b) ácido trifluorometanosulfónico y opcionalmente cloruro de acetilo (típicamente a temperatura ambiente); o

(ii) la reacción de un compuesto de la fórmula (11) con cloruro de acetilo en presencia de una resina de intercambio de iones catiónicos tal como la resina Amberlyst™ 15.

El Proceso Intermedio A da rendimientos del compuesto (13) que son mejores que los rendimientos descritos para el proceso correspondiente en PCT/GB2006/001382.

La invención divulga además un proceso ("Proceso Intermedio B") para la preparación de un compuesto de la fórmula (15):

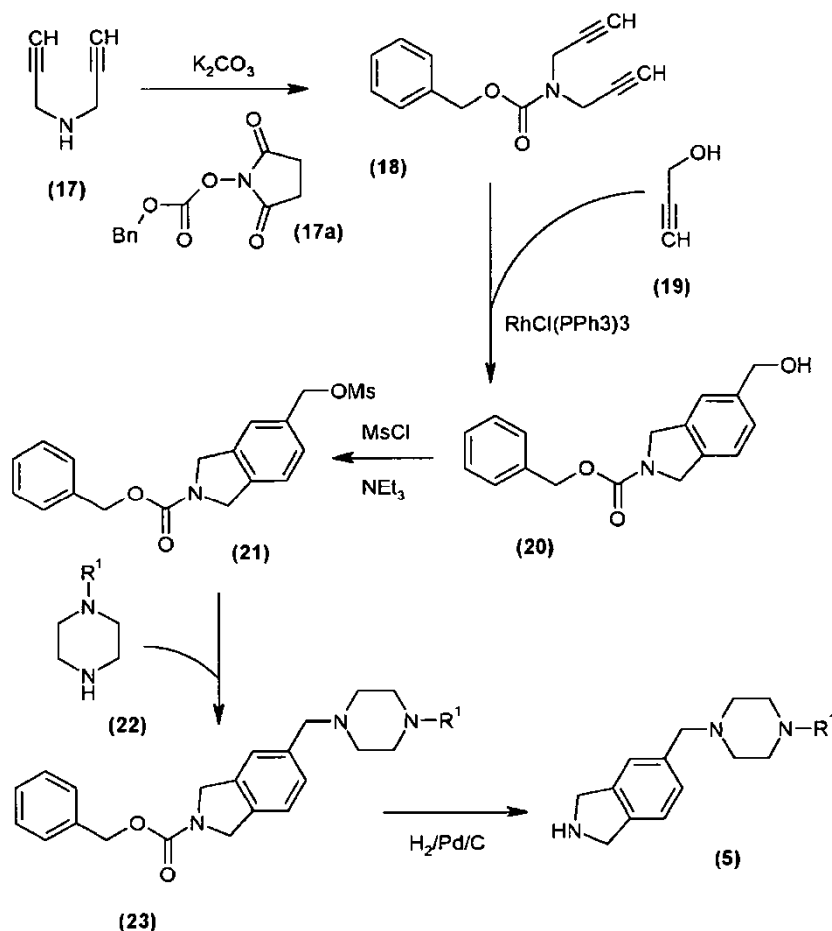


reaccionando un compuesto de la fórmula (14) con un reactivo de Wittig MePPh_3Br en presencia de terc-butóxido de potasio en THF.

- 5 El Proceso Intermedio B da un rendimiento significativamente mejor del producto que el rendimiento descrito para la etapa del proceso correspondiente en PCT/GB2006/001382 donde n-butil litio se usa como la base en la reacción de Wittig. Adicionalmente, la base de terc-butóxido de potasio es más adecuada para un proceso a escala de fabricación que el n-butil litio y la reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o solamente con enfriamiento moderado mientras que el uso de n-butil litio típicamente requiere que la mezcla de reacción se enfríe a temperaturas de 0°C o inferior. La purificación cromatográfica no es requerida.

- 10 En un aspecto adicional, la invención divulga un proceso para fabricar un compuesto de la fórmula (16) como se define en la presente, el proceso comprende el Proceso Intermedio B seguido por la hidrólisis del grupo metil éster en el compuesto (15) usando un hidróxido de metales alcalinos tal como hidróxido potásico para dar el compuesto de la fórmula (16).

Los compuestos de isoindolina (5) pueden prepararse por la vía sintética ilustrada en el Esquema 2.

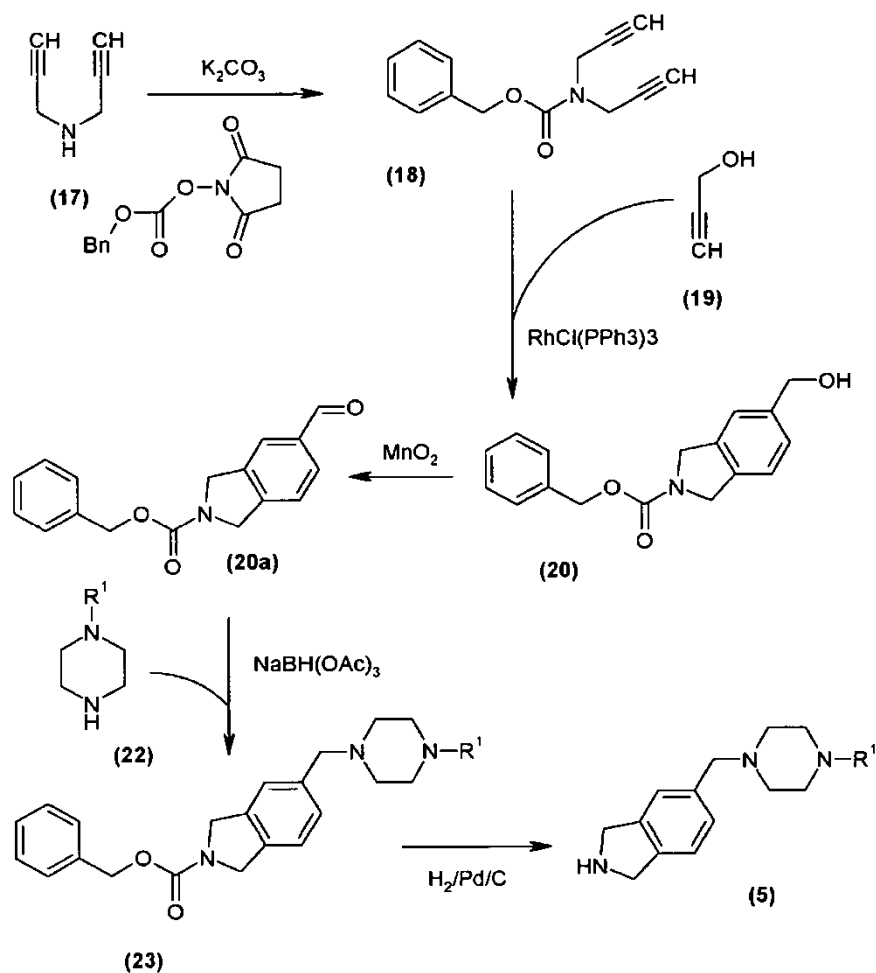


Esquema 2

- 15 En el Esquema 2, la dipropargilamina (17) reacciona con N-(benciloxicarboniloxi) succinimida (17a) en acetato de etilo en presencia de carbonato potásico para dar la dipropargilamina Z-protegida (18) (el término "Z" se refiere a un grupo benciloxicarbonilo). Como alternativa a la N-(benciloxicarboniloxi) succinimida, se puede usar cloroformiato de bencilo para introducir el grupo protector benciloxicarbonilo. El compuesto (18) reacciona después con alcohol propargílico (19) en presencia del catalizador de Wilkinson en una reacción de cicloadición 2+2+2 para dar la isoindolina Z-protegida (20). El grupo hidroximetilo en la isoindolina (20) se convierte después a un grupo mesiloxi por reacción con cloruro de metansulfonil en un solvente polar tal como THF en presencia de una base no interferente como trietilamina para dar el compuesto de mesilo (21). El compuesto de mesilo (21) reacciona con alquilpiperazina (22) en solución de acetona para dar la isoindolina Z-protegida (23). La eliminación del grupo
- 20

benciloxycarbonilo para dar el compuesto de isoindolina no protegido (5) se realiza después por hidrogenación sobre un catalizador de paladio sobre carbón.

Una variación en la secuencia de reacción mostrada en el Esquema 2 se ilustra en el Esquema 2a.



Esquema 2a

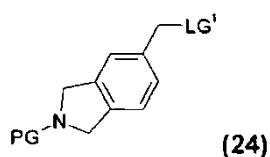
5

10

En el Esquema 2a, en lugar de convertirse al mesilato (21), la hidroximetilindolina (20) se oxida al aldehído correspondiente (21a) usando dióxido de manganeso en diclorometano, y el aldehído se convierte después a un compuesto de la fórmula (23) por la reacción con un compuesto de la fórmula (22) bajo condiciones de aminación reductora, por ejemplo en presencia de triacetoxiborohidruro de sodio. El grupo Z se elimina después por hidrogenación como se describió anteriormente con respecto al Esquema 2 para dar el intermedio (5).

En consecuencia, en otro aspecto, la invención divulga un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (5) como se define en la presente, el proceso comprende:

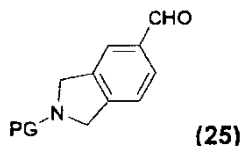
(i) la reacción de un compuesto de la Fórmula (24):



15

en donde PG es un grupo protector (tal como benciloxicarbonilo) y LG¹ es un grupo saliente (tal como mesiloxi), con un compuesto de la fórmula (22) como se define en la presente; o

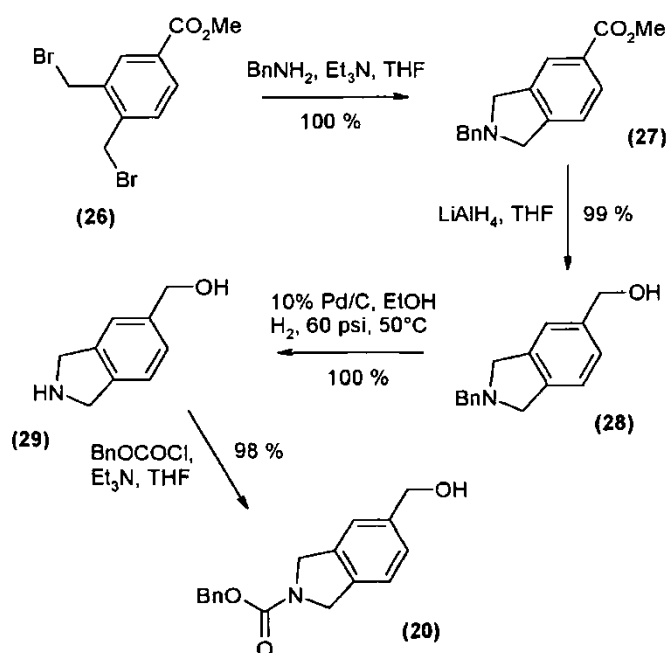
(ii) la reacción de un compuesto de la fórmula (25):



5 en donde PG es un grupo protector (tal como benciloxicarbonilo), con un compuesto de la fórmula (22) como se define en la presente bajo condiciones de aminación reductora (por ejemplo, en presencia de triacetoxiborohidruro de sodio;

y después de eso eliminando el grupo protector PG, por ejemplo por hidrogenación cuando PG es un grupo benciloxicarbonilo.

10 En los Esquemas 2 y 2a, el intermedio (20) se prepara por instrumentos de una reacción de cicloadición 2+2+2 en presencia de un catalizador de metal de transición. Como alternativa a la reacción de cicloadición 2+2+2, el intermedio (20) puede prepararse por la secuencia de reacciones mostradas en el Esquema 3.



Esquema 3

15 En el Esquema 3, el éster del ácido bis-bromometil benzoico (26) reacciona con bencilamina en un solvente aprótico polar tal como tetrahidrofurano (THF) en presencia de una base no interferente tal como trietilamina para dar el intermedio N-bencilo dihidroisoindol (27). El grupo éster en el intermedio (27) se reduce después al alcohol correspondiente usando hidruro de litio aluminio en THF para dar el hidroximetildihidroisoindol intermedio (28). La desbencilación del hidroximetildihidroisoindol intermedio (28) se realiza después por hidrogenación en catalizador de paladio sobre carbón en un solvente alcohol (por ejemplo, etanol) a una temperatura moderadamente elevada (por ejemplo, hasta aproximadamente 50 °) para dar el intermedio (29). El intermedio (29) se convierte después al intermedio (20) por reacción con un reactivo adecuado para introducir un grupo benciloxicarbonilo ("Z") en el átomo de nitrógeno del anillo de dihidroisoindol. Por ejemplo, el intermedio (29) puede reaccionar con cloroformiato de bencilo en un solvente no prótico polar tal como THF en presencia de una base no interferente tal como trietilamina para dar el intermedio (20).

20

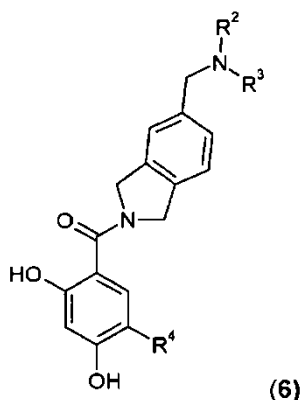
25

Una ventaja sustancial de las vías sintéticas mostradas en los Esquemas 2, 2a y 3 es que los diversos productos intermedios formados a lo largo de la vía tienen excelentes propiedades físico-químicas que son altamente beneficiosas en la síntesis a gran escala. Así, cuando se combina con la secuencia de las etapas en el Esquema 1,

el resultado es una vía sintética que tiene ventajas significativas sobre las vías sintéticas correspondientes en nuestra solicitud anterior PCT/GB2006/001382. Particularmente, las principales ventajas incluyen:

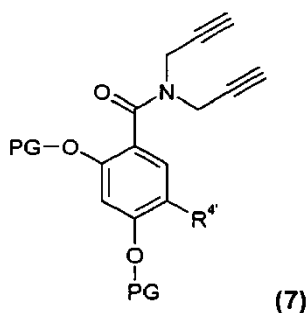
- rendimientos superiores
 - purificación más fácil (no se requiere purificación cromatográfica)
- 5 ■ propiedades fisicoquímicas mejoradas de los productos intermedios lo que conduce a una manipulación más fácil
- más fácil de extrapolar a un proceso de fabricación

En otro aspecto, la invención divulga un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (6):



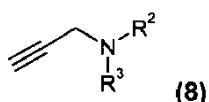
- 10 en donde R^2 y R^3 son iguales o diferentes y cada uno es C_{1-4} alquilo o NR^2R^3 forma un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de O, N y S y opcionalmente sustituido por uno o dos grupos C_{1-4} alquilo; y R^4 se selecciona de grupos hidrógeno, halógeno, C_{1-5} alquilo y C_{3-4} cicloalquilo; el proceso comprende:

(a-ii) la reacción de un compuesto de la fórmula (7):

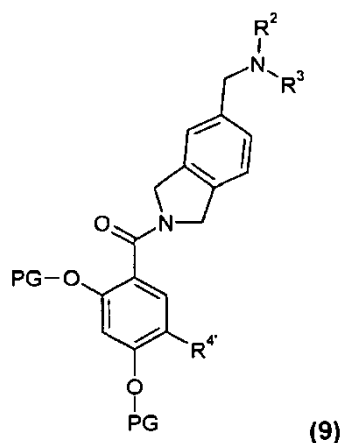


- 15 en donde PG es un grupo protector removible bajo condiciones de hidrogenación y R^4 se selecciona de grupos hidrógeno, halógeno, C_{1-5} alquilo, C_{2-5} alqueno y C_{3-4} cicloalquilo ;

con un compuesto de la Fórmula (8):



- 20 en presencia de un catalizador de metal de transición para dar un compuesto de la fórmula (9);



y

(b) someter el compuesto de la fórmula (9) a hidrogenación catalítica para eliminar los grupos protectores PG y, cuando R^{4'} es C₂₋₅ alquenoilo, reducir el grupo R^{4'} a C₂₋₅ alquilo;

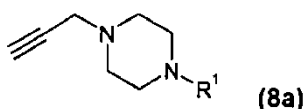
- 5 y después de eso, donde el compuesto de la fórmula (6) se prepara en forma de una base libre, opcionalmente convertir la base libre en una sal de adición ácida.

La invención divulga además un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (9) como se define en la presente, el proceso comprende:

- 10 (a-ii) la reacción de un compuesto de la fórmula (7) como se define en la presente, con un compuesto de la fórmula (8) como se define en la presente, en presencia de un catalizador de metal de transición.

- 15 La reacción del compuesto de la fórmula (7) con el compuesto de la fórmula (8) es un ejemplo de una cicloadición 2+2+2 (ver la revisión de C. P. Dell, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1998, 3873-3905 y las referencias en la misma). La reacción se lleva a cabo típicamente en un solvente inerte tal como tolueno, con calentamiento (por ejemplo a una temperatura en el intervalo de temperatura ambiente a 100 °C) en presencia de un catalizador de metal de transición. Un catalizador preferido es el catalizador de Wilkinson - clorotris (trifenilfosfina) rodio (RhCl(PPh₃)₃).

En una realización particular, el compuesto de la fórmula (8) es un compuesto de la fórmula (8a):



en donde R¹ es como se define en la presente, y preferiblemente es metilo o etilo.

- 20 El compuesto de la fórmula (8a) puede prepararse reaccionando bromuro de propargilo con un compuesto de la fórmula (22) (ver Esquema 2) en un solvente polar tal como acetona en presencia de una base como carbonato potásico.

En una realización, R¹ es metilo, es decir el proceso se usa para preparar el compuesto de la fórmula (1).

En otra realización, R¹ es etilo.

- 25 En las fórmulas (7) y (9), R^{4'} se selecciona de los grupos hidrógeno, halógeno, C₁₋₅ alquilo, C₂₋₅ alquenoilo y C₃₋₄ cicloalquilo. En una realización preferida, R^{4'} es isopropilo o isopropenilo, y más particularmente es isopropenilo.

Actividad biológica y Usos Terapéuticos

- 30 La sal de lactato del compuesto de fórmula (1) es un inhibidor de Hsp90 y por consiguiente será beneficioso en el tratamiento de un amplio espectro de trastornos proliferativos cuando se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. Los ejemplos de tales trastornos proliferativos no se limitan a, pero pueden seleccionarse de un carcinoma, por ejemplo, un carcinoma de la vejiga, mama, colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), riñón, epidermis, hígado, pulmón, por ejemplo,

adenocarcinoma, cáncer de células pequeñas de pulmón y carcinomas de células no-pequeñas de pulmón, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino, estómago, útero, tiroide, próstata, sistema gastrointestinal, por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal, o piel, por ejemplo, carcinoma de células escamosas; un tumor hematopoyético de linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B (tales como linfoma difuso de células B grandes), linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no-Hodgkin, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkett; un tumor hematopoyético de linaje mielóide por ejemplo leucemias mielógenas crónicas y agudas, leucemias mielógenas crónicas refractarias y sensible a Imatinib, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple refractario y sensible a Bortezomib, enfermedad mieloproliferativa o leucemia promielocítica; cáncer folicular tiroide; un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo, fibrosarcoma o rhabdomiosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentoso; queratoacantoma; cáncer folicular de tiroide; o sarcoma de Kaposi. Un ejemplo adicional de un tumor de origen mesenquimal es el sarcoma de Ewing.

Los cánceres pueden ser cánceres que son sensibles a la inhibición de la Hsp90, y dichos cánceres pueden determinarse por un método tal como se establece en la sección de encabezamiento "Métodos de Diagnóstico".

Un grupo de cánceres incluye los cánceres humanos de mama (por ejemplo, tumores primarios de mama, cáncer de mama de ganglios negativos, adenocarcinomas invasivos de conductos de la mama, cánceres de mama no endometrioides) y linfomas de células del manto. Además, otros cánceres son los cánceres colorrectal y endometrial.

Otro subconjunto de cánceres incluye tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto y linfoma de células B (tales como linfoma difuso de células B grandes) y opcionalmente incluye además leucemia mielógena crónica y mieloma múltiple.

Un subconjunto preferido de cánceres consiste de cáncer de mama positivo a ErbB2, próstata, pulmón y gástrico; leucemia mielóide crónica; cáncer de próstata dependiente de receptor de andrógenos; leucemia mielóide aguda dependiente de Flt3; melanoma asociado con la mutación Braf; mieloma múltiple; mieloma múltiple refractario a velcade; y tumores del estroma gastrointestinal (GIST).

De estos, los cánceres particularmente preferidos son los tipos de mielomas múltiples y tumor refractario a velcade como se define en la presente.

Otro subconjunto de cánceres preferidos consiste de cáncer de próstata refractario a hormona, melanoma metastásico, cáncer de mama HER2 positivo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas mutante EGFR positivo y tumores del estroma gastrointestinal resistentes a Gleevec.

Las combinaciones que incluyen compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente, el L-lactato) y formas cristalinas de estos podrían usarse además para tratar otras condiciones tales como infecciones virales, enfermedades parasíticas, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple y lupus eritematoso), trastornos neurodegenerativos (por ejemplo enfermedad de Alzheimer), inflamación, diabetes Tipo I y II, aterosclerosis y enfermedad cardíaca.

Las combinaciones que incluyen compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalinas de este podrían tener además beneficio clínico en trasplantes e inmunosupresión.

Las combinaciones que incluyen compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalinas de este tienen beneficio clínico en las enfermedades descritas previamente cuando se usan en combinación con agentes terapéuticos existentes o nuevos.

Basado en las actividades de las proteínas cliente de Hsp90 y evidencia experimental, los siguientes trastornos pueden ser particularmente sensibles al tratamiento con combinaciones que incluyen los compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalinas de este.

Cáncer de mama, próstata, pulmón, y gástrico positivo a ErbB2

La sobreexpresión de ErbB2 (HER-2) se produce en aproximadamente 30% de los cánceres de mama y la regulación negativa del receptor de ErbB2 por herceptin sensibilizó las células al Taxol. La sobreexpresión de ErbB2 se vincula con un mal pronóstico y resistencia a fármacos (Tsubawa y otros, 1993. *Oncology* 1993; 50: 418).

Mutante EGFR en cáncer de pulmón

Las mutaciones somáticas en el dominio quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que incluye las supresiones L858R y exón 19, subyacen en la capacidad de respuesta a gefitinib y erlotinib en el cáncer

de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La resistencia adquirida a los inhibidores de la tirosina quinasa está en algunos casos mediada por una segunda mutación, T790M. Los antibióticos de ansamicina, tal como geldanamicina, inhiben potentemente la proteína 90 de choque térmico (Hsp90), promoviendo la degradación mediada por ubiquitina de quinasas oncogénicas que requieren de la chaperona para el plegamiento conformacional adecuado. La exposición de líneas celulares EGFR-mutantes a geldanamicina indujo una marcada reducción de fosfo-Akt y ciclina D1, así como apoptosis. Estos datos sugieren que la activación mutacional de EGFR está asociada con la dependencia de Hsp90 para la estabilidad y la inhibición de Hsp90 puede representar una nueva estrategia para el tratamiento de NSCLC EGFR-mutante.

5

Leucemia mieloide crónica

La proteína aberrante BCR-Abl se forma a través de una translocación cromosómica y los resultados en un dominio de Abl quinasa constitutivamente activo. Este evento de translocación mostró ser causal para CML. P210BcrAbl es una proteína cliente conocida para Hsp90. El tratamiento de la línea de células K562 para BCR-Abl con inhibidor de hsp90 indujo apoptosis. El inhibidor Gleevec de Bcr-Abl[®] induce además apoptosis en células K562; sin embargo las células K562 resistentes a Gleevec[®] mantienen aún sensibilidad hacia los inhibidores de la Hsp90 (Gorre y otros 2002, Blood 100: 3041-3044).

15

Cáncer de próstata dependiente del receptor de andrógeno

La quinasa receptor de andrógeno es una proteína cliente de la Hsp90. La terapia de reemplazo de hormona se adopta generalmente cuando la cirugía no resuelve el cáncer. El cáncer puede volverse refractario a la manipulación de la hormona a través de mutación del receptor. La regulación de la Hsp90 puede ser viable aún después de la mutación.

20

Lo mismo puede aplicarse a los cánceres de mama dependientes de estrógeno.

Leucemia mieloide aguda dependiente de Flt3

La duplicación interna del receptor tirosina quinasa Flt3 conduce a su activación constitutiva y oncogénesis. Estas duplicaciones internas se observan en el 20% de todos los casos informados de AML y son una indicación de mal pronóstico. Al igual que la activación de la quinasa ABL en CML, este representa otro ejemplo de una sola lesión genética que da lugar a una enfermedad maligna. Se prevé que los inhibidores de la Hsp90 sean de beneficio clínico para esos pacientes ya que Flt3 es una proteína cliente de Hsp90 (Bali y otros, 2004 Cancer Res. 64(10):3645-52).

25

Melanoma asociado con la mutación de Braf

Braf codifica para una serina/treonina quinasa que está mutada en 70% de todos los melanomas. El 80% de estos representan una sola mutación puntual de V599E que confiere elevada actividad quinasa a BRAF. Esta mutación es además transformadora en células NIH3T3 (Bignell y otros, 2002 Nature. 417(6892):949-54).

30

Mieloma múltiple

El inhibidor de Hsp90 17-AAG inhibe potentemente la proliferación de líneas celulares de mieloma múltiple refractario y sensible a bortezomib. Los niveles de superficie celular de IGF-1R y IL-6R se disminuyeron además en las células MM-1 tratadas con 17-aag (Mitsiades y otros, Blood 107:1092-1100, 2006). La estimulación autocrina de células de mieloma múltiple, así como la estimulación paracrina de las células estromales de médula ósea con IL-6 se disminuye además a través de la regulación negativa de IKK cliente de Hsp90.

35

Mieloma múltiple refractario a Velcade

Los compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de la fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalinas de este pueden usarse en el tratamiento de tipos de tumores refractarios a velcade que incluyen el tratamiento con segunda línea de pacientes de linfoma de células del manto, linfoma no-Hodgkin indolente, carcinoma Bronquioloalveolar en la etapa IIIB y IV, cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado, cánceres de mama, próstata y ovario y linfoma no Hodgkin.

40

Tumores del estroma gastrointestinal (GIST)

La enfermedad particularmente la enfermedad de GIST depende de la activación del factor de crecimiento o sobre-expresión (por ejemplo c-kit)

45

Otras condiciones o trastornos para los que un inhibidor de la Hsp90 puede ser de beneficio clínico incluyen, pero sin limitarse a:

Trastornos neurodegenerativos

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo sin tratamiento efectivo La inhibición GA de la Hsp90 y la sobre regulación de las Hsp resultante son efectivas en la prevención de la agregación de la proteína de Huntington en las células neuronales. (Sittler y otros, 2001, Human Molecular Genetics, Vol. 10, núm. 12 1307-1315). La sobre-regulación de HSP puede ser además de beneficio clínico en otras enfermedades de plegamiento erróneo de proteínas, por ejemplo, CJD y la de Alzheimer.

5 Enfermedad inflamatoria, que incluye artritis reumatoide, Asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad inflamatoria intestinal

GA mostró que disocia HSF-1 de Hsp90 conduciendo a la activación y translocación nuclear de HSF-1. Posteriormente HSF-1 actúa como un factor de transcripción para inducir HSP90 y Hsp70. La inducción de la Hsp70 implicó la resolución de la inflamación en un modelo murino de edema inducido (Ivanaro y otros, 2004 Human Molecular Genetics, 2001, Vol. 10, núm. 12 1307-1315). Además, el tratamiento con GA inhibió la activación de quinasa I κ B (IKK) por TNF- α o PMA. I κ B α es un regulador de Nf- κ B y Ap-1. (Broemer y otros 2004). AP-1 y NF- κ B es un factor de transcripción importante que conduce a la generación de citoquinas pro-inflamatorias (Yeo y otros, 2004 Biochem Biophys Res Commun. 30; 320(3):816-24). La estabilidad de los transcritos de citoquinas pro-inflamatorias se regula además a través de la inhibición de MapK p38 (Wax y otros, 2003. Rheumatism Vol. 48, No. 2, págs. 541-550).

Aterosclerosis

Se conoce que las células inflamatorias e inmunes juegan un papel central en la iniciación y progresión de la aterosclerosis humana (Riganò y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, 1107:1-10) y se ha propuesto que Hsp90 actúa como un autoantígeno en la aterosclerosis carotídea. Riganò y otros encontró anticuerpos específicos y células contra Hsp90 en el suero del 60% de los pacientes evaluados que sufrían de placas ateroscleróticas de carótida, pero no anticuerpos específicos y células T contra Hsp90 en el suero de pacientes sanos. Por lo tanto, los compuestos inhibidores de Hsp90 que son la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalinas de este deberían ser útiles en el tratamiento o prevención de la aterosclerosis.

25 Enfermedad asociada a la angiogénesis, que incluye pero sin limitarse a: angiogénesis tumoral, psoriasis, artritis reumatoide, y retinopatía diabética

La inducción de la angiogénesis es regulada por las proteínas clientes de Hsp90 eNOS y Akt en las células endoteliales (Sun y Liao, 2004 Arterioscler Thromb Vase Biol. 24(12):2238-44). La supresión del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α puede deteriorar además el crecimiento, angiogénesis y maduración del vaso de tumores gástricos en un modelo murino. (Stoeltzing y otros, 2004 J Natl Cancer Inst; 96:946-956.).

30

Diabetes tipo I y tipo II

La inhibición de la Hsp90 tiene un efecto profundo en la señalización de Akt así como los e-nos. Estos son dos reguladores principales de la apoptosis inducida de células endoteliales en la diabetes tipo I inducida por la glucosa alta (Lin y otros, 2005 J Cell Biochem. 1; 94(1):194-201) y el desarrollo de la hipertensión en la diabetes tipo II (Kobayashi y otros, 2004 Hypertension. 44(6):956-62.).

35

Inmunosupresión y trasplante

La inhibición de la Hsp90 mostró regular negativamente Lck, una tirosina quinasa específica de células T necesaria para su activación. (Yorgin y otros, 2000 J Immunol. 15; 164(6):2915-23.)

Enfermedad cardiaca

40 La isquemia cardiaca es la causa más común de muerte en el mundo occidental. Las Hsp, y sobre todo la Hsp70 (inducida por tratamiento con radicol) mostraron actividad cardioprotectora en cardiomiocitos de ratas (Griffin y otros, 2004). La inhibición de la Hsp90 resulta en la liberación de HSF-1 del complejo chaperona y su posterior activación de los genes Hsp. La inhibición de la Hsp90 conduce además a la regulación negativa de HIF-1, que está involucrado en la patogénesis de la enfermedad isquémica del corazón y accidente cerebrovascular.

45 Enfermedad infecciosa

La NS2/3 proteasa de la Hepatitis C viral es una proteína cliente de la Hsp90 y la actividad de Hsp90 es requerida para la replicación y procesamiento viral (Whitney y otros, 2001. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 20;98(24):13931-5.).

Enfermedad parasitaria

GA informó actividad antimalárica contra un ortólogo de Hsp90 de Plasmodium falciparum. El crecimiento de Plasmodium se inhibió con GA en una IC_{50} similar a la observada con cloroquina. GA fue efectiva además contra las cepas de Plasmodium falciparum resistentes a la cloroquina (Kamar y otros, 2003. Malar J.15; 2(1):30).

Inhibición, Prevención o Reversión del Desarrollo de Resistencia a los Fármacos

- 5 Como se discutió anteriormente, los moduladores o inhibidores de la función de estrés de la proteína en general (y particularmente Hsp90) representan una clase de agentes quimioterapéuticos con el potencial para (i) sensibilizar las células malignas a fármacos contra el cáncer y/o tratamientos; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a los fármacos contra el cáncer y/o tratamientos; (iii) revertir la resistencia a los fármacos contra el cáncer y/o tratamientos; (iv) potenciar la actividad de los fármacos contra el cáncer y/o tratamientos; (v) retrasar o prevenir la aparición de resistencia a los fármacos contra el cáncer y/o tratamientos.

En consecuencia, la invención proporciona además las combinaciones de la invención para usar en:

- 15 • Un método para la profilaxis o tratamiento (o alivio o reducción de la incidencia) de un estado de enfermedad o condición mediado por Hsp90, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de la invención, en donde el estado de enfermedad o condición mediado por Hsp90 es el desarrollo de resistencia a un fármaco anticancerígeno.
- Un método para: (i) sensibilizar las células malignas a un fármaco anticancerígeno, (ii) aliviar o reducir la incidencia de la resistencia a un fármaco anticancerígeno, (iii) revertir la resistencia a un fármaco anticancerígeno (iv) potenciar la actividad de un fármaco anticancerígeno, (v) retrasar o prevenir la aparición de resistencia a un fármaco anticancerígeno, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de la invención.
- 20 • Un método para el tratamiento de un cáncer cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de la invención, el método se caracteriza por la ausencia de resistencia al fármaco.
- Un método para la profilaxis o tratamiento (o alivio o reducción de la incidencia) de un estado de enfermedad o condición mediado por Hsp90 en un sujeto que se somete al tratamiento con un agente terapéutico (tal como un agente contra el cáncer), el método comprende administrar al sujeto una combinación de la invención, en donde el estado de enfermedad o condición mediado por Hsp90 es el desarrollo de resistencia a dicho agente terapéutico.
- 25 • Un método para: (i) sensibilizar las células malignas a un agente contra el cáncer, (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a un agente contra el cáncer; (iii) revertir la resistencia a un agente contra el cáncer, (iv) potenciar la actividad de un agente contra el cáncer, (v) retrasar o prevenir la aparición de resistencia a un agente contra el cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que se somete al tratamiento con dicho agente contra el
- 30 • Un método para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que se somete al tratamiento con un agente contra el cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de la invención, el método se caracteriza por la ausencia de resistencia del fármaco al agente contra el cáncer.

Actividad biológica

- 35 La actividad biológica de la sal de lactato del compuesto de fórmula (1) (particularmente el L-lactato) y formas cristalina de este, por ejemplo, como inhibidores de Hsp90, puede medirse usando los ensayos que se exponen en los ejemplos más abajo, por ejemplo los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) descritos en el Ejemplo 6 y los ensayos de actividad anti-proliferativa descritos en el Ejemplo 7. El nivel de actividad exhibida por un compuesto dado en el ensayo de ITC puede definirse en términos del valor de K_d , y los compuestos de la presente invención tienen un valor de K_d de menos de 1 micromolar. En los ensayos de actividad anti-proliferativa, el nivel de actividad exhibida por un compuesto dado en un ensayo puede definirse en términos del valor de IC_{50} , y los compuestos de la invención tienen cada uno un valor de IC_{50} de menos de 0.1 micromolar.

hERG

- 45 A finales de los años 1990 un número de fármacos, aprobados por la FDA de los Estados Unidos tuvo que ser retirado de la venta en los Estados Unidos cuando se descubrió que estaban implicados en muertes causadas por el mal funcionamiento del corazón. Se descubrió posteriormente que un efecto secundario de esos fármacos fue el desarrollo de arritmias causadas por el bloqueo de los canales hERG en las células del corazón. El canal hERG es uno de una familia de canales del ión potasio cuyo primer miembro se identificó a finales de los años 1980 en un mutante de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (ver Jan, L.Y. y Jan, Y.N. (1990). A Superfamily of Ion Channels. Nature, 345(6277):672). Las propiedades biofísicas del canal de ión de potasio hERG se describen en Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., y Keating, M.T. (1995). A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the *I*_{kr} potassium channel. Cell, 81:299-307, y Trudeau, M.C.,

Warmke, J.W., Ganetzky, B., y Robertson, G.A. (1995). HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. *Science*, 269:92-95.

La eliminación de la actividad bloqueadora de hERG sigue siendo una consideración importante en el desarrollo de cualquier nuevo fármaco.

- 5 El compuesto de la fórmula (1) tiene una baja actividad de hERG y una buena separación entre la actividad inhibidora de Hsp90 y actividad hERG. Particularmente, el compuesto de fórmula (1) tiene un valor medio IC_{50} contra hERG que es mayor que 30 veces los valores IC_{50} del compuesto en ensayos de proliferación celular. El compuesto de fórmula (1) tiene un valor medio IC_{50} contra hERG que es mayor de 15 μM .

Los compuestos de la invención tienen propiedades ADME ventajosas y en particular mejor distribución del tumor.

- 10 Tratamiento del dolor, neuropatías, apoplejía y condiciones relacionadas

Las combinaciones de la invención incluyen compuestos que tienen actividad de modulación o inhibidora de Hsp90 y por lo tanto son útiles para usar en el tratamiento, alivio o prevención de ciertas enfermedades y condiciones mediadas por cdk5.

- 15 En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de la apoplejía

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para usar como un agente neuroprotector.

- 20 En otros aspectos, la invención proporciona:

■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en el tratamiento del dolor.

■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la reducción o eliminación del dolor en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un humano) que sufre de dolor.

- 25 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para usar en la reducción o eliminación del dolor en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un humano) que sufre de dolor.

- 30 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de uno cualquiera o más de nocicepción, dolor somático, dolor visceral, dolor agudo, dolor crónico, hiperalgesia, alodinia, dolor post operatorio, dolor debido a hipersensibilidad, dolor de cabeza, dolor inflamatorio (reumático, dental, dismenorrea o infección), dolor neurológico, dolor musculoesquelético, dolor relacionado con cáncer o dolor vascular.

- 35 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en el tratamiento de uno cualquiera o más de nocicepción, dolor somático, dolor visceral, dolor agudo, dolor crónico, hiperalgesia, alodinia, dolor post operatorio, dolor debido a hipersensibilidad, dolor de cabeza, dolor inflamatorio (reumático, dental, dismenorrea o infección), dolor neurológico, dolor musculoesquelético, dolor relacionado con cáncer o dolor vascular.

■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método de tratamiento del dolor en un paciente tal como un mamífero (por ejemplo, humano), cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.

- 40 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para la reducción o eliminación del dolor en un paciente (por ejemplo, un mamífero tal como un humano) que sufre de dolor, cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de la combinación que reduce el dolor o elimina el dolor.

- 45 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para el tratamiento de uno cualquiera o más de nocicepción, dolor somático, dolor visceral, dolor agudo, dolor crónico, hiperalgesia, alodinia, dolor post operatorio, dolor debido a hipersensibilidad, dolor de cabeza, dolor inflamatorio (reumático, dental, dismenorrea o infección), dolor neurológico, dolor musculoesquelético, dolor relacionado con cáncer o dolor vascular, cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.

- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de la apoplejía.
- 5 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para la profilaxis o tratamiento de la apoplejía en un paciente tal como un mamífero (por ejemplo, humano), cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar como un agente neuroprotector.
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para prevenir o reducir el daño neuronal en un paciente que sufre de apoplejía, cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad neuroprotectora efectiva de la combinación.
- 10 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la prevención o reducción del riesgo de apoplejía en pacientes con riesgo de apoplejía, por ejemplo un paciente que exhibe uno cualquiera o más factores de riesgo seleccionados de inflamación vascular, aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia y fibrilación auricular.
- 15 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para la prevención o reducción del riesgo de apoplejía en pacientes con riesgo de apoplejía, por ejemplo un paciente que exhibe uno cualquiera o más factores de riesgo seleccionados de inflamación vascular, aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia y fibrilación auricular.
- 20 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para la prevención o reducción del riesgo de apoplejía en pacientes con riesgo de apoplejía, por ejemplo un paciente que exhibe uno cualquiera o más factores de riesgo seleccionados de inflamación vascular, aterosclerosis, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia y fibrilación auricular, cuyo método comprende administrar al paciente una cantidad terapéutica efectiva de la combinación.
- 25 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una quinasa 5 dependiente de ciclina.
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una quinasa 5 dependiente de ciclina.
- 30 ■ Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por una quinasa 5 dependiente de ciclina, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación.
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método para aliviar o reducir la incidencia de un estado de enfermedad o condición mediada por una quinasa 5 dependiente de ciclina, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación.
- 35 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35.
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- 40 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad neurodegenerativa.
- 45 ■ El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición caracterizada por niveles elevados de cdk5 o p35.
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad neurodegenerativa.
- 5
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición caracterizada por niveles elevados de cdk5 o p35.
- 10
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método de profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.
- 15
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método de profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición mediada por cdk5 o p35, dicho estado de enfermedad o condición es distinto de la enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.
- 20
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de una neuropatía, tal como una neuropatía periférica, distinta de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- 25
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una neuropatía, tal como una neuropatía periférica, distinta de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- 30
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en un método de profilaxis o tratamiento de una neuropatía, tal como una neuropatía periférica, distinta de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación.
- Actividad anti-fúngica, antiprotozoo, anti-viral y anti-parasítica
- Las combinaciones de la presente invención tienen actividad antifúngica, actividad antiprotozoo y actividad antiparasítica.
- En particular, la combinación es útil en el tratamiento de la infección por hongos patogénicos, protozoos y parásitos donde la infección por el patógeno se asocia normalmente con una respuesta de anticuerpo a HSP90.
- En una realización, la invención proporciona combinaciones como se define en la presente para usar como agentes anti-fúngicos.
- 35
- Los ejemplos de hongos incluyen los que son patógenos del hombre y otros animales, por ejemplo:
- especies de *Candida* tales como *Candida albicans* y *Candida tropicalis*;
 - especies de *Cryptococcus* tales como *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcal meningitis*;
 - especies de *Aspergillus* tales como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*,
 - especies de *Microsporium* tales como *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*;
- 40
- especies de *Epidermophyton*;
 - especies de *Trichophyton* tales como *Trichophyton equinum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*;
 - *Epidermophyton floccosum*;
 - *Exophiala werneckii*;
 - especies de *Fusarium* tal como *Fusarium solani*;

- *Sporothrix schenckii*;
 - especies de *Penicillium* tal como *Penicillium rubrum*;
 - especies de *Aspergillus*;
 - *Ceratocystis pilifera*;
- 5 ■ *Chrysosporium pruinatum*;
- especies de *Helminthosporium*;
 - *Paecilomyces variotti*;
 - levaduras, por ejemplo, especies de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pityrosporum* tales como *Pityrosporum orbiculare* y *Pityrosporum ovale*;
- 10 ■ especies de *Histoplasma* tal como *Histoplasma capsulatum*;
- especies de *Coccidioides*;
 - especies de *Paracoccidioides*; y
 - especies de *Blastomyces*.
- 15 En otra realización, la invención proporciona las combinaciones como se define en la presente para usar como agentes antiprotozoos.
- Los ejemplos de protozoos incluyen:
- *Trypanosoma cruzi*;
 - especies de *Leishmania*; por ejemplo el complejo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*, y *L. chagasi*); el complejo *L. mexicana* (3 especies principales - *L. mexicana*, *L. amazonensis*, y *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*, *L. aethiopica*; y los subgéneros *Viannia* con cuatro especies principales (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, y *L. (V.) peruviana*);
 - *Toxoplasma gondii*; y
 - *Trichomonas vaginalis*.
- 20
- 25 En una realización adicional, la invención proporciona compuestos de la fórmula (I) y subgrupos de los mismos como se define en la presente para usar como agentes anti-parasíticos.
- Ejemplos de parásitos incluyen gusanos parasíticos tales como:
- lombrices parasíticas tales como *Ascaris lumbricoides*;
 - platelmintos parasíticos tales como los gusanos tremátodos parasíticos, por ejemplo, *Schistosoma mansoni*
- La invención proporciona además *entre otros*:
- 30 ● Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, protozoárica o parasítica (distinta de un estado de enfermedad o condición debido a *Plasmodium falciparum*), por ejemplo un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90.
- 35 ● El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, protozoárica o parasítica (distinta de un estado de enfermedad o condición debido a *Plasmodium falciparum*), por ejemplo, un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90.
- 40 ● Una combinación de la invención para usar en un método para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, protozoárica o parasítica (distinta de un estado de enfermedad o condición debido a *Plasmodium falciparum*), por ejemplo, un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación.

- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, por ejemplo, un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90.
- 5
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, por ejemplo, un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90.
 - Una combinación de la invención para usar en un método para la profilaxis o tratamiento de un estado de enfermedad o condición fúngica, por ejemplo, un estado de enfermedad o condición caracterizada por una respuesta del anticuerpo a Hsp90, cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite la combinación.
- 10
- Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en prevenir, detener o revertir la infección de un animal (tal como un mamífero, por ejemplo un humano) por hongos patógenos.
 - El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para prevenir, detener o revertir la infección de un animal (tal como un mamífero, por ejemplo un humano) por hongos patógenos.
- 15
- Una combinación de la invención para usar en un método para prevenir, detener o revertir la infección de un animal (tal como un mamífero, por ejemplo un humano) por hongos patógenos, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación.
 - Una combinación de la invención como se define en la presente para cualquiera de los usos y métodos que se exponen anteriormente, y como se describe en otras partes en la presente.
- 20
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de cualquiera de los estados de enfermedad o condiciones descritas en la presente.
 - Una combinación de la invención como se define en la presente con un agente terapéutico adicional que es un agente antifúngico (por ejemplo un agente antifúngico azol).
- 25
- Una combinación farmacéutica que comprende una combinación de la invención que incluye un agente terapéutico adicional que es un compuesto auxiliar que es un agente antifúngico (por ejemplo un agente antifúngico azol).
 - Una combinación de la invención como se define en la presente en la que el agente terapéutico adicional es un agente antifúngico, un agente antiprotozoario o un agente antiparasitario para usar en prevenir, reducir o revertir el desarrollo de resistencia a un agente anti-fúngico, agente antiprotozoo o agente anti-parasítico (preferiblemente un agente anti-fúngico).
- 30
- Una combinación de la invención en la que el agente terapéutico adicional un agente anti-fúngico, agente antiprotozoo o agente anti-parasítico (preferiblemente un agente anti-fúngico) para usar en un método de prevenir o reducir el desarrollo de resistencia a un agente anti-fúngico, agente antiprotozoo o agente anti-parasítico en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), cuyo método comprende administrar al paciente la combinación.
- 35
- Una combinación de la invención para usar en un método para la profilaxis o tratamiento (o alivio o reducción de la incidencia) de un estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de un compuesto de la invención como se define en la presente con un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, en donde el estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90 es el desarrollo de resistencia al fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico.
- 40
- Una combinación de la invención para usar en un método para: (i) sensibilizar las células fúngicas, protozoáricas o parasíticas a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (iii) revertir la resistencia a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (iv) potenciar la actividad de un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (v) retardar o prevenir la aparición de la resistencia a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de un compuesto de la invención como se define en la presente en donde el agente terapéutico adicional es el dicho fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico.
- 45
- Una combinación de la invención para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición fúngica, protozoárica o parasítica, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita la combinación de un compuesto de la invención en donde el agente terapéutico adicional es un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, el método se caracteriza por la ausencia de resistencia al fármaco.
- 50

- 5 ● Una combinación de la invención para usar en un método para la profilaxis o tratamiento (o alivio o reducción de la incidencia) de un estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90 en un sujeto que se somete al tratamiento con un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, el método comprende administrar al sujeto una combinación de la invención en donde el agente terapéutico adicional es un fármaco antifúngico, antiprotozoo o antiparasítico, en donde el estado de enfermedad o condición mediada por Hsp90 es el desarrollo de resistencia a dicho fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico.
- 10 ● Una combinación de la invención para usar en un método para: (i) sensibilizar las células fúngicas, protozoáricas o parasíticas a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (ii) aliviar o reducir la incidencia de resistencia un fármaco fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico (iii) revertir la resistencia a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (iv) potenciar la actividad de un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico; (v) retardar o prevenir la aparición de la resistencia a un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, el método comprende administrar a un sujeto una combinación de la invención en donde el agente terapéutico adicional es un fármaco antifúngico, antiprotozoo o antiparasítico.
- 15 ● Una combinación de la invención para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad fúngica, protozoárica o parasítica en un sujeto que se somete al tratamiento con un fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de la invención en donde el agente terapéutico adicional es un fármaco antifúngico, antiprotozoo o antiparasítico, cuyo método se caracteriza por la ausencia de resistencia al fármaco por ejemplo a dicho fármaco anti-fúngico, antiprotozoo o anti-parasítico).
- 20 Como se describió anteriormente en la parte introductoria de esta solicitud, los compuestos que tienen actividad inhibidora de Hsp90 se ha encontrado exhiben actividad anti-fúngica potente y previenen el desarrollo de resistencia a los anti-fúngicos y particularmente resistencia dependiente de Hsp90 a los anti-fúngicos. Además, se ha encontrado que la inhibición de la actividad de Hsp90 puede reducir el desarrollo de resistencia a los fármacos anti-fúngicos usados comúnmente tales como los azoles. La combinación de la invención será útil por lo tanto en la profilaxis o tratamiento de una variedad de enfermedades y condiciones fúngicas y serán útiles además, en el
- 25 mejoramiento de la actividad de los fármacos anti-fúngicos cuando se coadministran con otros fármacos anti-fúngicos tales como los azoles.
- La actividad anti-fúngica de las combinaciones de la presente invención puede evaluarse determinando la concentración fungistática mínima (inhibición) (m.i.c.). Esta prueba se realiza usualmente preparando una serie de placas o tubos que contienen un medio nutriente adecuado, cada placa o tubo que contiene además una concentración diferente del compuesto de prueba e inoculando después el medio con las especies fúngicas. Después de un período de incubación las placas se examinan visualmente para la presencia o ausencia de crecimiento de hongos. La m.i.c. es la concentración mínima necesaria para prevenir el crecimiento fúngico.
- 30 Las combinaciones pueden usarse en la medicina de animales (por ejemplo en el tratamiento de mamíferos tales como humanos).
- 35 Las infecciones fúngicas en animales contra las que se pueden usar las combinaciones de la invención tal como se definen en la presente memoria incluyen:
- Micosis superficiales - es decir, infecciones fúngicas limitadas a las capas exteriores de la piel y cabello;
 - Micosis cutáneas - es decir, infecciones fúngicas que se extienden más profundo en la epidermis pero típicamente se restringen a las capas queratinizadas de la piel, cabello y uñas;
 - 40 ■ Micosis subcutánea - es decir, infecciones fúngicas que involucran la dermis, tejidos subcutáneos, músculo y fascia;
 - Micosis sistémicas debido a patógenos primarios (típicamente se originan principalmente en los pulmones en primer lugar y se pueden diseminar a otros órganos y sistemas) y
 - 45 ■ Micosis sistémicas debido a patógenos oportunistas (infecciones de pacientes con deficiencias inmunológicas que de cualquier otra forma no estarían infectados).
- Los ejemplos particulares de estados de enfermedad fúngica para los que se pueden usar combinaciones de la invención como se define aquí incluyen:
- 50 ■ Infecciones por dermatofitos tales como tiña versicolor (una infección fúngica superficial de la piel), tinea pedis (Pie de Atleta), tinea capitis (infección fúngica superficial en la cabeza), tiña de la barba (infección fúngica de áreas con barba), tinea corporis (infección fúngica de áreas de la piel lampiña).
 - Candidiasis de la mucosa, tales como Candidiasis Oral, esofagitis y Candidiasis vaginal.

- La candidiasis de órgano invasiva o profunda (por ejemplo, fungemia, endocarditis y endoftalmítis).
 - Infecciones Cryptococcal tales como Cryptococcal meningitis.
 - Histoplasmosis.
 - Blastomycosis, una infección fúngica de los pulmones y ocasionalmente de la piel.
- 5 ■ Infecciones Fúngicas Invasivas en pacientes con sistemas inmunes debilitados o bajo tratamiento con fármacos contra el cáncer o contra-AID, por ejemplo, la Candidiasis Invasiva y Aspergilosis Invasiva.
- La Aspergilosis tal como Aspergilosis Alérgica Broncopulmonar.
 - Aspergilloma.
- 10 ■ Infecciones Intertrigo (infecciones fúngicas que ocurren en los pliegues de la piel por ejemplo los dedos de pies o manos, en el área de la axila o en el área de la ingle).
- Maduramycosis (invasión fúngica de los tejidos del pie, conocido además como pie de Madura).
 - Coccidioidomycosis.
 - Mucormycosis.
 - Blastomycosis
- 15 ■ Geotrichosis.
- Chromoblastomycosis.
 - Conidiosporosis.
 - Histoplasmosis.
 - Rhinosporidosis.
- 20 ■ Nocardiosis.
- Para-actinomycosis.
 - Penicilliosis.
 - Monoliasis.
 - Sporotrichosis.
- 25 Las infecciones fúngicas de particular interés son Candidiasis y Aspergilosis.
- Los compuestos de la invención tienen además actividad anti-protocoo y actividad anti-parasítica. La actividad antiprotocoo de las combinaciones de la presente invención puede evaluarse por métodos convencionales, por ejemplo determinando la concentración inhibidora mínima (m.i.c.) o 50 % del nivel de inhibición (IC₅₀).
- 30 Los ejemplos de enfermedades o condiciones parasíticas o por protozoos para el que las combinaciones de la invención pueden resultar ser útiles incluyen:
- La enfermedad de Chagas ((tripanosomiasis) - una infección causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*.
 - Ascariasis - una enfermedad humana causada por el ascaris lumbricoides parasítico *Ascaris lumbricoides*.
 - Leishmaniasis - una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*
 - Toxoplasmosis - una enfermedad parasítica causada por el protozoo *Toxoplasma gondii*.
- 35 ■ Esquistosomiasis (bilharzia) - una enfermedad causada por el parásito *Schistoma mansoni*.
- Trichomoniasis - una enfermedad de transmisión sexual causada por el protozoo parasítico *Trichomonas vaginalis*.

Actividad Anti-viral

- Como se discutió anteriormente en las secciones introductorias de esta solicitud, la infección de una célula huésped con el ARN/ADN viral resulta en una redirección sustancial de la síntesis de proteínas celulares hacia proteínas virales claves codificadas por el ácido nucleico viral, y esto con frecuencia da lugar al aumento de la regulación positiva de proteínas de choque térmico. Se cree que una función de la inducción de HSP puede ser ayudar en la estabilización y plegamiento de los altos niveles de proteínas "extrañas" generados en la preparación para la replicación del virus y se ha mostrado (Nagkagawa y otros) que los inhibidores de HSP90 pueden bloquear la replicación viral. En consecuencia, las combinaciones de la invención son útiles para combatir las infecciones virales, por ejemplo, bloqueando o inhibiendo la replicación viral.
- 5
- 10 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona unas combinaciones de la invención como se define en la presente para usar en la profilaxis o tratamiento de una infección viral (o enfermedad viral).
- En aspectos adicionales, la invención proporciona:
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una infección viral (o enfermedad viral).
- 15
- Una combinación de la invención para usar en un método para la profilaxis o tratamiento de una infección viral (o enfermedad viral), cuyo método comprende administrar a un sujeto que lo necesite la combinación.
 - Una combinación de la invención como se define en la presente para usar en el bloqueo o inhibición de la replicación viral en un organismo huésped (por ejemplo, un animal tal como un mamífero (por ejemplo, humano)).
- 20
- El uso de una combinación de la invención como se define en la presente para la fabricación de un medicamento para usar en el bloqueo o inhibición de la replicación viral en un organismo huésped (por ejemplo, un animal tal como un mamífero (por ejemplo, humano)).
 - Una combinación de la invención para usar en un método para bloquear o inhibir la replicación viral en un organismo huésped (por ejemplo, un animal tal como un mamífero (por ejemplo, humano)) cuyo método comprende administrar al organismo huésped la combinación.
- 25 Los ejemplos de infecciones virales que pueden ser tratadas con combinaciones de la invención incluyen infecciones debidas a uno cualquiera o más de los siguientes virus:
- Picornavirus tales como rinovirus (virus del resfriado común), virus Coxsackie (por ejemplo, virus Coxsackie B); y virus de la fiebre aftosa;
- 30
- Virus de la Hepatitis tales como virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D (HDV) y virus de la hepatitis E (HEV),
 - Coronavirus (por ejemplo, virus del resfriado común y Síndrome respiratorio agudo severo (SRAS))
 - Adenovirus, tales como Adenovirus Humanos (una causa de las infecciones respiratorias y conjuntivas);
 - Astrovirus (una causa de los síntomas similares a la gripe) ;
 - Flavivirus tal como el virus de la Fiebre amarilla;
- 35
- Ortomixovirus tales como los virus de influenza (por ejemplo virus de la gripe A, B y C) ;
 - Virus parainfluenza;
 - Virus Sincitial Respiratorio ;
 - Enterovirus tales como Poliovirus (virus de la Poliomieltis);
- 40
- Paramixovirus tales como el virus de Sarampión (rubéola), virus de la parotiditis, virus sincitial respiratorio (RSV) y el virus del moquillo canino (CDV);
 - Togavirus tales como virus de la Rubéola (Sarampión Alemán) y virus Sindbis;
 - Virus Herpes tales como:

- Virus Herpes simplex (HSV), por ejemplo, HSV-1 que causa ampollas febriles (herpes labial), gingivostomatitis, queratitis por herpes, eczema herpético y encefalitis HSV) y HSV-2 que causa lesiones genitales, infecciones neonatales, meningitis por HSV, proctitis por HSV;
 - Virus Varicella zoster (VZV), que causa la varicela, síndrome de varicela congénita y herpes;
- 5
- Epstein-Barr (EBV), que causa la mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt y cáncer de nasofaringe;
 - Citomegalovirus (CMV), por ejemplo citomegalovirus humano (HCMV);
 - Virus Herpes humano 6 (HHV-6), que causa roséola infantil o exantema súbito
 - Virus herpes humano 8 (HHV-8) o sarcoma de Kaposi asociado al virus herpes (KSHV), que se encuentra en la saliva de muchos pacientes con SIDA y asociado con sarcoma de Kaposi;
- 10
- Papovaviridae tales como el virus del poliovirus y virus del papiloma humano (HPV) ;
 - Parvovirus;
 - Poxvirus tal como virus Variola (virus de la viruela humana);
 - Rhabdovirus tales como virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular (VSV); y
 - Retrovirus tal como virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que es responsable del síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA); y el virus linfotrópico T humano (HTLV).
- 15

Las infecciones virales particulares contra las que las combinación de la invención pueden ser usados incluyen virus herpes, virus pox, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis, adenovirus, VIH (para la prevención del desarrollo del SIDA en individuos infectados con VIH), virus HPV, HCV y HCMV.

La infección viral puede ser distinta de una infección con virus de la hepatitis C (HCV).

- 20
- La actividad de las combinaciones de la invención como agentes para bloquear o prevenir la replicación viral en los organismos huésped o células huésped puede determinarse de acuerdo con procedimientos estándar bien conocidos por la persona con experiencia en la materia.

- 25
- Las combinaciones de la invención pueden incluir agentes anti-virales tales como aciclovir, ganciclovir, oseltamavir (Tamiflu®) y zanamavir (Relenza®), amantadina, rimantadina, adefovir dipivoxil, interferones (por ejemplo, interferón alfa-2b e interferón alfa-2a pegilado), lamivudina, entecavir, ribavirina, famciclovir, valcyclovir, valaciclovir, azidotimidina (AZT - Retrovir®), atazanavir, fosamprenavir, lamivudina, lamivudina + abacavir, tenofovir disoproxil fumarato, tenofovir disoproxil fumarato + emtricitabina, tipranavir, nelfinavir, indinavir, raltegravir, ritonavir, lopinavir + ritonavir, darunavir, amprenavir, enfuvirtida, saquinavir, hidroxiurea, VGV-1 y vacunas anti-virales.

En consecuencia, la invención proporciona además:

- 30
- Una combinación de la invención como se define en la presente en donde el agente terapéutico adicional es un agente antiviral.
 - Una composición farmacéutica que comprende una combinación de la invención como se define en la presente en donde el agente terapéutico adicional es un agente antiviral.

Formulaciones farmacéuticas

- 35
- Mientras sea posible que el compuesto activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo formulación) que comprende al menos un compuesto activo de la invención junto con uno o más portadores, adyuvantes, excipientes, diluyentes, rellenos, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes, u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, agentes que reducen o alivian algunos de los efectos secundarios asociados con la quimioterapia. Los ejemplos particulares de tales agentes incluyen agentes antieméticos y agentes que previenen o reducen la duración de la neutropenia asociada a la quimioterapia y previenen las complicaciones que surgen de los niveles reducidos de glóbulos rojos o glóbulos blancos de la sangre, por ejemplo, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).
- 40
- Así, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas, como se definió anteriormente, y métodos de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar al menos un compuesto activo,
- 45

como definido anteriormente, junto con uno o más portadores, excipientes, tampones, adyuvantes, estabilizantes, u otros materiales farmacéuticamente aceptables, como se describe en la presente.

El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente refiere a los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para usar en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, de acuerdo con una relación razonable de beneficio/riesgo. Cada portador, excipiente, etc. debe ser además "aceptable" en el sentido de ser compatible con otros ingredientes de la formulación.

En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el compuesto de la invención como se define en la presente y particularmente compuestos de las fórmulas (10) y (1) y y sus formas cristalinas y salinas como se define en la presente en la forma de composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración oral, parenteral, tópica, intranasal, oftálmica, ótica, rectal, intravaginal o transdérmica. Cuando las composiciones son pretendidas para administración parenteral, se pueden formular para la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o para el suministro directo en un órgano o tejido diana mediante inyección, infusión u otros medios de suministro. El suministro puede ser por inyección en bolo, infusión a corto plazo o infusión a largo plazo puede ser a través de suministro pasivo o a través del uso de una bomba de infusión adecuada.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles que contienen agentes anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos, co-solventes, mezclas de solventes orgánicos, agentes de formación de complejos de ciclodextrina, agentes emulsionantes (para formar y estabilizar las formulaciones de emulsión), componentes de liposoma para formar liposomas, polímeros gelificables para la formación de geles poliméricos, protectores de la liofilización y combinaciones de agentes, *entre otros*, para estabilizar el ingrediente activo en una forma soluble y producir la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral pueden tomar además la forma de suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, págs. 201-230).

Una molécula de fármaco que es ionizable puede solubilizarse a la concentración deseada por ajuste del pH si el pK_a del fármaco está suficientemente lejos del valor de pH de la formulación. El intervalo de pH aceptable es 2-12 para la administración intravenosa e intramuscular, pero en la vía subcutánea el intervalo es pH 2.7-9.0. El pH de la solución es controlado por la forma salina del fármaco, ácidos/bases fuertes tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o por soluciones de tampones incluyen pero sin limitarse a soluciones tampón formadas de glicina, citrato, acetato, maleato, succinato, histidina, fosfato, tris(hidroximetil)-aminometano-(TRIS), o carbonato.

La combinación de una solución acuosa y un solvente/agente tensioactivo orgánico soluble en agua (es decir, un cosolvente) se usa con frecuencia en formulaciones inyectables. Los solventes y agentes tensioactivos orgánicos solubles en agua usados en las formulaciones inyectables incluyen pero sin limitarse a propilenglicol, etanol, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400, glicerina, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP; Pharmasolve), dimetilsulfóxido (DMSO), Solutol HS 15, Cremophor EL, Cremophor RH 60, y polisorbato 80. Tales formulaciones pueden generalmente, pero no siempre, diluirse antes de la inyección.

Propilenglicol, PEG 300, etanol, Cremophor EL, Cremophor RH 60, y polisorbato 80 son los solventes y agentes tensioactivos completamente orgánicos miscibles en agua usados en las formulaciones inyectables comercialmente disponibles y pueden usarse en combinaciones entre sí. Las formulaciones orgánicas resultantes son diluidas generalmente, al menos 2-veces antes del bolo IV o infusión IV.

Como alternativa la solubilidad del agua aumentada puede lograrse a través de la formación de complejos moleculares con ciclodextrinas.

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas compuestas de membranas de bicapa lipídica externa y un núcleo interno acuoso y con un diámetro total de $<100 \mu\text{m}$. En dependencia del nivel de hidrofobicidad, los fármacos moderadamente hidrofóbicos pueden solubilizarse por liposomas si el fármaco es encapsulado o intercalado dentro del liposoma. Los fármacos hidrofóbicos pueden solubilizarse por liposomas si la molécula de fármaco se vuelve una parte integral de la membrana de bicapa lipídica, y en este caso, el fármaco hidrofóbico es disuelto en la porción lipídica de la bicapa lipídica. Una formulación de liposomas típica contiene agua con fosfolípido a 5-20 mg/ml, un isotonicificador, un tampón de pH 5-8, y opcionalmente colesterol.

Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo frascos y ampulas selladas, y pueden almacenarse en una condición seca por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones inmediatamente antes del uso.

- La formulación farmacéutica puede prepararse liofilizando un compuesto de la invención o sal de adición ácida del mismo. La liofilización se refiere al procedimiento del secado por congelamiento de una composición. El secado por congelamiento y liofilización se usan por lo tanto como sinónimos en la presente. Un proceso típico es solubilizar el compuesto y la formulación resultante es clarificada, filtrada estéril y transferida asépticamente a recipientes adecuados para liofilizar (por ejemplo, viales). En el caso de viales, son parcialmente tapados con tapones para liofilización. La formulación puede enfriarse para la congelación y someterse a liofilización bajo condiciones estándares, y después cerrar herméticamente formando una formulación liofilizada estable. La composición típicamente tendrá un bajo contenido de agua residual, por ejemplo menos de 5% por ejemplo menos de 1% por peso basado en el peso del liofilizado.
- La formulación de liofilización puede contener otros excipientes, por ejemplo, agentes espesantes, agentes de dispersión, tampones, antioxidantes, conservantes, ajustadores de la tonicidad. Los tampones típicos incluyen fosfato, acetato, citrato y glicina. Los ejemplos de antioxidantes incluyen ácido ascórbico, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, monotioglicerol, tiourea, hidroxitolueno butilado, hidroxil anisol butilado, y sales de ácido etilendiaminotetraacético. Los conservantes pueden incluir ácido benzoico y sus sales, ácido sórbico y sus sales, ésteres de alquilo de ácido para-hidroxibenzoico, fenol, clorobutanol, alcohol bencílico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio. Los tampones mencionados previamente, así como dextrosa y cloruro de sodio, pueden usarse para el ajuste de la tonicidad si es necesario.
- Los agentes de carga se usan generalmente en la tecnología de liofilización para facilitar el proceso y/o proporcionar la integridad de carga y/o mecánica de la torta liofilizada. El agente de carga significa un diluyente sólido particulado libremente soluble en agua que cuando es co-liofilizado con el compuesto o sal del mismo, proporciona una torta liofilizada, físicamente estable, un proceso de liofilización más óptimo y reconstitución rápida y completa. El agente de carga puede utilizarse para hacer la solución isotónica.
- El agente de carga soluble en agua puede ser cualquiera de los materiales sólidos inertes farmacéuticamente aceptables típicamente usados en la liofilización. Tales agentes de carga incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa; polialcoholes tales como sorbitol o manitol; aminoácidos tal como glicina, polímeros tal como polivinilpirrolidona, y polisacáridos tal como dextrano.
- La relación del peso del agente de carga con el peso del compuesto activo está típicamente dentro del intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 a 2.
- Como alternativa pueden proporcionarse en una solución concentrada que puede ser concentrada y sellada en un vial adecuado. La esterilización de las formas de dosificación pueden ser a través de filtración o mediante autoclave de los viales y sus contenidos en etapas adecuadas del proceso de formulación. La formulación suministrada puede requerir dilución adicional o preparación antes del suministro por ejemplo dilución en paquetes de infusión estériles adecuados.
- Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos, y tabletas estériles.
- En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica es en una forma adecuada para la administración por vía intravenosa, por ejemplo por inyección o infusión.
- En otra realización preferida, la composición farmacéutica es en una forma adecuada para la administración subcutánea (s.c.).
- Las formas farmacéuticas de dosificación adecuadas para la administración oral incluyen tabletas, cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas, jarabes, soluciones, polvos, gránulos, elixires y suspensiones, tabletas sublinguales, obleas o parches y parches bucales.
- Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la fórmula (I) pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas, ver por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, Estados Unidos.
- Así, las composiciones de las tabletas pueden contener una dosificación unitaria del compuesto activo junto con un diluyente o portador inerte tal como un azúcar o alcohol de azúcar, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol o manitol, y/o un diluyente no derivado de azúcar tal como carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, o una celulosa o derivado de esta tal como metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, y almidones tales como almidón de maíz. Las tabletas pueden contener además tales ingredientes estándares como agentes aglutinantes y de granulación tales como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por ejemplo polímeros reticulados hinchables tales como carboximetilcelulosa reticulada), agentes lubricantes (por ejemplo estearatos), conservantes (por ejemplo parabenos), antioxidantes (por ejemplo BHT), agentes tampón (por ejemplo tampones fosfato o citrato) y agentes

efervescentes tales como mezclas citrato/bicarbonato. Tales excipientes son bien conocidos y no es necesario discutirlos aquí en detalle.

5 Las formulaciones en cápsulas pueden ser de la variedad de gelatina dura o de gelatina blanda y pueden contener el componente activo en forma sólida, semi-sólida o líquida. Las cápsulas de gelatina pueden formarse a partir de gelatina animal o sintética o equivalentes derivados de planta de las mismas.

10 Las formas de dosificación sólidas (por ejemplo; tabletas, cápsulas etc.) pueden ser recubiertas o no recubiertas, pero típicamente tienen un recubrimiento, por ejemplo un recubrimiento de película protectora (por ejemplo, una cera o barniz) o un recubrimiento de control de la liberación. El recubrimiento (por ejemplo un polímero tipo Eudragit TM) puede ser diseñado para liberar el componente activo en un lugar deseado dentro del tracto gastrointestinal. Así, el recubrimiento puede ser seleccionado para degradarse bajo ciertas condiciones de pH dentro del tracto gastrointestinal, y de ese modo liberan el compuesto selectivamente en el estómago o en el íleon o duodeno. Como alternativa o adicionalmente, el recubrimiento puede usarse como un agente de enmascaramiento del sabor para enmascarar sabores desagradables tales como fármacos de sabor amargo. El recubrimiento puede contener azúcar u otros agentes que ayudan en el enmascaramiento de sabores desagradables.

15 En lugar de, o adicionalmente a, un recubrimiento, el fármaco puede presentarse en una matriz sólida que comprende un agente de control de la liberación, por ejemplo un agente que retrasa la liberación que puede adaptarse para liberar selectivamente el compuesto bajo condiciones de diversas acidez o alcalinidad en el tracto gastrointestinal. Como alternativa, el material de la matriz o recubrimiento que retarda la liberación puede tomar la forma de un polímero erosionable (por ejemplo, polímero anhídrido maleico) que se erosiona sustancialmente
20 continuamente según la forma de dosificación pasa a través del tracto gastrointestinal. Como una alternativa adicional, el compuesto activo puede formularse en un sistema de suministro que proporcione el control osmótico de la liberación del compuesto. La liberación osmótica y otras formulaciones de liberación retardada o de liberación sostenida pueden ser preparadas de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia.

25 Las formulaciones farmacéuticas pueden ser presentadas a un paciente en "paquetes para el paciente" que contienen un curso completo de tratamiento en un solo paquete, usualmente un empaque plástico transparente. Los paquetes para el paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, donde un farmacéutico divide un suministro del paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en la que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete para el paciente, normalmente ausente en las recetas del
30 paciente. La inclusión de un prospecto ha demostrado mejorar el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico

Las composiciones para uso tópico incluyen ungüentos, cremas, atomizadores, parches, geles, gotas líquidas e insertos (por ejemplo insertos intraoculares). Tales composiciones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos.

35 Las composiciones para la administración parenteral se presentan típicamente como soluciones acuosas o aceitosas estériles o suspensiones finas, o pueden proporcionarse en forma de polvo estéril finamente dividido para el maquillaje extemporáneamente con agua estéril para inyección.

40 Los ejemplos de formulaciones para la administración rectal o intravaginal incluyen pesarios y supositorios que pueden, por ejemplo, formarse a partir de un material en forma moldeable o ceroso que contiene el compuesto activo. Así, los supositorios o pesarios de dosis unitarias pueden prepararse por la mezcla del ingrediente activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo mantequilla de coca y que forman la mezcla resultante. Ejemplos adicionales de materiales cerosos moldeables incluyen polímeros tales como polialquilenglicoles de alto peso molecular, por ejemplo polietilenglicoles de alto peso molecular.

45 Como alternativa en el caso de la administración vaginal, la formulación puede presentarse como un tampón impregnado con los ingredientes activos y opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes. Otras formulaciones adecuadas para la administración rectal incluyen cremas, geles, espumas, pastas y atomizadores.

50 Ejemplos adicionales de composiciones tópicas incluyen apósitos y esparadrapos impregnados con ingredientes activos y opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes. Los portadores que pueden usarse incluyen alcoholes polihídricos, por ejemplo, tales como polietilenglicoles, propilenglicol o glicerina. Los excipientes adecuados son aquellos conocidos que sean adecuados en la materia.

55 Las composiciones para la administración por inhalación pueden tomar la forma de composiciones en polvo inhalables o atomizadores líquidos o en polvo, y pueden administrarse en forma estándar usando dispositivos inhaladores de polvo o dispositivos dispensadores de aerosol. Tales dispositivos son bien conocidos. Para la administración por inhalación, las formulaciones en polvo comprenden típicamente el compuesto activo junto con un diluyente en polvo inerte sólido tal como lactosa.

- Los compuestos de la invención se presentarán generalmente en forma de dosificación unitaria y, como tal, contendrán típicamente suficiente compuesto para proporcionar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener de 1 nanogramo a 2 gramos del ingrediente activo, por ejemplo de 1 nanogramo a 2 miligramos del ingrediente activo. Dentro de este intervalo, los sub-intervalos particulares del compuesto son 0.1 miligramos a 2 gramos del ingrediente activo (más usualmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo 50 miligramos a 500 miligramos), o 1 microgramo a 20 miligramos (por ejemplo 1 microgramo a 10 miligramos, por ejemplo 0.1 miligramos a 2 miligramos del ingrediente activo).
- Para las composiciones orales, una forma de dosificación unitaria puede contener de 1 miligramo a 2 gramos, más típicamente 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo 50 miligramos a 1 gramo, por ejemplo 100 miligramos a 1 gramo, del compuesto activo.
- El compuesto activo se administrará a un paciente que lo necesite (por ejemplo un paciente humano o animal) en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.
- Métodos de tratamiento
- Los compuestos de la invención serán útiles en la profilaxis o tratamiento de una variedad de estados de enfermedad o condiciones mediados por proteínas clientes de Hsp90. Los ejemplos de tales estados de enfermedad o condiciones se exponen anteriormente.
- Los compuestos se administran generalmente a un sujeto que necesita de tal administración, por ejemplo un paciente humano o animal, preferiblemente un ser humano.
- Los compuestos se administrarán típicamente en cantidades que son terapéuticamente o profilácticamente útiles y que generalmente no son tóxicas. Sin embargo, en ciertas situaciones (por ejemplo en el caso de enfermedades que amenazan la vida), los beneficios de administrar un compuesto de la Fórmula (I) pueden superar las desventajas de cualquiera de los efectos tóxicos o efectos secundarios, en cuyo caso puede considerarse deseable administrar los compuestos en cantidades que están asociadas con un grado de toxicidad.
- Los compuestos pueden administrarse durante un prolongado plazo para mantener los efectos terapéuticos beneficiosos o pueden administrarse durante un período de tiempo corto. Como alternativa pueden administrarse en una manera pulsátil o continua.
- Una dosis diaria típica del compuesto de la invención puede estar en el intervalo de 100 picogramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, más típicamente 5 nanogramos a 25 miligramos por kilogramo de peso corporal, y más usualmente 10 nanogramos a 15 miligramos por kilogramo (por ejemplo, 10 nanogramos a 10 miligramos, y más típicamente 1 microgramo por kilogramo a 20 miligramos por kilogramo, por ejemplo 1 microgramo a 10 miligramos por kilogramo) por kilogramo de peso corporal aunque donde se requiera pueden administrarse dosis más altas o más bajas. El compuesto puede ser administrado en una base diaria o en una base repetida por ejemplo cada 2, o 3, o 4, o 5, o 6, o 7, o 10 o 14, o 21, o 28 días.
- En un esquema de dosificación particular, un paciente se le dará una infusión diaria de un compuesto durante periodos de una hora durante hasta diez días en particular hasta cinco días durante una semana, y el tratamiento se repite en un intervalo deseado, tales como dos a cuatro semanas, en particular cada tres semanas.
- Más particularmente, un paciente se le puede dar una infusión diaria de un compuesto durante periodos de una hora durante 5 días y el tratamiento se repite cada tres semanas.
- En otro esquema de dosificación particular, un paciente se le administra una infusión durante 30 minutos a 1 hora seguido por infusiones de mantenimiento de duración variable, por ejemplo 1 a 5 horas, por ejemplo 3 horas.
- En un esquema de dosificación particular adicional, un paciente se le administra una infusión continua durante un período de 12 horas a 5 días, particularmente una infusión continua de 24 horas a 72 horas.
- Al final, sin embargo, la cantidad del compuesto administrado y el tipo de composición usada estará de acuerdo con la naturaleza de la condición fisiológica o enfermedad que se trata y será a la discreción del médico.
- Los compuestos como se define en la presente son administrados en terapia de combinación con uno o más de otros compuestos para el tratamiento de un estado de la enfermedad particular, por ejemplo una enfermedad neoplásica tal como un cáncer como se definió anteriormente.
- Los ejemplos de otros agentes terapéuticos o tratamientos que pueden ser administrados juntos (ya sea simultáneamente o a intervalos de tiempo diferentes) con los compuestos de la invención incluyen pero sin limitarse a:

- Inhibidores de la topoisomerasa I
 - Antimetabolitos
 - Agentes que tienen como objetivo la tubulina
 - Aglutinante de ADN e inhibidores de topoisomerasa II
- 5
- Agentes alquilantes
 - Anticuerpos monoclonales
 - Anti-Hormonas
 - Inhibidores de la transducción de la señal
 - Inhibidores de proteasoma
- 10
- ADN metiltransferasa
 - Citoquinas y retinoides
 - Terapias dirigidas con cromatina, por ejemplo, moduladores HDAC o HAT
 - Radioterapia; y
 - Otros agentes terapéuticos o profilácticos; por ejemplo, agentes que reducen o alivian algunos de los efectos secundarios asociados con la quimioterapia. Los ejemplos particulares de tales agentes incluyen agentes antieméticos y agentes que previenen o reducen la duración de la neutropenia asociada a la quimioterapia y previenen las complicaciones que surgen de los niveles reducidos de glóbulos rojos o glóbulos blancos de la sangre, por ejemplo, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Se incluyen además agentes que inhiben la resorción ósea tal como agentes bisfosfonato por ejemplo zoledronato, pamidronato e ibandronato, agentes que suprimen las respuestas inflamatorias (tales como dexametasona, prednisona, y prednisolona) y agentes usados para reducir los niveles en sangre de hormona de crecimiento e IGF-I en pacientes con acromegalia tales como formas sintéticas de la hormona del cerebro somatostatina, que incluye acetato de octreotida que es un octapéptido de acción prolongada con propiedades farmacológicas que imitan aquellas de la hormona natural somatostatina. Se incluyen además agentes tales como leucovorina, que se usa como un antídoto a fármacos que disminuyen los propios niveles de ácido fólico, o ácido folínico y agentes tal como acetato de megestrol que pueden usarse para el tratamiento de los efectos secundarios que incluyen el edema y episodios tromboembólicos.
- 15
- 20
- 25
- Los dos o más tratamientos se pueden dar en esquemas individualmente de dosis diversas y a través de vías diferentes.
- 30
- 35
- La combinación debe incluir uno, dos, tres, cuatro o más de otros agentes terapéuticos (preferiblemente uno o dos, con mayor preferencia uno), los compuestos pueden ser administrados simultáneamente o secuencialmente. Cuando se administran secuencialmente, pueden ser administrados a intervalos estrechamente espaciados (por ejemplo durante un periodo de 5-10 minutos) o a intervalos más largos (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más horas de separación, o aun períodos más largos cuando sea necesario), siendo el régimen preciso de dosificación acorde con las propiedades del agente (s) terapéutico(s).
- La combinación de la invención puede incluir tratamientos no quimioterapéuticos tales como radioterapia, terapia fotodinámica, terapia génica; cirugía y dietas controladas.
- 40
- Cuando el agente terapéutico adicional es otro agente quimioterapéutico, el compuesto y uno, dos, tres, cuatro o más de otros agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, formulados juntos en una forma de dosificación que contienen dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos. En una alternativa, los agentes terapéuticos individuales, pueden formularse por separado y presentarse juntos en la forma de un kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.
- Una persona con experiencia en la materia sabría a través de su conocimiento general común los regímenes de dosificación y terapias de combinación a usar.
- 45
- Métodos de Diagnóstico

Antes de la administración de un compuesto, un paciente puede ser seleccionado para determinar si una enfermedad o condición de la cual el paciente está o podría sufrir es una que podría ser susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad contra la Hsp90.

5 Por ejemplo, una muestra biológica que se toma de un paciente se puede analizar para determinar si una condición o enfermedad, tal como el cáncer, que el paciente está o podría padecer es una que se caracteriza por una anomalía genética o expresión anormal de la proteína, lo que conduce a la mutación o sobre-activación de una proteína cliente de Hsp90. Ejemplos de tales anomalías que resultan en la activación de las proteínas cliente de Hsp90 incluyen; translocación de Bcr-ABL, duplicación interna de Flt-3 y mutación de Braf, o sobre-expresión de ErbB2.

10 Así, el paciente puede someterse a una prueba de diagnóstico para detectar un marcador característico de la sobre regulación. El término diagnóstico incluye seleccionar. Por marcador incluimos marcadores genéticos que incluyen, por ejemplo, la medición de la composición del ADN para identificar mutaciones Braf, BCR-abl y Flt3 u otras proteínas clientes afectadas El término marcador incluye además proteínas tales como ErbB2, incluyendo los niveles o concentraciones de la proteína o algunos fragmentos o producto de degradación y para las enzimas la actividad enzimática. Los niveles de proteína (por ejemplo, fosforilada o no) y ARNm de las proteínas mencionadas pueden evaluarse además para caracterizar un cambio en la actividad. Por ejemplo, el nivel de AKT fosforilada puede ser un indicador de la sensibilidad a los inhibidores de HSP90

20 Las pruebas de diagnóstico se conducen típicamente sobre una muestra biológica seleccionada de, por ejemplo, muestras de biopsias tumorales, muestras de sangre (aislamiento y enriquecimiento de células tumorales caladas), biopsias de heces, esputo, análisis cromosómico, fluido pleural, fluido peritoneal, lanzas o biopsia bucal o a partir de orina

El proceso de selección involucrará típicamente la secuenciación directa, análisis de micromatriz de oligonucleótidos o proteínas, análisis proteómico por espectrometría de masas, técnicas o detección inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico.

25 Los métodos de identificación y análisis de mutaciones y sobre regulación de proteínas son bien conocidos por una persona con experiencia en la materia. Los métodos de selección pueden incluir, pero sin limitarse a, métodos estándares tales como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), hibridación in situ o inmunoelectrotransferencia.

30 En la selección por RT-PCR, el nivel de ARNm en el tumor se evalúa creando una copia de ADNc del ARNm seguido por la amplificación del ADNc por PCR. Los métodos de amplificación por PCR, la selección de cebadores y condiciones para la amplificación, son conocidos por una persona con experiencia en la materia. Las manipulaciones del ácido nucleico y PCR se llevan a cabo por métodos estándares, por ejemplo como se describe en Ausubel, F.M. y otros, ediciones. Current Protocols in Molecular Biology, 2004, John Wiley & Sons Inc., o Innis, M.A. y otros, ediciones. PCR Protocols: a guide to methods and applications, 1990, Academic Press, San Diego. Las reacciones y manipulaciones que involucran ácidos nucleicos y técnicas se describen en Sambrook y otros, 2001, 3ra Edición, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Como alternativa un kit comercialmente disponible para RT-PCR (por ejemplo, Roche Molecular Biochemicals,) puede ser usado, o la metodología como se expone en las patentes de Estados Unidos 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659, 5,272,057, 5,882,864, y 6,218,529 y se incorporan en la presente como referencia.

40 Un ejemplo de una técnica de hibridación in situ para evaluar la expresión de ARNm podría ser la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (ver Angerer, 1987 Meth. Enzymol., 152: 649).

45 Generalmente, la hibridación in situ comprende las siguientes etapas principales: (1) fijación del tejido que se analiza, (2) tratamiento de prehibridación de la muestra para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico objetivo, y para reducir la unión no específica, (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos a los ácidos nucleicos en el tejido o estructura biológica, (4) lavados post-hibridación para eliminar los fragmentos de ácido nucleico no unido en la hibridación, y (5) detección de los fragmentos de ácido nucleico hibridados. Las sondas usadas en tales aplicaciones se marcan típicamente, por ejemplo, con radioisótopos o indicadores fluorescentes. Las sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100, o 200 nucleótidos a aproximadamente 1000 o más nucleótidos, para permitir la hibridación específica con los ácido(s) nucleico(s) objetivo(s) en condiciones rigurosas. Las sondas FISH comercialmente disponibles existen además para la detección citogenética de reordenamientos cromosómicos, que pueden ser usados para detectar translocaciones Bcr-Abl y Flt3 dentro de las poblaciones de células de leucemia. Los métodos estándares para llevar a cabo la FISH se describen en Ausubel, F.M. y otros, eds. Current Protocols in Molecular Biology, 2004, John Wiley & Sons Inc y Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview por John M. S. Bartlett en Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols, 2da edición; ISBN: 1-59259-760-2; marzo 2004, págs. 077-088; Series: Methods in Molecular Medicine.

Los métodos para los perfiles de expresión génica se describen por (DePrimo y otros, BMC Cancer 2003, 3:3). En resumen, el protocolo es como sigue: el ADNc de doble cadena se sintetiza a partir del ARN total usando un

5 oligómero (dT) 24 para la síntesis de la primera cadena cebadora de ADNc, seguido por la síntesis de la segunda cadena de ADNc con cebadores hexámeros aleatorios. El ADNc de doble cadena se usa como un molde para la transcripción in vitro de ARNc usando ribonucleótidos biotinilados. El ARNc se fragmenta químicamente de acuerdo con los protocolos descritos por Affymetrix (Santa Clara, California, Estados Unidos), y después se hibridan durante la noche en las Matrices del Genoma Humano.

10 Como alternativa, los productos proteicos expresados a partir de los ARNm pueden ensayarse por inmunohistoquímica de muestras tumorales, inmunoensayo en fase sólida con placas de microtitulación, transferencia de Western, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de 2-dimensiones, ELISA, citometría de flujo y otros métodos conocidos en la materia para la detección de proteínas específicas. Los métodos de detección podrían incluir el uso de anticuerpos específicos al sitio. Las personas con experiencia en la materia reconocerán todas esas técnicas bien conocidas para la detección del "cromosoma filadelfia" indicativo de la translocación BCR-ABL.

Por lo tanto, todas esas técnicas pueden usarse además para identificar tumores particularmente adecuados para el tratamiento con los compuestos de la invención.

15 Ejemplos

La invención será ahora ilustrada, pero no limitada, con referencia a realizaciones específicas descritas en los siguientes ejemplos.

En los ejemplos, se pueden usar las siguientes abreviaturas.

AcOH	Ácido acético
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
Bn	bencil
CDI	1,1-carbonildiimidazol
DMAW90	Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H ₂ O (90:18:3:2)
DMAW120	Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H ₂ O (120:18:3:2)
DMAW240	Mezcla de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H ₂ O (240:20:3:2)
DCM	Diclorometano
DMF	dimetilformamida
DMSO	sulfóxido de dimetilo
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)- carbodiimida
Et ₃ N	trietilamina
EtOAc	Acetato de etilo
Et ₂ O	éter dietílico
h	hora(s)
HOAT	1-hidroxiazabenzotriazol

HOBt	1-hidroxibenzotriazol
MeCN	acetonitrilo
MeOH	Metanol
min.	minutos
Ms	mesilo
MsO	Mesilato
E. P.	éter de petróleo
PG	Grupo protector
t.a.	temperatura ambiente
SiO ₂	sílice
TBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio tetrafluoroborato
THF	Tetrahidrofurano

5 Los espectros de resonancia magnética de protones (¹H RMN) se registraron en un instrumento Bruker AV400 que opera a 400.13 MHz, en DMSO-d₆ o MeOH-d₄ (como se indica) a 27 °C, a menos que se indique de cualquier otra forma y se reportan como sigue: desplazamiento químico δ/ppm (número de protones, multiplicidad donde s=singulete, d=doblete, t=tripleto, q=cuartete, m=multiplete, br=bamplio). El solvente prótico residual se usó como la referencia interna.

10 En los ejemplos, los compuestos preparados se caracterizaron por cromatografía líquida y espectroscopia de masa usando las condiciones del sistema y de operación establecidas más abajo. Donde los átomos con diferentes isótopos están presentes y una masa sencilla citada, la masa citada para el compuesto es la masa monoisotópica (es decir, ³⁵Cl; ⁷⁹Br etc.). Se usaron diferentes sistemas, como se describe más abajo, y estos se equiparon con, y se establecieron para correrse bajo condiciones de operación muy similares. Las condiciones de operación usadas se describen además más abajo.

Descripción del sistema:

Sistema 1 (sistema analítico):

Sistema HPLC:	Waters 2795
Detector del espectro de masa :	Micromass Platform LC
Detector PDA:	Waters 2996 PDA

15

Sistema 2 (sistema preparativo y analítico):

Sistema HPLC:	Sistema Waters Fractionlynx
---------------	-----------------------------

ES 2 662 359 T3

Detector del espectro de masa :	Waters ZQ
Detector PDA:	Waters 2996 PDA

Sistema 3 (sistema preparativo y analítico):

Sistema HPLC:	Sistema Agilent 1100
Detector del espectro de masa :	LC/MSD
Detector UV:	Agilent MWD

Condiciones de operación:

5

Condiciones analíticas ácidas:

Eluyente A:	H ₂ O (0.1 % ácido fórmico)
Eluyente B:	CH ₃ CN (0.1% ácido fórmico)
Gradiente:	5-95% eluyente B durante 3.5 minutos (durante 15 minutos con columna 2)
Flujo:	0.8 ml/min
Columna 1:	Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80A, 2.0 x 50 mm
Columna 2:	Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80A, 2.0 x 150 mm

Condiciones analíticas básicas:

Eluyente A:	H ₂ O (10mM NH ₄ HCO ₃ tampón se ajustó a pH=9.2 con NH ₄ OH)
Eluyente B:	CH ₃ CN
Gradiente:	5-95% Eluyente B durante 3.5 minutos
Flujo:	0.8 ml/min
Columna:	Phenomenex Gemini 5μ 2.0 x 50 mm

Condiciones MS (Waters systems):

Voltaje capilar :	3.6 kV (3.40 kV en ES negativo)
Voltaje del cono:	25 V

ES 2 662 359 T3

Temperatura fuente:	120°C
Intervalo de exploración:	125-800 amu
Modo de ionización:	ElectroSpray Positivo, Negativo o Positivo & Negativo

Condiciones MS (Agilent systems):

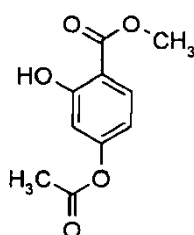
Voltaje capilar:	4000 V (3500 V en ES Negativo)
Fragmentador/Ganancia:	150/1
Temp gas de secado/flujo:	350 °C/13.0 lmin ⁻¹
Presión del nebulizador:	50 psig
Intervalo de exploración:	125-800 amu
Modo de ionización:	ElectroSpray Positivo o Negativo

- 5 Los materiales de partida para cada uno de los ejemplos se encuentran comercialmente disponibles a menos que se especifique de cualquier otra forma.

Ejemplo 1

Etapa 1

Metil éster del ácido 4-acetoxi-2-hidroxi-benzoico



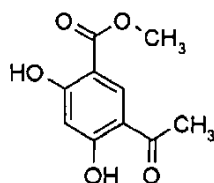
10

Resorcinol metil éster (50 g, 0.298 mol) y N,N-dimetil-4-aminopiridina (0.27 g, 0.0022 mol, 0.74 % en moles) se añadieron a tolueno 0.2 l seguido por anhídrido acético (30 ml, 0.318 mol). La solución se calentó hasta 50 °C por 2h. El solvente se eliminó por evaporación a 50 °C hasta un pequeño volumen y el residuo se azeotropizó once con tolueno. Al aceite residual se añadió inmediatamente tolueno (100 ml) mientras aún estaba caliente y la solución se usó para la Etapa 2 sin purificación adicional.

15

Etapa 2

Metil éster del ácido 5-acetil-2,4-dihidroxi-benzoico



5 La solución de tolueno de la Etapa 1 se enfrió en un baño de hielo bajo N₂ y ácido trifílico (26 ml) se añadió lentamente durante 30 min. Con agitación se formó un sólido blanco fino el cual se disolvió con agitación por 16 h a t.a. para dar una solución amarilla. A la solución se añadió cloruro de acetilo (2 ml) y la solución se agitó a t.a. por 1 h adicional. Esta solución se canuló en una solución fría agitada (0°C) de EtOAc (600 ml) y NaOAc.3H₂O (40 g) disuelta en agua (400 ml). La fase orgánica se lavó con agua (dos veces, 200 ml), salmuera saturada y se evaporó hasta un pequeño volumen sin secar. El residuo se azeotropizó con heptano (dos veces, 100 ml) y se añadió heptano (100 ml) y el sólido cristalino se eliminó por filtración, se lavó bien en sínter con heptano y se secó para dar 49.5 g (79%).

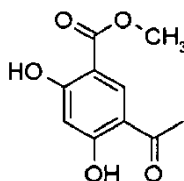
10 Purificación final de los lotes combinados

Los lotes combinados del sólido (96.3g) se calentó hasta ebullición con 10% IPA/heptano (250 ml) después se enfrió hasta t.a. y finalmente hasta 0°C, se filtró y el residuo se secó 72h (bomba de aceite) para dar (88.04 g, 91.5%), puro por hplc, tlc y RMN.

¹H RMN (DMSO-d₆) 12.58 (1H, s), 11.22 (1H, s), 8.33 (1H, s), 6.45 (1H, s), 3.90 (3H, s), 2.62 (3H, s).

15 Etapa 3

Metil éster del ácido 5-acetil-2,4-dihidroxi-benzoico (Procedimiento alternativo)

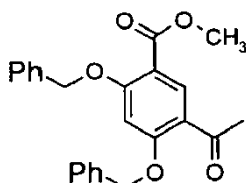


20 Resorcinol metil éster (50 g, 0.298 mol) y resina Amberlyst 15 (40 g) se suspendieron en tolueno 150 ml (bajo una atmósfera de nitrógeno) y la solución se calentó en un baño de aceite a 70°C (temp. interna 56°C). Cloruro de acetilo (22 ml, 308 mmol) se añadió en porciones de 5 ml durante 30 min provocando el desprendimiento de HCl gaseoso (el cual se limpió pasando la corriente de nitrógeno a través de NaOH acuoso). La solución se agitó a 70°C por 4.5 h, después se calentó en un baño de aceite (temperatura interna 96°C) por 3.5 h. La solución se enfrió hasta 50°C y se añadió EtOAc (100 ml) y la solución se filtró mientras estaba a esta temperatura. La resina residual se lavó con EtOAc (50 ml) y los filtrados combinados se concentraron hasta una lechada del sólido cristalino (peso total de 128g para sólido más solvente). A la lechada se añadió heptano (100 ml) y después de 10 min a t.a. el sólido se eliminó por filtración. El residuo se lavó con heptano : tolueno (2 : 1, 60 ml) después con éter de petróleo bp 40- 60°C y se secó *al vacío* para dar una cosecha de 129 g (46.4%) (RMN mostró 3% del material resultante a partir de la saponificación del éster de metilo).

30 El filtrado se evaporó hasta un pequeño volumen y se añadió 20% EtOAc en heptano (100 ml). Después de reposar a t.a. 16 h, se obtuvo una segunda cosecha de 4.75 g (7.6%) (RMN idéntica a la cosecha 1).

Etapa 4

Metil éster del ácido 5-acetil-2,4-bis-benciloxi-benzoico

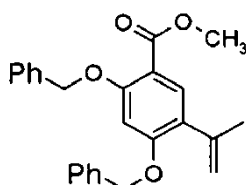


35

- 5 Bromuro de bencilo (70 ml, 0.59 mol) se añadió a una mezcla agitada de metil 5-acetil-2,4-dihidroxibenzoato (60.7 g, 0.29 mol) y carbonato de potasio anhidro (87.8 g, 0.64 mol) en acetonitrilo (800 ml) y la mezcla se agitó y se mantuvo a reflujo por 16 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente la mezcla se vertió en agua (3 l) y se agitó vigorosamente por 2 horas. Los sólidos se recogieron por filtración, se enjuagaron con agua (2 l), se succionaron secos a presión reducida y se secaron hasta una masa constante en un horno de vacío a 60°C toda la noche para proporcionar metil 5-acetil-2,4-bis-benciloxibenzoato (112.1 g, 99%) como un sólido color crema. ¹H RMN (DMSO-d₆) 8.21 (1H, s), 7.55 (4H, m), 7.43 (4H, m), 7.37 (2H, m), 7.04 (1H, s), 5.38 (4H, s), 3.79 (3H, s), 2.48 (3H, s). MS: [M+H]⁺ 391.

Etapa 5

- 10 Metil éster del ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico

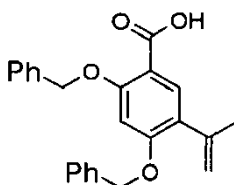


- 15 Se añadió *tert*-butóxido de potasio (29.1 g, 0.26 mol) a una suspensión agitada de bromuro de metiltrifenilfosfonio (92.8 g, 0.26 mol) en tetrahidrofurano anhidro (1 l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 10 minutos con lo cual se añadió metil 5-acetil-2,4-bis-benciloxibenzoato (78.0 g, 0.2 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por unos 30 minutos adicionales. Metanol (100 ml) se añadió para apagar el iluro de fósforo en exceso y el solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar un aceite color naranja que cristalizó en reposo. El residuo se recrystalizó a partir de metanol (330 ml). Los sólidos se recogieron mediante filtración por succión, se lavaron con metanol (50 ml) y se succionaron secos a presión reducida para proporcionar metil 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoato como agujas de color amarillo pálido. El licor madre depositó una segunda cosecha de material después de reposar toda la noche (rendimiento combinado : 56.55 g, 73%) ¹H RMN (DMSO-d₆) 7.59 (1H, s), 7.52 (2H, d), 7.64-7.32 (8H, m), 6.97 (1H, s), 5.28 (2H, s), 5.22 (2H, s), 5.09 (1H, s), 5.04 (1H, s), 3.76 (3H, s), 2.02 (3H, s). MS: [M+H]⁺ 389.

- 25 Una cosecha adicional del éster pudiera obtenerse como sigue. Los residuos de la cristalización se evaporaron hasta secarse *al vacío* y el sólido aceitoso se trató con 5% acetato de etilo en heptano (250 ml). Acetato de etilo se añadió en pequeñas porciones a la mezcla agitada vigorosamente hasta que el residuo depositó una gran cantidad de óxido de trifenilfosfina sólido. Los sólidos se eliminaron por filtración y el filtrado se evaporó hasta secarse al vacío para proporcionar un aceite color naranja. La recrystalización a partir de metanol (como se describió anteriormente) proporcionó más metil 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoato como un sólido cristalino de color amarillo pálido (rendimiento total 85-90%).

Etapa 6

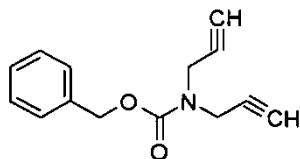
Ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico



- 35 Hidróxido de potasio (10.96 g, 0.19 mmol) se añadió a una suspensión agitada de metil 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoato (61.0 g, 0.16 mol) en metanol (750 ml) y agua (250 ml) y la mezcla se agitó y se mantuvo a reflujo por 16 horas. Después de enfriar, el solvente orgánico se eliminó *al vacío* y la mezcla se acidificó hasta pH 2 o por debajo por la adición de 2M ácido clorhídrico (200 ml). La mezcla se diluyó con agua (2 l) y se extrajo con acetato de etilo (2 l), la capa orgánica se separó y el solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico (58.8 g, 100%) como un sólido incoloro. ¹H RMN (DMSO-d₆) 7.52 (2H, d), 7.47-7.29 (9H, m), 6.82 (1H, s), 5.20 (2H, s), 5.17 (2H, s), 5.06 (1H, s), 5.04 (1H, s), 2.03 (3H, s). MS: [M+H]⁺ 375.

Etapa 7

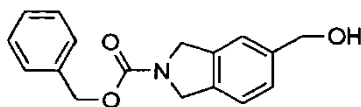
Bencil éster del ácido di-prop-2-inil-carbámico



- 5 A una solución fría (0°C) de dipropargilamina (46.7 g, 502 mmol) en EtOAc (200 ml) y 10% K₂CO₃ acuoso (700 ml, 507 mmol) se añadió lentamente una solución de N-(benciloxicarbonilo)succinimida (125 g, 502 mmol) en EtOAc (500 ml) durante 20 min. La solución se agitó a 0 °C por 2 h, después a t.a. 16h. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con 10% K₂CO₃ acuoso (700 ml, 507 mmol) y después con salmuera saturada (500 ml) y se diluyó hasta 1000 ml con EtOAc para dar una 0.5M solución.

Etapa 8

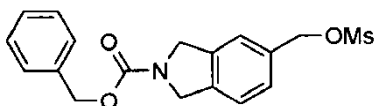
- 10 Bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico



- 15 Una solución de alcohol propargílico (26.4 ml, 424 mmol) en tolueno (120 ml) se desgasificó. La solución de diino 0.5M anterior (440 ml, 220 mmol) se evaporó y el residuo se disolvió en tolueno (80 ml). Esta solución de diino protegida y catalizador de Wilkinson (2.26 g, 2.44 mmol, 1.11% se añadieron en 14 porciones iguales durante un periodo de 2 h con monitoreo constante de la temperatura interna de manera que la temperatura permaneciera a 50-100°C. La solución se dejó enfriar hasta 50 °C durante 30 min cuando la solución se evaporó (para eliminar el exceso de alcohol propargílico). El residuo se calentó con tolueno (500 ml) y carbón (Darco 4-12 mesh, 20 g) a 100 °C por 30 min y después se filtró caliente a través de un lecho de celita y la solución de color marrón se evaporó. El residuo se disolvió en EtOAc (400 ml) a 80 °C cuando se añadió gel de sílice (grado cromatográfico 65 g) y el calentamiento continuó por 20 min. La solución se filtró mientras estaba caliente y después se evaporó (con siembra) para dar un sólido de color marrón pálido. Se añadió 10 % EtOAc/heptano (v/v, 100 ml) y el sólido se eliminó por filtración. El sólido se lavó en el sínter con heptano (100 ml) y después se secó (50 °C, bomba de aceite, 16 h) para dar el compuesto del título 59.0 g (95%). 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.51-7.16 (m, 8H), 5.21 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.61 (s, 2H).
- 20
- 25

Etapa 9

Bencil éster del ácido 5-metanosulfoniloximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

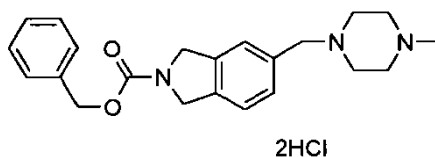


- 30 A una solución de bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (65.75 g, 0.232 mol) en THF (470 ml) y EtOAc (770 ml) se añadió Et₃N (39 ml, 0.28 mol). La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió una solución de metanosulfonil cloruro (19 ml, 0.245 mol) disuelta en EtOAc (50 ml) (de manera que la temp. interna fuera <12 °C). Después de agitar por 2h en el baño de hielo se realizaron otras adiciones de metanosulfonil cloruro (1.9 ml y 0.95 ml) y Et₃N (3.9 ml) (de manera que mediante tlc no quedara material de partida después de 1 h adicional de agitación). Se añadió NaHCO₃ (550 ml) y la solución se agitó por 20 min, después se añadió salmuera saturada (200 ml) y las fases se separaron. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó con siembra para dar un sólido húmedo el cual se usó en la próxima etapa sin secado minucioso.
- 35

Etapa 10

Bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico sal de dihidrocloruro

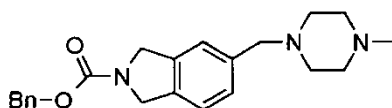
40



5 El sólido de la Etapa 9 (se asume 0.232 mol) se disolvió en acetona (700 ml) y esta solución se añadió durante 45 min a una suspensión fría (temp. interna 15-17 °C) de K₂CO₃ (48 g) y N-metilpiperazina (50 ml, 0.45 mol) en acetona (330 ml). La suspensión se agitó a 15 °C por 3h (eliminación completa del material de partida por tlc) cuando la solución se evaporó hasta un pequeño volumen y el residuo se particionó entre EtOAc (1000 ml) y una mezcla de agua (500 ml) y salmuera saturada (50 ml). La fase orgánica se lavó con una mezcla de agua (500 ml) y salmuera saturada (150 ml) y finalmente se lavó con salmuera saturada (300 ml). La solución se secó (MgSO₄) y se filtró y a esta solución se añadió 1M-HCl en MeOH (430 ml, 0.43 mol). La suspensión se enfrió (0°C por 30 min) y el sólido se eliminó por filtración el cual se lavó con EtOAc y después heptano en el síter y el sólido se secó (bomba de aceite, t.a. 72 h) para dar una cosecha 1 del compuesto del título 66.34 g (65%) como un sólido incoloro. 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.64-7.51 (m, 2H), 7.51-7.29 (m, 6H), 5.23 (s, 2H), 4.79 (dd, J = 16.2, 6.1 Hz, 4H), 4.49 (s, 2H), 3.66 (s, 8H), 3.03 (s, 3H).

Etapa alternativa 10A

15 Bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico dihidrocloruro

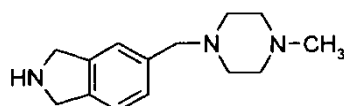


La Etapa 10A puede usarse como una ruta alternativa para reemplazar las Etapas 9 y 10 anteriores.

20 A una suspensión de dióxido de manganeso (15.5 g, 178 mmol) en DCM (100 ml) se añadió bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (3.35g, 11.8 mmol) y después de 6 h de agitación a t.a. se realizó otra adición de dióxido de manganeso (5g, 57 mmol). Después de 1 h adicional de agitación a t.a., se añadió Celite (7g) y la solución se filtró a través de un lecho de Celite™ dando una solución de color amarillo claro pálido. La Celite™ se lavó con DCM y el volumen de la solución orgánica combinada se ajustó a 100 ml por evaporación. N-Metilpiperazina (1.31 ml, 11.8 mmol) y ácido acético (0.68 ml) se añadieron seguido por triacetoxiborohidruro de sodio (4.98 g, 23.5 mmol). La solución amarilla se agitó 16 h dando una solución incolora. A la solución se añadió 2M-HCl (10 ml, 20 mmol) dando una efervescencia. Después de 30 min se añadieron agua (10ml) y K₂CO₃ (5.5g, 39.8 mmol) y la fase orgánica se secó (Na₂SO₄). Después de la filtración, 4M-HCl en dioxano (6 ml) se añadió con agitación y la suspensión se evaporó hasta secarse. El residuo se disolvió en MeOH con calentamiento y después de la evaporación el sólido se lavó en un síter con EtOAc, después petrol (bp 40-60°C) seguido por secado *al vacío* a 50°C para dar el compuesto del título 3.61 g (70%). 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.65-7.51 (2H, m), 7.51-7.27 (6H, m), 5.23 (2H, s), 4.83-4.69 (4H, m), 4.49 (2H, s), 3.66 (8H, d), 3.03 (3H, s)

Etapa 11

5-(4-Metil-piperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol



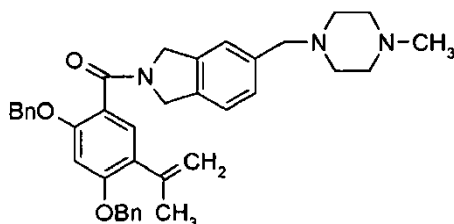
35 A bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico sal de dihidrocloruro (Etapa 10, 59.8 g, 136.7 mmol) se añadió EtOAc (400 ml) y 10% K₂CO₃ acuoso (400 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (200 ml) y después se secó (MgSO₄). La solución se filtró y se evaporó hasta un aceite (el cual se cristalizó en reposo con éter de petróleo (bp 40-60°C)). El sólido se secó al vacío para dar un sólido incoloro: 48.8g (133.5 mmol).

40 Una porción del sólido (24.4 g, 66.8 mmol) se disolvió en MeOH (170 ml) y después de desgasificar la solución y purgar con nitrógeno se añadió 10% Pd/C (1.22 g) y la mezcla se hidrogenó a 1atmósfera por 2.5 h. La solución se filtró y la solución se evaporó y el residuo se azeotropizó dos veces con tolueno a 30-40°C. El residuo se disolvió en DMF (92 ml) y la solución se desgasificó y purgó inmediatamente con N₂.

(NB. El producto en esta etapa es sensible al aire y se oscurece al contacto con el oxígeno. La solución de DMF se usó inmediatamente pero puede almacenarse mediante desgasificación y almacenamiento bajo una atmósfera de N₂)

Etapa 12

5 (2,4-Bis-benciloxi-5-isopropenil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

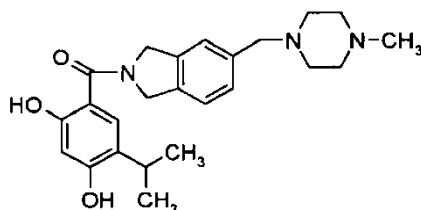


Una solución del resorcinol ácido (Etapa 6, 23.7 g, 63.4 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (10.21 g, 66.7 mmol) se disolvieron en DMF (92 ml) y a esta solución se añadió N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclicloruro (12.8 g, 66.8 mmol). La solución se agitó a t.a. por 40 min y esta solución se añadió a la solución de la amina de la Etapa 11 (66.8 mmol) junto con los lavados de DMF (5 ml). La solución se desgasificó y la solución se agitó a t.a. por 16 h. A la solución se añadió 10% K₂CO₃ (500 ml) y EtOAc (500 ml) y la fase orgánica se lavó secuencialmente con 10% K₂CO₃ (500 ml), agua (4 x 100 ml) y salmuera saturada (200 ml). La solución se evaporó hasta un pequeño volumen y se añadió 20% EtOAc en heptano (250 ml) y se almacenó a 0°C. El sólido que se había formado se eliminó por filtración, se lavó con heptano dos veces y se secó *al vacío* para dar el compuesto del título 35.05 g (94.4 %). 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.49-7.10 (m, 14H), 6.86 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 2.5 Hz, 4H), 5.09 (d, J = 11.3 Hz, 2H), 4.88 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.54 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 2.50 (s, 7H), 2.28 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 2.11 (s, 3H).

Etapa 13

(2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

20



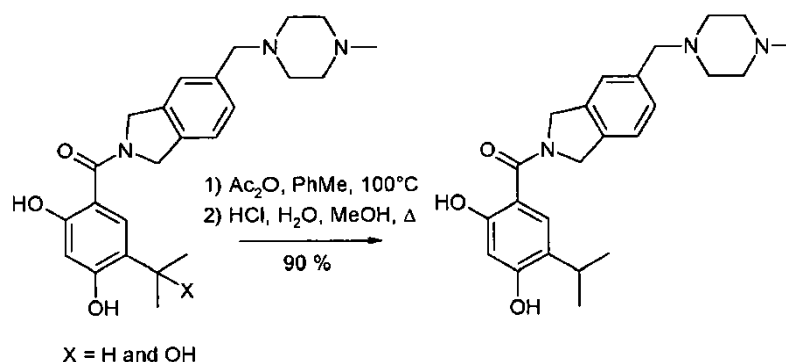
El producto de la Etapa 12 (4.7 g) se disolvió en 1:1 MeOH/agua (98 ml) y después de purgar con N₂ se añadieron 10% Pd/C y K₂CO₃ (2.38g, 17.2 mmol) y la suspensión se hidrogenó por 16 h bajo una atmósfera de H₂. La solución se filtró y el solvente se evaporó. Al residuo se añadió 2M-HCl acuoso (40 ml) y la solución se lavó con 1:1 EtOAc/petrol (40 ml x 2) y después el pH se ajustó a pH 8.5 por la adición de NaOH y se añadió EtOAc (50 ml). La solución se calentó hasta 60 °C y la fase acuosa se eliminó. La fase orgánica caliente se lavó con agua (30 ml) y después se evaporó hasta un pequeño volumen (aprox. 5 ml) y se dejó reposar a t.a. 16h con siembra. Al material cristalino se añadió 1:1 EtOAc/ petrol (10 ml) y la mezcla se filtró y se secó para dar el compuesto del título como la base libre 1.76 g 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.29 (s, 3H), 7.19 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.91 (s, 4H), 3.56 (s, 2H), 3.28-3.15 (m, 1H), 2.53 (s, 8H), 2.31 (s, 3H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 7H).

Etapa opcional 14

Purificación de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

En algunos lotes del producto, el compuesto del título (X = H en la fórmula) puede contener pequeñas cantidades de la impureza 2,4-dihidroxi-5-(2-hidroxiprop-2-il)-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona (X = OH en la fórmula). Las impurezas pueden eliminarse por el siguiente método.

35



5 Anhídrido acético (1.04 ml, 11.0 mmol) se añadió a una suspensión agitada de 2-(2,4-dihidroxi-5-isopropilbenzoyl)-5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidroisoindol impuro (2.05 g, 5.0 mmol) en tolueno (20 ml) y la mezcla resultante se agitó y se mantuvo a 100 °C por 16 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente el solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar un aceite marrón el cual se disolvió en metanol (20 ml). Se añadió ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y la mezcla se agitó y se mantuvo a reflujo por 5 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, el solvente orgánico y el material volátil se eliminaron *al vacío* y el residuo acuoso se diluyó con agua (25 ml) y se basificó hasta pH 8 con agitación vigorosa mediante la adición cuidadosa de 10% solución de carbonato de potasio acuosa. Se añadió 50% acetato de etilo en heptano (50 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente por 16 horas. El material sólido se recogió mediante filtración por succión, se enjuagaron con 50% acetato de etilo en heptano (50 ml), se succionó seco a presión reducida y se secó toda la noche en un horno de vacío a 50 °C para proporcionar 2-(2,4-dihidroxi-5-isopropilbenzoyl)-5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidroisoindol (1.85 g, 90%) como un sólido blanco hueso. ¹H RMN (DMSO-d₆) 10.07 (1H, br s), 9.60 (1H, br s), 7.24 (3H, m), 7.06 (1H, s), 6.40 (1H, s), 4.76 (4H, br s), 3.44 (2H, s), 3.10 (1H, m), 2.32 (8H, m), 2.14 (3H, s), 1.15 (6H, d). MS: [M+H]⁺ 410.

Ejemplo 2

(2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato (forma FL1)

20 El producto del Ejemplo 1 (1.24 g, 3.303 mmol) se suspendió en etanol (3 ml) y EtOAc (5 ml) y se añadió una solución de ácido L-láctico (0.285 g, 3.13 mmol) disuelto en etanol (3 ml). La solución se calentó hasta que se volvió clara y después se filtró. EtOAc (5 ml) se usó para lavar el filtro y los filtrados combinados se agitaron a t.a. por 2 h con siembra. La masa cristalina que se formó se eliminó por filtración, se lavó con EtOAc y después se secó al vacío a 50°C para dar el compuesto del título 1.29 g. ¹H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.30 (s, 3H), 7.18 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.91 (s, 4H), 4.08 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.70-3.63 (m, 2H), 3.28-3.15 (m, 1H), 3.01 (s, 4H), 2.68 (m, 7H), 1.36 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

Ejemplo 2A

(2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato

30 El Ejemplo 2A describe una ruta de síntesis que contiene esencialmente las mismas Etapas del proceso que la ruta descrita en los Ejemplos 1 y 2 pero en donde las condiciones del proceso son más adecuadas para las reacciones a gran escala.

Etapa 1

Metil éster del ácido 4-acetoxi-2-hidroxi-benzoico

35 A una solución caliente (50°C) de resorcinol metil éster (16.5 Kg, 98.1 mol) y N,N-dimetil-4-aminopiridina (89.1 g, 0.73 mol, 7.4 % en moles) en tolueno (66 l) se añadió lentamente (durante 2 h) anhídrido acético (9.9 l, 104.9 mol). La solución se calentó hasta 50 °C por una 1.5h adicional y después el solvente se eliminó por evaporación a 50 °C hasta un pequeño volumen y el residuo se azeotropizó una vez con tolueno. Al aceite residual se añadió inmediatamente tolueno (33 l) mientras aún estaba caliente y la solución se usó para la Etapa 2 sin purificación adicional.

Etapa 2

40 Metil éster del ácido 5-acetil-2,4-dihidroxi-benzoico

- La solución de tolueno de la Etapa 1 se enfrió en un baño de hielo bajo N₂ y ácido tríflico (9.44 l) se añadió lentamente durante 3 h. Con agitación se formó un sólido blanco fino el cual se disolvió con calentamiento hasta la t.a. durante 20 h y después agitación a t.a. por 37 h para dar una solución amarilla. A la solución se añadió cloruro de acetilo (726 ml) y la solución se agitó a t.a. por 1 h adicional. Esta solución se canuló en una solución fría agitada (0°C) de EtOAc (217.8 l) y NaOAc.3H₂O (14.52 Kg) disuelta en agua (145 l). La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (dos veces, 72.6 l), y se evaporó hasta 5.5 Kg. Se añadió tolueno : isopropanol (2 : 3) y el sólido cristalino se eliminó por filtración y se secó para dar 12.6 Kg (61% durante 2 Etapas), mp 124-126 °C.

Etapa 3

Metil éster del ácido 5-acetil-2,4-bis-benciloxi-benzoico

- 10 A una solución agitada de bromuro de bencilo (16.14 l, 136 mol) y carbonato de potasio anhidro (20.25 Kg, 147.6 mol) en acetonitrilo (184.5 l) se añadió metil 5-acetil-2,4-dihidroxibenzoato (14 Kg, 66.6 mol, Etapa 2) en 6 porciones durante 5 h. La mezcla se agitó y se mantuvo a reflujo por 20 horas, la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente se vertió en agua (682 l) y se agitó vigorosamente por 2 horas. Los sólidos se recogieron por centrifugación y se secaron a presión reducida hasta una masa constante en un horno de vacío a 60°C toda la noche para proporcionar metil 5-acetil-2,4-bis-benciloxibenzoato (23.5 Kg, 97.3%) como un sólido color crema mp 114-115 °C.

Etapa 4

Metil éster del ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico

- 20 Una solución de *tert*-butóxido de potasio (6.72 Kg, 60.1 mol) en THF anhidro (60 l) se añadió durante 3 h a una suspensión agitada de bromuro de metiltrifenilfosfonio (21.43 Kg, 60.1 mol) y metil 5-acetil-2,4-bis-benciloxibenzoato (21.3 Kg, 54.6 mol, Etapa 3) en tetrahidrofurano anhidro (213 l) a 15 °C. La mezcla se agitó a 15 °C por 70 min y después se calentó hasta 20 °C durante 60 min. Metanol (27.3 l) se añadió para apagar el exceso de fósforo en exceso y el solvente se concentró *al vacío* seguido por la adición de EtOAc y agua. La fase orgánica se trató con carbón activado, se filtró y se evaporó hasta un pequeño volumen. El residuo se cristalizó a partir de MeOH ebuliendo y los sólidos se recogieron mediante filtración por succión, se lavaron con metanol y se secaron a presión reducida para proporcionar metil 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoato 18.1 Kg (85%) como agujas de color amarillo pálido mp 92-94 °C (99.6% puro por hplc).

Etapa 5

Ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico

- 30 Hidróxido de potasio (0.527 Kg, 9.4 mol) se añadió a una suspensión agitada de metil 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoato (3.1 Kg, 8 mol, Etapa 4) en metanol (18.6 l) y agua (12.4 l) y la mezcla se agitó y se mantuvo a reflujo por 3 horas. El metanol se eliminó bajo vacío parcial del recipiente, y a la solución restante se añadió tolueno (62 l). La solución se calentó hasta 40 °C y a la mezcla se añadió HCl conc. (1.36l). La mezcla bifásica se calentó hasta 50 °C y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con agua (31 l) a 50 °C y la fase orgánica se evaporó a presión reducida para dar ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico 2.851 Kg (95% de rendimiento) como un sólido incoloro.

Etapa 6

Bencil éster del ácido di-prop-2-inil-carbámico

- 40 A una solución fría (5 °C) de K₂CO₃ (4 Kg, 29.0 mol) en agua (17.5 l) y tolueno (12.5 l) se añadió dipropargilamina (2.50 Kg, 26.88 mol). Se añadió benciloxicloroformato (4.8 Kg, 28.14 mol) a una velocidad de manera que T<10 °C. La solución se agitó a 5 °C por 10 min y después se dejó calentar hasta la t.a. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó con 0.2M HCl (12.5 l), NaHCO₃ sat. (13.5 l) y salmuera (17 l) y la solución resultante se usó en la Etapa 7 (ensayada para contener 6.23 Kg, 102 % basado en una porción evaporada).

Etapa 7

- 45 Bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

- 50 Una solución de alcohol propargílico (2.11 Kg, 37.7 mol) en tolueno (32.48l) se desgasificó y se calentó hasta 55 °C. La solución de bencil éster del ácido di-prop-2-inil-carbámico (4.06 Kg, 17.86 mol, Etapa 6) en tolueno y catalizador de Wilkinsons (0.162 Kg) se añadieron en 10 porciones iguales de manera que la temperatura fuera <65 °C (se dejó bajar la exoterma antes que se realizara la siguiente adición). La solución se agitó después a 55 °C por 1 h y después se enfrió hasta 20 °C. se añadió DCM (8.12 l) y la mezcla se concentró hasta un pequeño volumen. Se añadió tolueno (8l) y la solución se evaporó hasta un peso constante dando el compuesto del título 5.72 Kg (113%).

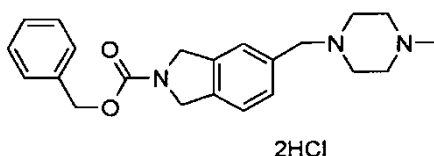
Etapa 8

Bencil éster del ácido 5-metanosulfoniloximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

5 A una solución fría (5 °C) de bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (11 Kg, 38.8 mol, Etapa 7) y Et₃N (7.04 l, 50.6 mol) en DCM (55 l) se añadió metanosulfonil cloruro (2.97 l, 38.4 mol) de manera que la temp. interna fuera <10 °C. Después de agitar por 0.5 h a 5 °C la solución se usó más abajo en la Etapa 9.

Etapa 9

Bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico sal de dihidrocloruro



10 El sólido de la Etapa 8 (se asume 0.232 mol) se disolvió en acetona (700 ml) y esta solución se añadió durante 45 min a una suspensión fría (temp. interna 15-17 °C) de K₂CO₃ (48 g) y N-metilpiperazina (50 ml, 0.45 mol) en acetona (330 ml). La suspensión se agitó a 15 °C por 3h (eliminación completa del material de partida por tlc) cuando la solución se evaporó hasta un pequeño volumen y el residuo se particionó entre EtOAc (1000 ml) y una mezcla de agua (500 ml) y salmuera saturada (50 ml). La fase orgánica se lavó con una mezcla de agua (500 ml) y salmuera saturada (150 ml) y finalmente se lavó con salmuera saturada (300 ml). La solución se secó (MgSO₄) y se filtró y a esta solución se añadió 1M-HCl en MeOH (430 ml, 0.43 mol). La suspensión se enfrió (0°C por 30 min) y el sólido se eliminó por filtración el cual se lavó con EtOAc y después heptano en el síter y el sólido se secó (bomba de aceite, t.a. 72 h) para dar una cosecha 1 del compuesto del título 66.34 g (65%) como un sólido incoloro. 1H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.64-7.51 (m, 2H), 7.51-7.29 (m, 6H), 5.23 (s, 2H), 4.79 (dd, J = 16.2, 6.1 Hz, 4H), 4.49 (s, 2H), 3.66 (s, 8H), 3.03 (s, 3H).

Etapa 9

Bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

25 DCM (33l) y N-metilpiperazina (21.45 l, 193.4 mol) se agitaron a 25 °C y la solución de la Etapa 8 se añadió durante un mínimo de 30 min de manera que la temperatura fuera 20 - 30 °C. Después de agitar la solución por unos 30 min adicionales, se añadió agua (55 l) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 55 l). El producto se extrajo en 0.8M HCl (66 l) y las capas se separaron. La fase acuosa se lavó con DCM (55 l) y después se basificó con 2M NaOH hasta pH 10-11 y el producto se extrajo en EtOAc (2 x 55 l). Las fases orgánicas combinadas se filtraron para eliminar los sólidos y se evaporaron seguido por azeotropización con tolueno y secado hasta un peso constante para dar el compuesto del título, 6.63kg (47% de rendimiento, 98% puro por hplc).

30 Etapa 10

5-(4-Metil-piperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol

35 A una solución desgasificada de bencil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico (Etapa 9, 1.3 Kg, 3.55 mol) disuelto en EtOH (13 l) se añadió 10% Pd/C (0.065 Kg). Se pasó hidrógeno a través de la mezcla a 30 °C por 4 h o hasta el completamiento por RMN. La solución se agitó después por 1 h bajo una atmósfera de N₂ y después se filtró para eliminar el catalizador a través de un filtro GF/F seguido por filtración a través de un filtro Cuno. El filtrado se evaporó hasta un pequeño volumen, se azeotropizó con tolueno (3.9 l) y se secó hasta un peso constante produciendo el compuesto del título como un sólido aceitoso de color rojo/negro (0.78 Kg) el cual se almacenó bajo nitrógeno hasta que se necesitó.

Etapa 11

40 (2,4-Bis-benciloxi-5-isopropenil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

1,1'-Carbonildiimidazol (4.82 Kg, 29.8 mol) se añadió a una solución de ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico (10.58 Kg, 28.3 mol, Etapa 5) en DMF (21.2 l) a 25 °C. Después de 20 min a 25 °C una solución de 5-(4-Metil-piperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol (7.2 Kg, 31.1 mol, Etapa 10) en DMF (7.2 l) se mantuvo a una temperatura por debajo de 35 °C y la solución se agitó a 25 °C por un mínimo de 12 h. El sólido que se había

formado se eliminó por filtración, se lavó con acetato de isopropilo (2 x 21.6 l) y se secó a 35 °C hasta un peso constante para dar el compuesto del título 8.7 Kg (77% de rendimiento, pureza por hplc 97.5%).

Etapa 12

(2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

- 5 El producto de la Etapa 11 (0.9 Kg, 1.53 mol) se disolvió en isopropanol (6.8l) y agua (1.04 l) y después de purgar con N₂ se añadieron 10% Pd/C (90g) y K₂CO₃ (0.212 Kg, 1.53 mol) y la suspensión se hidrogenó por 60 a 70 min bajo una presión de H₂ de 3 bar. La solución se diluyó con agua (0.5 l) y se filtró. Al filtrado se añadió HCl acuoso (30% ácido clorhídrico, 0.85 Kg se diluyó con agua 5.42 Kg) y la solución se concentró a 60 °C al vacío (eliminando 10 l de isopropanol). Se añadió agua (0.45 l) a la solución y la concentración continuó (hasta que otros 10 l de isopropanol habían sido eliminados). La fase acuosa se lavó con EtOAc (4.61 l), se diluyó con acetonitrilo (4.06l) y se neutralizó hasta pH 7.5- 8.5 por la adición de solución de amoníaco conc. (0.35 Kg). La suspensión se agitó por 2.5 h y después el sólido se eliminó por filtración. El residuo se lavó con acetonitrilo (2 x 0.8 l) y se secó a 40 °C hasta un peso constante para dar el compuesto del título 588 g (94 % de rendimiento).

Etapa 13

- 15 (2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato (forma FL1)

El producto de la Etapa 12 (646 g, 1.58 mol) se disolvió en etanol (5.17 l) y la solución se filtró. Una solución de ácido L-láctico (142 g, 1.58 mol) se disolvió en etanol (2.59 l) se filtró y se añadió a la solución de la solución filtrada (anterior) y después a la mezcla se añadió EtOAc (7.75 l). La suspensión se agitó a t.a. por 12 h y después se enfrió hasta 5 °C por unas 2h adicionales. El sólido que se había formado se eliminó por filtración, se lavó con EtOAc (2 x 2.58 l) y heptano (2 x 1.94 l) y se secó hasta un peso constante a 35 °C dando el compuesto del título (581 g, 74 % de rendimiento).

Ejemplo 3

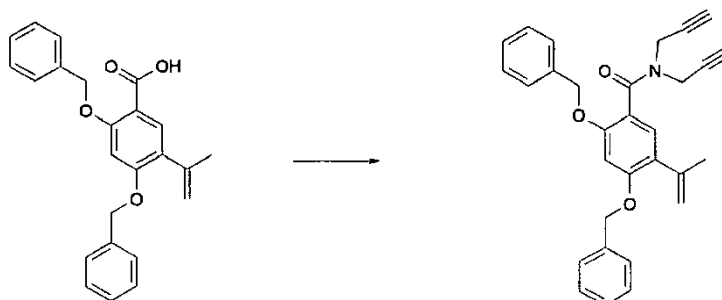
- 25 (2,4-Dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de dihidrocloruro (forma FH3)

El producto del Ejemplo 1 (0.49 g, 1 mmol) se disolvió en etanol (10 ml) y 4M HCl en dioxano (0.5 ml, 2 mmol) se disolvió con calentamiento y después la solución se evaporó hasta secarse. El residuo se disolvió con calentamiento etanol : agua (9:1; 5 ml). La solución se agitó por 16 h con siembra y el sólido que se formó se eliminó por filtración y se secó *al vacío* para dar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, Me-d₃-OD): 7.63-7.52 (m, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.96 (d, J = 7.0 Hz, 4H), 4.47 (s, 2H), 3.87-3.40 (m, 8H), 3.30-3.16 (m, 1H), 3.02 (s, 3H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

Ejemplo 4

Síntesis de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona (ejemplo comparativo)

- 35 4A. Síntesis de 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-N,N-di-prop-2-inil-benzamida

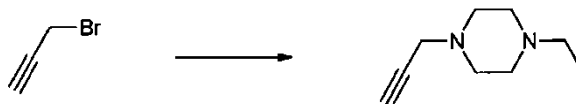


- 40 Una solución agitada de ácido 2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-benzoico (Ejemplo 1 Etapa 6) (1 equivalente) en diclorometano (10 ml) se trató sucesivamente con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclicloruro (1.2 equivalentes), 1-hidroxibenzotriazol (1.2 equivalentes) y dipropargilamina (1.5 equivalentes) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se lavó sucesivamente con 2M ácido clorhídrico y 2M hidróxido de

sodio, la capa orgánica se separó y el solvente se eliminó al vacío para proporcionar el producto el cual se obtuvo puro o se purificó por cromatografía de columna en sílice (eluyendo con mezclas de acetato de etilo en éter de petróleo o metanol en acetato de etilo como sea apropiado). MS: $[M+H]^+$ 450

4B. Síntesis de 1-etil-4-prop-2-inil-piperazina

5

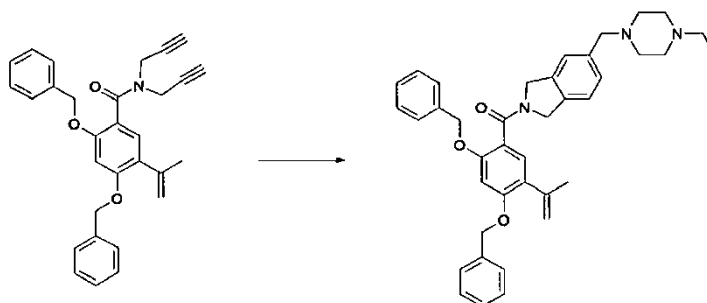


10

A la 1-etilpiperazina (2.33 g, 20.2 mmol) y K_2CO_3 (2.79 g, 20.2 mmol) en acetona (27 ml) se añadió bromuro de propargilo (2.00 g, 13.5 mmol) en forma de gotas a 0 °C bajo N_2 . La reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se filtró y las sales se lavaron con una pequeña cantidad de acetona. Los filtrados se combinaron y se evaporaron gradualmente hasta la concentración. El residuo se tomó en EtOAc y se lavó con agua. La fase acuosa se extrajo nuevamente con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$. El producto se filtró y se evaporó hasta secarse para dejar un aceite color naranja pálido.

4C. Síntesis de (2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-fenil)-[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

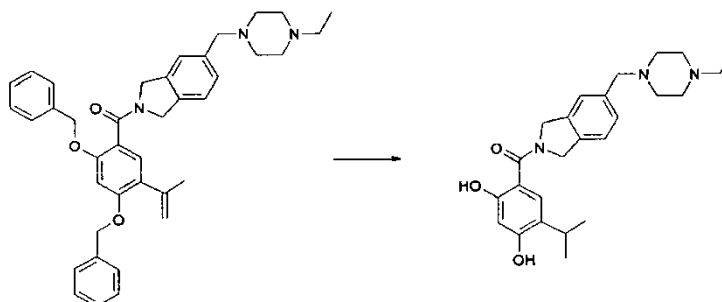
15



El compuesto del título se preparó usando el método del Ejemplo 5B excepto que la purificación se llevó a cabo usando cromatografía de columna en lugar de formación de sal. MS: $[M+H]^+$ 602.

4D. Síntesis de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona

20



25

La hidrogenación de (2,4-bis-benciloxi-5-isopropenil-fenil)-[5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona usando el método descrito en el Ejemplo 1 Etapa 13 excepto que se cambiaron los procedimientos de tratamiento final y purificación. Así, después de la hidrogenación, el catalizador se filtró y el filtrado se evaporó. Se añadieron agua y EtOAc al producto y la capa acuosa se neutralizó. El producto se extrajo después con EtOAc (x3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$. La solución resultante se filtró y se evaporó hasta secarse para dejar un sólido/aceite amarillo pálido. El producto se purificó por cromatografía de columna (elución en gradiente 100% DCM a 10 % MeOH en DCM) para producir el producto como un sólido amarillo pálido. MS: $[M+H]^+$ 424.

Ejemplo 5

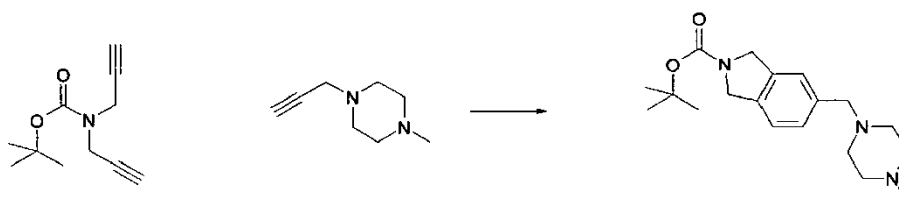
Síntesis alternativa de 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol

5A. Síntesis de 1-metil-4-prop-2-inil-piperazina



- 5 A la 1-metilpiperazina (37.7 ml, 337 mmol) y K_2CO_3 (46.6 g, 337 mmol) en acetona (380 ml) se añadió bromuro de propargilo (25 ml, 225 mmol, 80% en tolueno) en acetona (70 ml) en forma de gotas a 0 °C bajo N_2 . La temperatura interna de la reacción se mantuvo <10 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. La reacción se filtró, y las sales se lavaron con porciones pequeñas de acetona (x2). Los filtrados se combinaron y se evaporaron hasta la concentración (gradualmente). Al residuo se añadió agua y el producto se extrajo con DCM (x3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$. El producto se filtró y se evaporó hasta secarse para producir 1-metil-4-prop-2-inil-piperazina como un aceite amarillo.

5B. Síntesis de terc-butil éster del ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico



- 15 Una solución de N-boc-dipropargilamina (36.3 ml, 226 mmol, 86% puro) en EtOAc (30 ml) se preparó y desgasificó por burbujeo a través de N_2 , en un embudo de separación. Se añadió tris(trifenilfosfina)rodio(I) cloruro (1.39 g, 1.50 mmol, 1% en moles) a EtOAc pre-desgasificado (15 ml) en un segundo embudo de separación. (NB $CpRu(COD)Cl$ puede además usarse como un catalizador alternativo).

- 20 En el matraz reactor principal, 1-propargil-4-metilpiperazina (32.3 ml, 150 mmol, 90% puro) se diluyó con EtOAc (75 ml) y se desgasificó burbujeando N_2 a través de la mezcla. La mezcla se enfrió en un baño de agua helada y después se añadió tris(trifenilfosfina)rodio(I) cloruro (1.39 g, 1 % en moles) en EtOAc. Se emprendió la adición lenta de N-boc-dipropargilamina /EtOAc para producir una exoterma suave. La temperatura interna se elevó hasta 25 °C y permaneció a esta temperatura. Después que la adición se completó en aproximadamente un tercio (~45 minutos), la exoterma declinó (a pesar de la adición lenta continua de N-boc-dipropargilamina/EtOAc). Otra porción del catalizador de tris(trifenilfosfina) rodio(I) cloruro (1.39 g, 1 % en moles) en EtOAc (15 ml, pre-desgasificado) se preparó y se añadió muy lentamente a la reacción. Después de un par de minutos se inició una nueva exoterma y aumentó hasta 30 °C. La temperatura de la reacción se enfrió gradualmente por la adición de una pequeña cantidad de hielo al baño de agua. Una vez que la exoterma comienza a declinar, se continuó la adición lenta de N-boc-dipropargilamina /EtOAc. La adición entera se llevó a cabo durante un periodo de 2 horas. La mezcla de reacción se dejó después a temperatura ambiente toda la noche antes de diluir con EtOAc y lavar con NH_4Cl (x2) (acuoso, saturado) para eliminar el exceso de 1-propargil-4-metilpiperazina. La mezcla se diluyó con una pequeña cantidad de agua para disolver las sales. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera y se secó sobre $MgSO_4$. El producto se filtró y se evaporó hasta secarse para dejar un aceite marrón.

- 35 Al residuo de aceite obtenido se añadió n-heptano. El aceite/heptano se dejó reposar (~10 minutos) hasta que se formó un precipitado rojo. El precipitado se filtró y se lavó con n-heptano fresco (x2). Los filtrados se secaron para producir el producto como un aceite rojo.

- 40 El producto deseado se purificó adicionalmente formando sal de ácido toluenosulfónico (TsOH). Así, el producto crudo se tomó en MeOH (20 ml) y TsOH. Se añadió H_2O (1 eq para estimar la pureza por RMN). La solución se evaporó hasta secarse, y después se disolvió en tolueno (x1) y se evaporó nuevamente. El producto resultante se tomó en éter. Después de unos pocos minutos, se formó un precipitado y una solución. El precipitado se filtró y se lavó con más éter (x2) hasta que el filtrado fue incoloro. El sólido amarillo se secó para producir el producto como la sal de TsOH. MS: $[M+H]^+$ 332.

5C. Síntesis de 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol



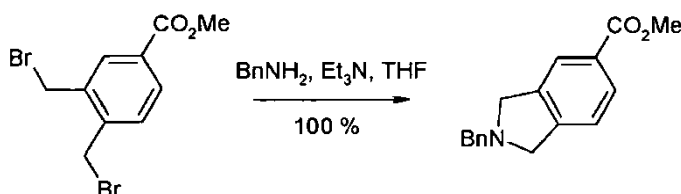
La sal de tosilato de isoindolina se tomó en DCM (0.3 M) y TFA (12 eq.) se añadió lentamente a 0 °C. La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se evaporó hasta secarse y después con tolueno/MeOH (X3) para producir el producto como una mezcla de sales de adición ácidas. MS: $[M+H]^+$ 232.

5 El compuesto del Ejemplo 5C puede usarse en el método del Ejemplo 1 Etapa 12.

Ejemplo 6

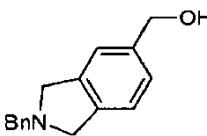
Síntesis alternativa de bencil éster del ácido 5-hidroxi metil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico

6A. metil 2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-carboxilato



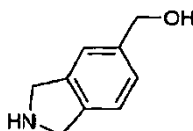
10 Bencilamina (3.21 g, 30.0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (25 ml) se añadió a una mezcla agitada de metil 3,4-bis-(bromometil)benzoato (9.66 g, 30.0 mmol) (obtenida de Fluorochem) y trietilamina (9 ml, 64.7 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (50 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. El solvente se eliminó *al vacío* a 40 °C y el residuo se particionó entre acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). La capa orgánica se lavó con una porción adicional de agua (100 ml), se separó y el solvente se eliminó *al vacío* a 40 °C para proporcionar metil 2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-carboxilato como un sólido color naranja pálido que se usó inmediatamente sin purificación adicional como se describe más abajo. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7.82 (2H, m), 7.40-7.25 (6H, m), 3.90 (3H, s), 3.88 (2H, s), 3.84 (4H, s). MS: $[M+H]^+$ 268.

6B. (2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol

20 

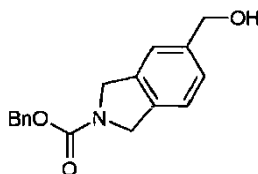
25 Metil 2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-carboxilato (de arriba) se disolvió en tetrahidrofurano anhidro (75 ml) y se añadió en forma de gotas durante 15 minutos a una suspensión agitada rápidamente de hidruro de litio aluminio (1.71 g, 45.0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (75 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 horas con lo cual el exceso de hidruro de litio aluminio se destruyó por la adición lenta en forma de gotas de 1M solución de sulfato de sodio (12 ml). Los sólidos se eliminaron por filtración, se enjuagaron con acetato de etilo (2 x 50 ml) y se succionaron secos. El solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar (2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol (7.15 g, 99%) como un sólido color canela. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) 7.40-7.30 (4H, m), 7.28 (1H, m), 7.17-7.10 (3H, m), 5.10 (1H, t), 4.47 (2H, d), 3.85 (2H, s), 3.82 (2H, s), 3.80 (2H, s). MS: $[M+H]^+$ 240.

30 6C. (2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol



Se añadió 10% paladio sobre carbón activado (200 mg) a una solución de (2-bencil-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol (2.39 g, 10.0 mmol) en etanol (60 ml) y la mezcla resultante se colocó en un aparato Parr, se calentó hasta 50 °C y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a 60 psi por 30 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente la mezcla se filtró bajo gravedad, los sólidos se enjuagaron con etanol (2 x 10 ml) y el solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar (2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol (1.49 g, 100%) como un sólido blanco hueso. ¹H RMN (DMSO-d₆) 7.20 (1H, s), 7.18 (1H, d), 7.12 (1H, d), 5.10 (1H, br s), 4.46 (2H, s), 4.05 (4H, s). MS: [M+H]⁺ 150.

6D. Bencil éster del ácido 5-hidroximetil-1,3-dihidro-isoindol-2-carboxílico



Una mezcla de (2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-metanol (1.34 g, 9.0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (50 ml) se calentó gradualmente para ayudar a la disolución y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se añadió trietilamina (1.5 ml, 10.8 mmol) y la mezcla agitada se trató en forma de gotas con cloroformato de bencilo (1.35 ml, 9.5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. El solvente se eliminó *al vacío* y el residuo se particionó entre acetato de etilo (30 ml) y 2M ácido clorhídrico (30 ml). La capa orgánica se lavó con agua (30 ml), se separó y el solvente se eliminó *al vacío* para proporcionar un aceite rosa que se solidificó con el reposo. Los sólidos se trituraron con 10% acetato de etilo en hexano (10 ml), se filtraron, se enjuagaron con heptano (10 ml) y se succionaron secos para proporcionar el compuesto del título (2.5 g, 98%) como un sólido de color rosa pálido. ¹H RMN (DMSO-d₆) 7.45-7.21 (8H, m), 5.20 (1H, t), 5.17 (2H, s), 4.71 (2H, br s), 4.64 (2H, br s), 4.50 (2H, d). MS: [M+H]⁺ 284.

El compuesto del título puede usarse en la Etapa 9 del Ejemplo 1.

Actividad biológica

Ejemplo 7

Calorimetría de valoración isotérmica

La capacidad de los compuestos de la invención de unirse a las proteínas Hsp90 humanas se determinó usando calorimetría de valoración isotérmica.

Los experimentos de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) se realizaron con un calorímetro de valoración VP-ITC (Microcal Inc., Northampton, MA, Estados Unidos). La clonación, expresión, y purificación del dominio N-terminal de la Hsp90 α humana se realizaron de acuerdo con los métodos publicados (Jez, J.M. y otros, Chem Biol. 2003 Abr;10(4):361-8.) Las soluciones del dominio N-terminal de la Hsp90 α y el compuesto se prepararon en un tampón que comprende 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 5% DMSO, pH 7.4. Todas las soluciones se filtraron y desgasificaron antes de que se llevara a cabo una valoración. El cambio de entalpía resultante de cada inyección de ligando se obtuvo a través de la integración de la señal calorimétrica. Los datos se analizaron usando Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Los calores de la dilución se estimaron usando las inyecciones finales de cada valoración individual y se sustrajeron antes de ajustar los datos. Los diferentes formatos experimentales ITC se emplearon para obtener las constantes de disociación del compuesto (K_d) durante un amplio intervalo de afinidades. Para los compuestos de unión más débil se usó un método ITC de valor c inferior (Turnbull W.B. & Daranas A.H. J. Am. Chem. Soc. 2003 dic 3;125(48):14859-66) en el cual la proteína está presente a 10-20 μ M en la celda calorimétrica y la concentración del compuesto era 1-20 mM en la jeringa de inyección. En este tipo de experimento el parámetro estequiométrico (N) se fijó en 1 para el ajuste de datos. Para K_d en el intervalo de 20-0.004 μ M el experimento se configuró de manera que la concentración del sitio de unión dividida por K_d (valor c) estuviera entre 5 y 1000. Para la mayoría de estos experimentos la concentración de proteína en la celda calorimétrica estaba en el intervalo de 4-100 μ M y la concentración del ligando en la jeringa de inyección estaba en el intervalo de 50-1500 μ M. En raros casos donde la solubilidad del compuesto estaba limitada, la solución del compuesto se colocó en la celda calorimétrica y se valoró con la proteína de la jeringa de inyección, manteniendo un valor c entre 5 y 1000. Los experimentos de ITC de competencia se usaron para acceder a K_d < 4 nM realizando la valoración en presencia de un competidor de unión más débil de acuerdo con el método descrito en Sigurskjold B.W. Anal Biochem. 2000 ene. 15; 277(2):260-6.

Compuesto (1) tiene un valor de K_d de menos de 0.1 micromolar.

Ejemplo 8

Actividad anti-proliferativa

5 Las actividades anti-proliferativas de los compuestos de la invención pueden determinarse midiendo la capacidad de los compuestos para inhibir el crecimiento celular en un número de líneas celulares tal como la línea celular HCT116 de cáncer de colon humano. La inhibición del crecimiento celular se midió usando el ensayo Alamar Blue (Nociari, M. M, Shalev, A., Benias, P., Russo, C. Journal of Immunological Methods 1998, 213, 157-167). El método se basa en la capacidad de las células viables para reducir la resazurina a su producto fluorescente resorufina. Para cada ensayo de proliferación, las células se colocaron en placas de 96 pocillos y se dejaron recuperar por 16 horas antes de la adición de los compuestos inhibidores por otras 72 horas. Al final del período de incubación se añadió 10% (v/v) de Alamar Blue y se incubó por otras 6 horas antes de la determinación del producto fluorescente a 535nm ex/590nm em. En el caso del ensayo celular no proliferativo, las células se mantuvieron en confluencia por 96 horas antes de la adición de los compuestos inhibidores por otras 72 horas. El número de células viables se determinó por el ensayo Alamar Blue como antes. Las líneas celulares pueden obtenerse a partir de la ECACC (Colección Europea de Cultivos célula).

10 El compuesto (1) tiene un valor IC_{50} de menos de 0.1 micromolar contra la línea celular HCT116.

15 La actividad anti-proliferativa de (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona sal de L-lactato se probó en ensayos contra cien líneas celulares por Oncodesign (Dijon, Francia). Los valores IC_{50} contra cada línea celular se exponen en la tabla más abajo y las figuras en la tabla se refieren a las concentraciones nanomolares. Los compuestos se probaron hasta una concentración de 10,000 nanomolares.

N°	Líneas celulares	Concentración del compuesto de prueba (nanomolar)
Sangre		
1	ARH-77	>10000
2	BV-173	73
3	CCRF-CEM	107
4	CCRF-CEM/VLB	>10000
5	Daudi	136
6	EHEB	> 10000
7	HL-60	389
8	HL-60/R10	847
9	K-562	147
10	K-562/Gleevec	175
11	KCL-22	24
12	KG-1	> 10000
13	LAMA-84	1098
14	MC90	93

ES 2 662 359 T3

15	NAMALWA	93
16	OCI-Aml2	> 10000
17	Raji	881
18	Ramos	46
19	RPMI 8226	10
20	RPMI 8226/Dox40	213
21	SUP-B15	37
22	U-937	104
CEREBRO		
23	CGL-1	> 10000
24	CGL-3	75
25	CGL-9	161
MAMA		
26	CAMA-1	22
27	Evsa-T	168
28	HCC1954	28
29	MCF-7	>10000
30	MCF-7/ras	166
31	MDA-MB-435	122
32	MDA-MB-435S	26
33	ZR-75-1	131
COLON		
34	DLD-1	56
35	HCT 116	38
36	HCT-15	>10000

ES 2 662 359 T3

37	LoVo	51
38	LS 174T	159
TEJIDO CONECTIVO		
39	SW-872	>10000
CABEZA y CUELLO		
0	BB30-HNSCC	273
41	BB49-HNSCC	146
42	FaDu	29
43	KB	48
44	KB3	48
45	LB1617-HNSCC	139
46	LB771-HNSCC	391
RIÑÓN		
47	A-498	267
48	BB64-RCC	>10000
49	BB65-RCC	1251
50	Caki-1	> 10000
51	LB1047-RCC	58
52	LB996-RCC	158
HÍGADO		
53	Hep 3B2.1-7	95
54	SK-HEP-1	> 10000
PULMÓN		
55	A-427	130
56	Calu-1	270

ES 2 662 359 T3

57	Calu-3	>10000
58	Calu-6	32
59	LB11-SCLC/OC1	17
60	LB12-SCLC/OC2	52
61	LB13-SCLC/OC3	21
62	LB37-NSCLC	63
63	LB61-NSCLC	>10000
64	NCI-H1299	587
65	NCI-H460	118
66	NCI-H520	98
67	NCI-H596	84
68	NCI-H69	162
69	NCI-H82	>10000
70	SK-MES-1	270
OVARIO		
71	Caov-3	94
72	IGROV-1	109
73	IGROV-1/CDDP	147
74	NIH:OVCAR-3	45
75	NIH:OVCAR-3/CPT20	>10000
76	PA-1	> 10000
PÁNCREAS		

ES 2 662 359 T3

77	BxPC-3	196
78	Capan-2	144
79	PANC-1	327
PRÓSTATA		
80	DU 145	85
81	LNCaP-FGC	78
PIEL		
82	A-375	1481
83	A-375-SM	340
84	A-431	3799
85	BB74-MEL	162
86	CMEL-5	130
87	Hs 294T	219
88	LB1319-MEL	35
89	MALME-3M	157
90	SK-MEL-2	138
91	SK-MEL-5	185
92	UZG4-MEL	180
ESTÓMAGO		
93	AGS	66
94	Hs 746T	34
95	KATO III	162
TIROIDES		
96	FTC-238	26
VEJIGA URINARIA		

97	J82	20
98	LB796-BLC	83
99	LB831-BLC	149
100	T24	852

Los resultados demostraron que (2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona L-lactato tiene una actividad anti-proliferativa potente contra una amplia variedad de líneas celulares diferentes.

5 Formulaciones farmacéuticas

Ejemplo 9

(i) Formulación de tabletas

10 Una composición de tableta que contiene un compuesto de la Fórmula (1) se prepara mezclando 50 mg del compuesto con 197 mg de lactosa (BP) como diluyente, y 3 mg de estearato magnésico como un lubricante y comprimiéndola para formar una tableta de manera conocida.

(ii) Formulación de cápsulas

Una formulación de cápsula se prepara mezclando 100 mg de un compuesto de la Fórmula (1) o con 100 mg de lactosa y rellenando la mezcla resultante en cápsulas de gelatina dura estándar opacas.

(iii) Formulación inyectable I

15 Una composición parenteral para la administración por inyección puede prepararse disolviendo un compuesto de la Fórmula (1) en agua que contiene 10% propilenglicol para dar una concentración del compuesto activo de 1.5 % en peso. La solución se esteriliza después por filtración, se rellena en una ampolleta y se sella.

(iv) Formulación inyectable II

20 Una composición parenteral para inyección se prepara disolviendo en agua un compuesto de la Fórmula (1) (2 mg/ml) y manitol (50 mg/ml), filtrado estéril de la solución y rellenado en viales o ampolletas sellables de 1ml.

v) Formulación inyectable III

Una formulación para administración i.v. por inyección o infusión puede prepararse disolviendo el compuesto de la Fórmula (1) en agua a 20 mg/ml. El recipiente después se sella y esteriliza en autoclave.

vi) Formulación inyectable IV

25 Una formulación para administración i.v. por inyección o infusión puede prepararse disolviendo el compuesto de la Fórmula (1) en agua que contiene un tampón (por ejemplo, 0.2 M acetato pH 4.6) a 20mg/ml. El recipiente después se sella y esteriliza en autoclave.

(vii) Formulación de inyección subcutánea

30 Una composición para administración subcutánea se prepara mezclando un compuesto de la Fórmula (1) con aceite de maíz de grado farmacéutico para dar una concentración de 5 mg/ml. La composición se esteriliza y rellena en un contenedor adecuado.

viii) Formulación liofilizada

35 Alícuotas del compuesto de la Fórmula(1) formulado se colocan en viales de 50 ml y se liofilizan. Durante la liofilización, las composiciones se congelan usando un protocolo de congelación de una etapa a (-45 °C). La temperatura se elevó a -10 °C para la hibridación, y después disminuyó a la congelación a -45 °C, seguido por secado primario a +25 °C por aproximadamente 3400 minutos, seguido por un secado secundario con etapas de incremento si la temperatura está a 50°C. La presión durante el secado primario y secundario se regula a 80 millitor.

(ix) 2% Formulación de gel tópico

	% p/p
Compuesto	2.00
Hidroxiopropil metil celulosa (Methocel F4M)	2.50
Óxido de polietileno (Polyox WSR -205)	0.25
Propilenglicol	10.00
Metilparaben	0.15
Propilparaben	0.05
Agua purificada para	100.00

Ejemplo 10

Estudios de la estructura del cristal

- 5 El compuesto de la Fórmula (1) y sus sales existen en un número de diferentes formas cristalinas. Estas se han identificado y caracterizado usando los métodos descritos más abajo.

Métodos generales

Metodología de difracción de cristal simple

- 10 Los datos cristalográficos se recogieron a temperatura ambiente (20 °C) usando radiación sincrotrón ($\lambda = 0.775 \text{ \AA}$) a partir de un beamline ESRF ID23.1 equipado con ϕ goniómetro y un detector CCD Quantum 315 de ADSC. Las imágenes se recogieron en dos escáneres ϕ con $\phi=0-180^\circ$ y $\Delta\phi=1^\circ$, uno con alta dosis de radiación y uno con baja dosis. La distancia del detector al cristal fue 110 mm. La recogida de los datos se controló por el software ProDC y las imágenes se procesaron y escalaron por Dtrek.

- 15 Las estructuras cristalinas se resolvieron usando métodos directos implementados en SHELXS-97 y se refinaron por SHELXL-97. Los átomos de hidrógeno se generaron en motivos geométricos mientras que la localización del heteroátomo unido a los átomos de hidrógeno se confirmó por inspección de mapas de diferencia Fo-Fc. Los parámetros de posición y térmicos de los átomos de hidrógeno se restringieron para tomarse en los átomos no de hidrógeno correspondientes. El movimiento térmico de los átomos no de hidrógeno se modeló por factores térmicos anisótropos.

- 20 Metodología de difracción de polvo

- 25 Las muestras para recogida de datos de difracción de polvo de rayos X (XRPD) se trituraron gradualmente por un mortero de mármol y se cargaron en un capilar cristalográfico (de Hampton Research, Tipo cuarzo o vidrio 10, 0.4 o 0.7 mm de diámetro). Los patrones de difracción se recogieron a temperatura ambiente usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a partir de un ánodo rotativo Rigaku RU3HR, óptica confocal ósmica azul, goniómetro $\frac{1}{4} c$ y un detector de placa de imágenes Rigaku HTC. Se recogieron imágenes en 2D mientras rotaba el eje ϕ con un detector para la distancia del cristal de 250 mm. La recogida de los datos se controló por el software CrystalClear y las imágenes 2D se convirtieron a un gráfico de 1D (2θ vs. Intensidad) por Datasqueeze (intensidad promediada sobre el ángulo azimutal $0 < \chi < 360^\circ$ para intervalo 2θ 3-30° en etapas de 0.02°). En casa se usó el programa AstexXRPD para la manipulación y visualización de patrones XRPD 1D.

- 30 Determinación de la estequiometría de la sal por experimentos de valoración

En los siguientes ejemplos, que se relacionan con las sales y se da la estequiometría de la sal, la estequiometría se determinó usando el siguiente método de valoración.

Una solución (solución KCl/HCl) de 150 mM KCl y 20 mM HCl se preparó fresca para cada lote de los experimentos de valoración. Una alícuota de 1 ml de la solución se valoró y la curva de valoración potenciométrica así producida se usó como la curva control. Todas las valoraciones se realizaron a 25°C y con 300 mM KOH en etapas de 2 µl usando un pH metro Mettler Toledo MP220. Las lecturas del potencial de electrodo para 4 tampones estándar se registraron antes y después del lote diario de medición. Las muestras de las sales del Compuesto (1) de (1-3 mg) se disolvieron en 1 ml de solución KCl/HCl y se evaluaron con agitación vigorosa usando un pequeño agitador magnético. Los potenciales del electrodo registrados se convirtieron en valores de pH usando una curva de calibración de 4 tampones estándar. Los datos de valoración de la muestra y control se procesaron para producir un gráfico Bjerrum en el intervalo de pH 2-12. El método de análisis y cálculo del gráfico de Bjerrum se describe en la revisión "Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State)", A. Avdeef (Current Topics in Medicinal Chemistry 2001, p277-351).

La estequiometría de las sales del Compuesto (1) se dedujo a partir del nH (número de protones a pH=2) de partida, (es decir, la base libre inicia con -2 protones, la mono-sal con -1 protones (Compuesto (1)⁺ ácido⁻)), mientras que las sales dobles (Compuesto (1)²⁺ ácido²⁻ o Compuesto (1)²⁺ 2* ácido⁻) inician a nH=0.

15 10A. Formas de sal de base libre (ejemplo comparativo)

(A-i) Forma cristalina de base libre FB1

Una solución saturada del Compuesto (1) en 1-butanol se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente un volumen 4x de di(isopropil) éter dio la forma cristalina FB1. Los análisis XRPD de la muestra fresca dio el patrón mostrado en la Figura 1 y los picos principales enumerados en la Tabla 1 más abajo. Después de secar al aire por tres días, se obtuvo un nuevo patrón de XRPD que mostró que la forma cristalina FB1 se había convertido completamente en la forma cristalina FB3.

Tabla 1 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Forma FB1

2θ/°	d/Å	I/%
5.52	15.99	100
9.44	9.36	5
11.05	8.00	6
11.99	7.38	4
15.21	5.82	16
16.11	5.50	16
16.72	5.30	11
17.09	5.18	8
18.21	4.87	19
19.23	4.61	6
19.73	4.50	9
20.29	4.37	16
21.09	4.21	5

2 θ /°	d/Å	I/%
26.72	3.33	3

(A-ii) Forma cristalina de base libre FB2

5 Una solución saturada del Compuesto (1) en THF se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente un volumen 4x de acetato de isopropilo da la forma cristalina FB2. El patrón de XRPD de una muestra fresca de la forma FB2 se muestra en la Figura 2 y los picos principales en el patrón de XRPD se enumeran en la Tabla 2 más abajo. La muestra se secó al aire por 3 días después de lo cual se obtuvo un nuevo patrón de XRPD: esto demostró que la forma cristalina FB2 cambió a la forma cristalina FB3.

Tabla 2. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) forma cristalina FB2

2 θ /°	d/Å	I%
5.35	16.49	100
6.73	13.13	2
10.40	8.50	3
10.67	8.28	4
14.68	6.03	13
17.00	5.24	11
18.26	4.85	8
18.61	4.76	10
18.87	4.70	8
19.24	4.61	7
19.86	4.47	18
20.15	4.40	16
21.13	4.20	9
21.44	4.14	7
26.86	3.32	3

10 (A-iii) Forma cristalina de base libre FB3

La forma cristalina FB3 se obtuvo a partir de las formas FB1 y FB2 como se describió anteriormente o por evaporación de una solución de la base libre. El patrón de XRPD para la forma cristalina FB3 se muestra en la

Figura 3 y los picos principales se enumeran en la Tabla 3 más abajo. Se encontró que la forma cristalina FB3 era estable al aire y a 40°C y 75 % HR por al menos un mes.

Tabla 3. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) forma cristalina FB3

2 θ /°	d/Å	I/%
6.05	14.59	100
7.87	11.22	9
9.15	9.66	7
10.22	8.65	3
12.15	7.28	11
13.60	6.50	14
15.77	5.62	17
16.62	5.33	4
17.16	5.16	7
17.82	4.97	11
18.89	4.69	22
19.64	4.52	12
20.20	4.39	21
20.93	4.24	10
22.19	4.00	5
23.33	3.81	6
24.53	3.63	5

5 (A-iv) Forma cristalina de base libre FB4

La forma cristalina FB4 se observó en los experimentos de precipitación de soluciones de etanol del Compuesto (1). El análisis de rayos X del cristal simple mostró que la forma cristalina es un dihidrato. Una solución saturada del Compuesto (1) en etanol se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente un volumen 4x de isopropil éter dio la forma cristalina FB4 la que se encontró que era estable al aire. El patrón de XRPD de la forma FB4 se muestra en la Figura 4 y los picos principales se enumeran en la Tabla 4 más abajo. Las coordenadas del átomo y diagrama de empaque del cristal están en la Figura 5 y Tabla 5.

Tabla 4. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) forma cristalina FB4

ES 2 662 359 T3

2 θ /°	d/Å	I/%
6.29	14.04	100
8.91	9.92	12
9.96	8.87	14
12.62	7.01	4
14.11	6.27	16
16.11	5.50	14
17.11	5.18	10
17.40	5.09	5
17.88	4.96	8
18.48	4.80	17
19.33	4.59	4
19.91	4.46	10
20.35	4.36	8
21.57	4.12	23
22.46	3.95	13
23.59	3.77	14
24.88	3.58	17
27.25	3.27	9

Tabla 5 Parámetros y coordenadas de la célula unitaria en formato cif para la estructura del cristal del Compuesto (1) forma cristalina FB4

grupo espacial: P42 /n
célula unitaria a 293K donde a, b & c tienen 5% s.u.:
a=b=28.2
c=6.0

ES 2 662 359 T3

alfa=beta=gamma=90
Coordenadas en formato cif :
loop_
_atom_site_label
_atom_site_type_symbol
_atom_site_fract_x
_atom_site_fract_y
_atom_site_fract_z
_atom_site_U_iso_or_equiv
_atom_site_adp_type
_atom_site_occupancy
_atom_site_symmetry_multiplicity
_atom_site_calc_flag
_atom_site_refinement_flags
_atom_site_disorder_assembly
_atom_site_disorder_group
C1 C 0.60531(14) 0.59657(13) 0.3978(7) 0.0816(11) Uani 1 1 d ...
H1A H 0.6390 0.5959 0.3641 0.098 Uiso 1 1 calc ...
H1B H 0.6000 0.6175 0.5237 0.098 Uiso 1 1 calc ...
N2 N 0.58709(11) 0.54841(11) 0.4433(6) 0.0845(10) Uani 1 1 d ...
C3 C 0.55080(14) 0.53422(15) 0.2788(8) 0.0924(13) Uani 1 1 d ...
H3A H 0.5207 0.5275 0.3505 0.111 Uiso 1 1 calc ...
H3B H 0.5608 0.5065 0.1955 0.111 Uiso 1 1 calc ...
C4 C 0.54727(14) 0.57663(14) 0.1322(7) 0.0838(11) Uani 1 1 d ...
C5 C 0.57724(14) 0.61201(14) 0.2011(7) 0.0801(11) Uani 1 1 d ...

ES 2 662 359 T3

C6 C 0.51860(15) 0.58333(16) -0.0535(8) 0.0921(13) Uani 1 1 d ...
H6 H 0.4985 0.5592 -0.1007 0.111 Uiso 1 1 calc ...
C7 C 0.52000(15) 0.62568(18) -0.1672(8) 0.0926(13) Uani 1 1 d ...
C8 C 0.54951(17) 0.66174(16) -0.0895(8) 0.0966(13) Uani 1 1 d ...
H8 H 0.5497 0.6908 -0.1625 0.116 Uiso 1 1 calc ...
C9 C 0.57843(16) 0.65525(16) 0.0930(8) 0.0935(13) Uani 1 1 d ...
H9 H 0.5983 0.6794 0.1423 0.112 Uiso 1 1 calc ...
C10 C 0.49149(17) 0.63467(19) -0.3746(8) 0.1025(14) Uani 1 1 d ..
H10A H 0.5120 0.6491 -0.4853 0.123 Uiso 1 1 calc ...
H10B H 0.4808 0.6045 -0.4336 0.123 Uiso 1 1 calc ...
N11 N 0.44995(12) 0.66545(12) -0.3408(6) 0.0847(10) Uani 1 1 d ..
C12 C 0.41355(16) 0.64016(16) -0.2169(7) 0.0928(12) Uani 1 1 d ..
H12A H 0.4257 0.6319 -0.0708 0.111 Uiso 1 1 calc ...
H12B H 0.4056 0.6110 -0.2941 0.111 Uiso 1 1 calc ...
C13 C 0.36951(16) 0.67000(18) -0.1912(8) 0.1005(14) Uani 1 1 d ..
H13A H 0.3458 0.6524 -0.1081 0.121 Uiso 1 1 calc ...
H13B H 0.3771 0.6985 -0.1080 0.121 Uiso 1 1 calc ...
N14 N 0.35044(13) 0.68296(14) -0.4066(6) 0.0961(11) Uani 1 1 d ..
C15 C 0.38701(19) 0.70846(17) -0.5299(7) 0.1001(14) Uani 1 1 d ..
H15A H 0.3953 0.7373 -0.4509 0.120 Uiso 1 1 calc ...
H15B H 0.3749 0.7173 -0.6753 0.120 Uiso 1 1 calc ...
C16 C 0.43006(17) 0.67828(18) -0.5565(7) 0.0987(14) Uani 1 1 d ..
H16A H 0.4218 0.6497 -0.6376 0.118 Uiso 1 1 calc ...
H16B H 0.4537 0.6954 -0.6425 0.118 Uiso 1 1 calc ...
C17 C 0.3076(2) 0.7126(2) -0.3808(11) 0.137(2) Uani 1 1 d ...

ES 2 662 359 T3

H17A H 0.2836 0.6950 -0.3029 0.206 Uiso 1 1 calc . . .
H17B H 0.2959 0.7215 -0.5250 0.206 Uiso 1 1 calc . . .
H17C H 0.3154 0.7407 -0.2978 0.206 Uiso 1 1 calc . . .
C18 C 0.59855(15) 0.51789(15) 0.6047(8) 0.0896(12) Uani 1 1 d ...
019 O 0.57503(11) 0.47935(11) 0.6072(6) 0.1109(11) Uani 1 1 d ...
C20 C 0.63596(13) 0.52545(13) 0.7750(7) 0.0818(11) Uani 1 1 d ...
C21 C 0.64335(16) 0.48917(15) 0.9312(8) 0.0920(13) Uani 1 1 d ...
C22 C 0.67703(18) 0.49413(16) 1.0959(8) 0.0986(14) Uani 1 1 d . . .
H22 H 0.6811 0.4701 1.2002 0.118 Uiso 1 1 calc . . .
C23 C 0.70497(16) 0.53453(15) 1.1082(8) 0.0907(12) Uani 1 1 d . . .
C24 C 0.70021(15) 0.57066(15) 0.9542(8) 0.0877(12) Uani 1 1 d . B .
C25 C 0.66614(15) 0.56535(14) 0.7956(8) 0.0889(12) Uani 1 1 d . . .
H25 H 0.6624 0.5898 0.6929 0.107 Uiso 1 1 calc . . .
026 O 0.61807(14) 0.44835(11) 0.9277(7) 0.1192(12) Uani 1 1 d . . .
H26 H 0.5962 0.4508 0.8383 0.179 Uiso 1 1 calc R ..
027 O 0.73840(13) 0.53982(12) 1.2687(6) 0.1135(11) Uani 1 1 d . . .
H27 H 0.7403 0.5153 1.3418 0.170 Uiso 1 1 calc R ..
C28 C 0.73311(18) 0.61386(17) 0.9614(10) 0.1084(16) Uani 1 1 d . . .
H28 H 0.7646 0.6017 1.0009 0.130 Uiso 1 1 calc . A 1
C29 C 0.7389(2) 0.6388(2) 0.7301(12) 0.107(3) Uani 0.775(12) 1 d P B 1
H29A H 0.7600 0.6654 0.7448 0.160 Uiso 0.78 1 calc P B 1
H29B H 0.7085 0.6497 0.6790 0.160 Uiso 0.78 1 calc P B 1
H29C H 0.7518 0.6167 0.6246 0.160 Uiso 0.78 1 calc P B 1
C30 C 0.7207(3) 0.6487(3) 1.1347(14) 0.120(3) Uani 0.775(12) 1 d P B 1
H30A H 0.7434 0.6741 1.1332 0.180 Uiso 0.78 1 calc P B 1

H30B H 0.7211 0.6336 1.2778 0.180 Uiso 0.78 1 calc P B 1
H30C H 0.6896 0.6612 1.1060 0.180 Uiso 0.78 1 calc P B 1
C29 C 0.6972(10) 0.6587(7) 0.927(11) 0.22(3) Uani 0.225(12) 1 d P B 2
C30 C 0.7740(7) 0.6111(12) 0.913(5) 0.147(13) Uani 0.225(12) 1 d P B 2
O1W O 0.75198(14) 0.46640(15) 1.5369(7) 0.1195(12) Uani 1 1 d D ..
H1W1 H 0.7317(14) 0.4461(18) 1.565(11) 0.16(3) Uiso 1 1 d D ..
H2W1 H 0.7750 0.4600 1.6200 0.220 Uiso 1 1 d D ..
O2W O 0.31342(14) 0.60501(17) 0.3540(9) 0.1423(15) Uani 1 1 d D ..
H1W2 H 0.337(2) 0.595(3) 0.285(14) 0.220 Uiso 1 1 d D ..
H2W2 H 0.324(3) 0.629(2) 0.424(13) 0.220 Uiso 1 1 d D ..

(A-v) Forma cristalina de base libre FB5

5 La Forma FB5 es una forma inestable que se observó solamente en los experimentos de cristalización que involucran soluciones de isopropanol del Compuesto (1). La forma FB5 se transformó en FB6 al aire. Sin desear estar atados por ninguna teoría, se cree que FB5 es un solvato de isopropanol.

10 La forma FB5 se formó preparando una solución saturada del Compuesto (1) en isopropanol a temperatura ambiente seguido por una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de acetato de isopropilo. El patrón de XRPD de una muestra fresca se muestra en la Figura 6 y los picos principales se enumeran en la Tabla 6 más abajo. Una muestra de FB5 se secó en aire por 2 días después de lo cual el análisis XRPD mostró conversión a la forma FB6.

Tabla 6 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) FB5

2 θ /°	d/Å	I/%
7.12	12.41	100
9.71	9.10	14
10.14	8.72	17
11.50	7.69	4
13.73	6.45	16
14.60	6.06	5
15.34	5.77	4
16.58	5.34	21

2 θ /°	d/Å	I/%
16.94	5.23	6
18.71	4.74	32
19.46	4.56	48
20.15	4.40	13
21.97	4.04	6
22.35	3.97	14
23.43	3.79	9
26.36	3.38	8

(A-vi) Forma cristalina de base libre FB6

5 La forma FB6 se observó solamente como un producto del envejecimiento de la forma FB5. La forma FB6 es estable en el aire. El patrón de XRPD de una muestra de la forma FB6 que se preparó dejando secar la forma FB5 por 2 días al aire se muestra en la Figura 7. Una lista de los picos principales se expone en la Tabla 7 más abajo.

Tabla 7 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) forma FB6

2 θ /°	d/Å	I/%
4.60	19.21	4
9.09	9.72	14
9.68	9.13	25
16.08	5.51	25
16.46	5.38	28
16.94	5.23	14
18.13	4.89	23
18.66	4.75	100
20.05	4.42	31
22.48	3.95	10
26.53	3.36	9

10B. Compuesto (1) Hidrocloruro 1:2 formas cristalinas de la sal (ejemplos comparativo)

(B-i) Compuesto (1) hidrocloruro - Forma FH1

5 EtOAc/HCl se añadió a 2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona y después MeOH hasta que se formó una solución. El solvente se evaporó y se evaporó nuevamente con tolueno y después con MeOH hasta secarse, para producir 2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-il]-metanona como la sal de di-HCl. Esta forma es muy higroscópica y se disuelve en la humedad del aire. El patrón de XRPD se muestra en la Figura 8 y los picos principales se exponen en la Tabla 8 más abajo.

Tabla 8 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) forma hidrocloruro - FH1

2 θ /°	d/Å	I/%
5.59	15.79	16
7.34	12.04	100
7.99	11.05	19
10.33	8.56	11
11.70	7.56	3
13.95	6.34	4
14.32	6.18	10
14.72	6.01	4
15.29	5.79	11
16.37	5.41	4
16.82	5.27	8
18.59	4.77	10
19.99	4.44	3
20.40	4.35	4
20.82	4.26	2
21.26	4.18	4
22.57	3.94	3
23.01	3.86	1
24.60	3.62	6

2 θ /°	d/Å	I/%
25.32	3.51	20
25.82	3.45	6
27.10	3.29	4
28.27	3.15	7
28.78	3.10	7

(B-ii) Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH2

5 La forma FH2 se observó en experimentos de precipitación con soluciones DMSO o DMF de la forma FH1. Esta forma se transforma en el aire en la forma FH3. Una solución saturada de la forma FH1 (B-i) en DMF se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de acetona dio la forma FH2. El patrón de XRPD de una muestra fresca de la forma FH2 se muestra en la Figura 9 y los picos principales se enumeran en la Tabla 9 más abajo. Una muestra de la forma FH2 se secó al aire por 2 días después de lo cual el análisis XRPD mostró que había ocurrido la conversión a la forma FH3.

Tabla 9 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) hidrocloreuro forma FH2

2 θ /°	d/Å	I/%
3.40	25.99	100
6.04	14.62	3
6.81	12.97	81
9.03	9.78	29
11.84	7.47	20
13.01	6.80	3
13.69	6.46	4
15.70	5.64	10
16.10	5.50	31
16.59	5.34	8
17.17	5.16	4
18.13	4.89	14
20.84	4.26	23

ES 2 662 359 T3

2 θ /°	d/Å	I/%
21.39	4.15	6
21.87	4.06	8
23.19	3.83	13
23.94	3.71	14
24.78	3.59	6
25.65	3.47	18
25.97	3.43	6
26.94	3.31	5
27.59	3.23	3
28.06	3.18	5
29.53	3.02	6

(B-iii) Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH3

5 La forma FH3 se observó en experimentos de precipitación con soluciones etanol o isopropanol de la forma FH1 así como en la degradación de la forma FH2. La forma FH3 es estable al aire y a 40°C y 75 % HR por al menos un mes. La preparación de la forma FH3 se describe en el Ejemplo 3 anterior. El patrón de XRPD para la forma FH3 se muestra en la Figura 10 y los picos principales se enumeran en la Tabla 10.

Tabla 10 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) hidrocloreuro Forma FH3

2 θ /°	d/Å	I/%
5.83	15.15	5
9.35	9.45	100
10.40	8.50	89
10.78	8.20	19
11.35	7.79	11
11.71	7.55	16
12.51	7.07	48
13.35	6.63	10

ES 2 662 359 T3

2 θ /°	d/Å	I/%
13.81	6.41	17
14.10	6.27	5
14.78	5.99	42
17.18	5.16	8
17.65	5.02	9
18.74	4.73	51
19.09	4.65	35
19.46	4.56	13
20.11	4.41	8
21.18	4.19	18
21.68	4.10	28
22.32	3.98	76
23.07	3.85	28
23.71	3.75	16
24.86	3.58	96
25.14	3.54	45
26.49	3.36	5
27.03	3.30	8
28.09	3.17	14
28.70	3.11	16
29.02	3.07	29
29.52	3.02	17

(B-iv) Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH4

La forma FH4 se observó solamente en un experimento precipitación (DMF/dioxano). Esta forma es inestable y se desintegra al aire. Una solución saturada de la forma FH1 en DMF se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de 1,4-dioxano dio la forma FH4. El patrón de XRPD de una

muestra fresca de FH4 se muestra en la Figura 11 y los picos principales se enumeran en la Tabla 11 más abajo. La muestra se desintegró al aire.

Tabla 11 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH4

2 θ /°	d/Å	I/%
7.04	12.55	31
9.89	8.93	10
11.62	7.61	100
12.30	7.19	10
13.27	6.67	8
14.14	6.26	14
15.54	5.70	57
16.06	5.51	17
16.68	5.31	34
17.99	4.93	13
18.54	4.78	26
19.24	4.61	19
20.73	4.28	43
22.26	3.99	28
22.94	3.87	27
23.36	3.81	13
23.77	3.74	35
24.63	3.61	12
25.07	3.55	36
25.72	3.46	8
26.91	3.31	15
27.63	3.23	11

(B-v) Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH5

5 La forma Fh5 se observó solamente en un experimento precipitación (metanol/acetona). Esta forma es inestable y se disuelve en el aire húmedo. Una solución saturada de la forma FH1 en metanol se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de acetona dio la forma FH5. El patrón de XRPD de una muestra fresca de FH5 se muestra en la Figura 12 y los picos principales se enumeran en la Tabla 12 más abajo. La muestra se desintegra al aire.

Tabla 12 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) hidrocloreuro - Forma FH5

2 θ /°	d/Å	I/%
2.32	38.00	100
6.15	14.35	18
11.79	7.50	6
15.79	5.61	5
20.81	4.27	8
22.76	3.90	3
23.76	3.74	5

10C. Compuesto (1) Formas cristalinas de la sal 1:1 L-Lactato

10 (C-i) Compuesto (1) L-Lactato - Forma FL1

La forma de sal de L-lactato FL1 se preparó como se describió en el Ejemplo 2 anterior.

La forma FL1 es estable al aire y a 40°C y 75 % HR por al menos un mes. El patrón de XRPD para formar FL1 se muestra en la Figura 13 y los picos principales se enumeran en la Tabla 13.

Tabla 13 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Lactato - Forma FL1

2 θ /°	d/Å	I/%
6.18	14.30	15
6.53	13.52	50
8.39	10.54	19
11.08	7.98	7
13.10	6.75	85
14.13	6.26	33
14.40	6.15	23

2 θ /°	d/Å	I/%
15.21	5.82	4
16.21	5.46	6
16.81	5.27	100
17.22	5.15	45
18.65	4.75	23
19.52	4.54	33
19.82	4.48	34
20.49	4.33	7
20.76	4.27	13
21.13	4.20	17
22.02	4.03	12
22.33	3.98	44
22.84	3.89	40
23.09	3.85	25
23.94	3.71	14
25.19	3.53	7
26.41	3.37	14
26.95	3.31	5
27.81	3.21	14

(C-ii) Compuesto (1) L-Lactato - Forma FL2

5 La forma FL2 se observó en experimentos de precipitación de soluciones de metanol de la forma FL1. El análisis de rayos X del cristal simple mostró que la forma FL2 está hidratada. Esta es nominalmente un tri-hidrato debido a que hay 3 posiciones de agua en el cristal en la unidad asimétrica, pero no están ocupadas 100% a temperatura ambiente y humedad del laboratorio. Una solución saturada de la forma FL1 en metanol: agua 9:1 se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de acetona dio la forma FL2 la cual es estable al aire. El patrón de XRPD para la forma FL2 se muestra en la Figura 14 y los picos principales se enumeran en la Tabla 14 más abajo. Un diagrama de empaque del cristal se muestra en la Figura 15 y las coordenadas del átomo se enumeran en la Tabla 15 más abajo.

10

Tabla 14 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) sal de lactato - forma FL2

ES 2 662 359 T3

$2\theta/^\circ$	d/Å	I/%
8.03	11.00	29
10.71	8.26	53
11.98	7.38	90
13.13	6.74	49
15.39	5.75	29
16.09	5.50	32
16.61	5.33	42
17.26	5.13	37
18.17	4.88	20
18.82	4.71	56
20.40	4.35	40
21.01	4.22	49
21.53	4.12	27
22.34	3.98	100
22.56	3.94	73
23.71	3.75	82
24.30	3.66	8
24.65	3.61	12
26.56	3.35	13
27.70	3.22	21
28.29	3.15	16

Tabla 15 Parámetros y coordenadas de la célula unitaria en formato cif para la estructura del cristal del Compuesto (1) sal de lactato - forma FL2

grupo espacial: P2₁

ES 2 662 359 T3

célula unitaria a 293K donde a, b, c & β tienen 5% s.u.:
a=5.8
b=16.6
c=14.9
beta=98
alfa=gamma=90
Coordenadas en formato cif :
loop_
_atom_site_label
_atom_site_type_symbol
_atom_site_fract_x
_atom_site_fract_y
_atom_site_fract_z
_atom_site_U_iso_or_equiv
_atom_site_adp_type
_atom_site_occupancy
_atom_site_symmetry_multiplicity
_atom_site_calc_flag
_atom_site_refinement_flags
_atom_site_disorder_assembly
_atom_site_disorder_group
C1 C -0.643(2) 1.1037(6) 0.6763(7) 0.097(3) Uani 1 1 d . . .
H1A H -0.6995 1.0577 0.6395 0.117 Uiso 1 1 calc . . .
H1B H -0.5231 1.1308 0.6484 0.117 Uiso 1 1 calc . . .
N2 N -0.5563(16) 1.0791(5) 0.7694(6) 0.096(2) Uani 1 1 d . . .

ES 2 662 359 T3

C3 C -0.692(3) 1.1148(8) 0.8352(8) 0.124(4) Uani 1 1 d . . .
H3A H -0.7713 1.0734 0.8651 0.148 Uiso 1 1 calc . . .
H3B H -0.5925 1.1454 0.8805 0.148 Uiso 1 1 calc . . .
C4 C -0.8553(19) 1.1667(7) 0.7825(7) 0.094(3) Uani 1 1 d . . .
C5 C -0.8393(19) 1.1609(6) 0.6900(7) 0.092(3) Uani 1 1 d . . .
C6 C -1.036(3) 1.2141(8) 0.8083(8) 0.110(3) Uani 1 1 d . . .
H6 H -1.0636 1.2139 0.8682 0.132 Uiso 1 1 calc . . .
C7 C -1.172(2) 1.2611(8) 0.7456(8) 0.105(3) Uani 1 1 d . . .
C8 C -1.145(2) 1.2560(8) 0.6564(9) 0.111(3) Uani 1 1 d . . .
H8 H -1.2387 1.2867 0.6138 0.133 Uiso 1 1 calc . . .
C9 C -0.979(2) 1.2053(9) 0.6287(7) 0.109(3) Uani 1 1 d . . .
H9 H -0.9640 1.2017 0.5677 0.130 Uiso 1 1 calc . . .
C10 C -1.3561(18) 1.3173(8) 0.7739(9) 0.106(3) Uani 1 1 d . . .
H10A H -1.4455 1.3402 0.7202 0.127 Uiso 1 1 calc . . .
H10B H -1.4617 1.2864 0.8055 0.127 Uiso 1 1 calc . . .
N11 N -1.2550(14) 1.3836(6) 0.8332(6) 0.096(2) Uani 1 1 d ...
C12 C -1.1136(17) 1.4353(6) 0.7839(7) 0.091(3) Uani 1 1 d ...
H12A H -1.2098 1.4591 0.7324 0.109 Uiso 1 1 calc . . .
H12B H -0.9935 1.4035 0.7615 0.109 Uiso 1 1 calc . . .
C13 C -1.0015(17) 1.5021(7) 0.8462(8) 0.100(3) Uani 1 1 d ...
H13A H -0.8991 1.4783 0.8961 0.121 Uiso 1 1 calc . . .
H13B H -0.9092 1.5368 0.8128 0.121 Uiso 1 1 calc . . .
N14 N -1.1853(15) 1.5509(5) 0.8822(6) 0.094(2) Uani 1 1 d ...
H14 H -1.2741 1.5755 0.8352 0.113 Uiso 1 1 calc . . .
C15 C -1.3350(18) 1.4966(7) 0.9279(7) 0.095(3) Uani 1 1 d ...

ES 2 662 359 T3

H15A H -1.4599 1.5276 0.9479 0.114 Uiso 1 1 calc . . .
H15B H -1.2441 1.4730 0.9808 0.114 Uiso 1 1 calc . . .
C16 C -1.4358(17) 1.4308(7) 0.8658(8) 0.098(3) Uani 1 1 d ...
H16A H -1.5310 1.3959 0.8977 0.117 Uiso 1 1 calc . . .
H16B H -1.5346 1.4542 0.8148 0.117 Uiso 1 1 calc . . .
C17 C -1.068(2) 1.6140(9) 0.9439(9) 0.119(4) Uani 1 1 d ...
H17A H -1.1835 1.6447 0.9694 0.178 Uiso 1 1 calc . . .
H17B H -0.9807 1.6492 0.9103 0.178 Uiso 1 1 calc . . .
H17C H -0.9658 1.5886 0.9916 0.178 Uiso 1 1 calc . . .
C18 C -0.382(2) 1.0287(9) 0.7999(8) 0.113(4) Uani 1 1 d ...
O19 O -0.345(2) 1.0216(8) 0.8837(6) 0.156(4) Uani 1 1 d ...
C20 C -0.228(2) 0.9847(6) 0.7418(7) 0.096(3) Uani 1 1 d ...
C21 C -0.069(3) 0.9286(9) 0.7863(9) 0.119(4) Uani 1 1 d ...
C22 C 0.064(2) 0.8867(9) 0.7367(9) 0.114(4) Uani 1 1 d ...
H22 H 0.1812 0.8547 0.7669 0.137 Uiso 1 1 calc . . .
C23 C 0.038(2) 0.8879(7) 0.6447(8) 0.097(3) Uani 1 1 d ...
C24 C -0.1201(18) 0.9425(7) 0.5972(8) 0.096(3) Uani 1 1 d. B .
C25 C -0.253(2) 0.9882(7) 0.6463(8) 0.100(3) Uani 1 1 d ...
H25 H -0.3632 1.0228 0.6160 0.120 Uiso 1 1 calc . . .
O26 O -0.036(2) 0.9229(9) 0.8775(6) 0.169(5) Uani 1 1 d ...
H26 H -0.1427 0.9456 0.8980 0.253 Uiso 1 1 calc R ..
O27 O 0.1658(15) 0.8404(5) 0.5948(6) 0.118(3) Uani 1 1 d ...
H27 H 0.2091 0.7999 0.6238 0.176 Uiso 1 1 calc R ..
C28 C -0.141(4) 0.9478(11) 0.4948(10) 0.138(6) Uani 1 1 d ...
H28 H -0.0894 0.8953 0.4750 0.166 Uiso 1 1 calc . A 1

ES 2 662 359 T3

C29 C -0.029(11) 1.004(4) 0.449(3) 0.24(3) Uani 0.58(6) 1 d P B 1
H29A H -0.0741 0.9976 0.3847 0.363 Uiso 0.58 1 calc P B 1
H29B H 0.1361 0.9972 0.4628 0.363 Uiso 0.58 1 calc P B 1
H29C H -0.0703 1.0575 0.4662 0.363 Uiso 0.58 1 calc P B 1
C30 C -0.417(7) 0.950(3) 0.4621(19) 0.159(19) Uani 0.58(6) 1 d P B 1
H30A H -0.4911 0.9083 0.4918 0.239 Uiso 0.58 1 calc P B 1
H30B H -0.4462 0.9424 0.3978 0.239 Uiso 0.58 1 calc P B 1
H30C H -0.4773 1.0016 0.4772 0.239 Uiso 0.58 1 calc P B 1
C29 C -0.156(11) 1.040(2) 0.465(2) 0.14(2) Uani 0.42(6) 1 d P B 2
H29D H -0.0071 1.0655 0.4814 0.215 Uiso 0.42 1 calc P B 2
H29E H -0.2703 1.0675 0.4943 0.215 Uiso 0.42 1 calc P B 2
H29F H -0.1983 1.0438 0.4003 0.215 Uiso 0.42 1 calc P B 2
C30 C -0.295(12) 0.897(4) 0.446(2) 0.150(19) Uani 0.42(6) 1 d P B 2
H30D H -0.3403 0.9185 0.3870 0.224 Uiso 0.42 1 calc P B 2
H30E H -0.4300 0.8910 0.4766 0.224 Uiso 0.42 1 calc P B 2
H30F H -0.2234 0.8451 0.4418 0.224 Uiso 0.42 1 calc P B 2
O1L O -1.5549(12) 1.6174(6) 0.7786(6) 0.124(3) Uani 1 1 d ...
O2L O -1.7419(12) 1.7087(6) 0.6890(7) 0.125(3) Uani 1 1 d ...
C1L C -1.5569(17) 1.6742(7) 0.7238(8) 0.098(3) Uani 1 1 d ...
C2L C -1.3365(17) 1.6989(8) 0.6926(9) 0.108(4) Uani 1 1 d ...
H2L H -1.3065 1.7549 0.7117 0.129 Uiso 1 1 calc ...
C3L C -1.355(2) 1.6971(12) 0.5917(11) 0.143(5) Uani 1 1 d ...
H3L1 H -1.2130 1.7162 0.5734 0.214 Uiso 1 1 calc ...
H3L2 H -1.4813 1.7312 0.5662 0.214 Uiso 1 1 calc ...
H3L3 H -1.3842 1.6429 0.5706 0.214 Uiso 1 1 calc ...

O3L O -1.1538(13) 1.6538(7) 0.7316(8) 0.150(4) Uani 1 1 d ...
H3L H -1.0243 1.6711 0.7191 0.224 Uiso 1 1 d ...
O1W O -0.448(6) 1.237(6) 1.045(2) 0.45(5) Uani 0.78(6) 1 d P ..
O2W O 0.021(15) 0.8037(17) 0.9990(19) 0.74(7) Uani 1 1 d ...
O3W O -0.35(3) 0.773(9) 0.953(15) 0.77(8) Uani 0.22(6) 1 d P ..

(C-iii) Compuesto (1) L-Lactato - Forma FL3

5 La forma FL3 se observó en experimentos de precipitación de soluciones de THF de la forma FL1. La forma FL3 se transforma al aire en la forma FL1. Una solución saturada de la forma FL1 en THF se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de heptano dio la forma FL3. El patrón de XRPD de una muestra fresca de la forma FL3 se muestra en la Figura 16 y los picos principales se enumeran en la Tabla 16 más abajo. Una muestra de FL3 se secó al aire por 2 días después de lo cual el análisis XRPD mostró que había ocurrido la conversión a la forma FL1.

Tabla 16. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) sal de lactato - forma FL3

2 θ /°	d/Å	I/%
5.53	15.98	100
8.36	10.56	5
11.07	7.98	41
13.16	6.72	12
13.85	6.39	8
16.69	5.31	39
17.17	5.16	21
18.00	4.92	49
18.49	4.80	11
19.28	4.60	14
19.79	4.48	5
20.34	4.36	7
21.05	4.22	21
21.47	4.14	7
21.93	4.05	4

2 θ /°	d/Å	I/%
22.47	3.95	16
22.84	3.89	23
24.56	3.62	4
26.28	3.39	6
27.06	3.29	3
27.47	3.24	3
29.11	3.07	6

10D. Compuesto (1) formas cristalinas de la sal 1:1 sulfato (ejemplo comparativo)

(D-i) Compuesto (1) Sulfato - Forma FS1

5 La forma FS1 se observó en experimentos de cristalización que involucran acetonitrilo como el precipitante. Es inestable en el aire y se transforma en la forma FS3. Una solución saturada de la 1:1 sal del Compuesto (1) (preparada disolviendo el Compuesto (1) en H₂SO₄ y evaporando hasta secarse) en agua se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de acetonitrilo dio la forma FS1. El patrón de XRPD para FS1 se muestra en la Figura 17 y los picos principales se enumeran en la Tabla 17.

Tabla 17. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS1

2 θ /°	d/Å	I/%
4.79	18.45	100
10.02	8.82	28
10.68	8.28	3
11.28	7.84	10
12.89	6.86	6
14.38	6.15	34
15.27	5.80	12
16.91	5.24	17
17.64	5.02	7
18.29	4.85	11
18.86	4.70	3

ES 2 662 359 T3

2 θ /°	d/Å	I/%
19.28	4.60	4
20.12	4.41	10
20.82	4.26	8
21.21	4.19	3
21.76	4.08	10
22.32	3.98	13
22.89	3.88	7
23.83	3.73	5
24.22	3.67	3
24.42	3.64	3
25.13	3.54	8
29.04	3.07	8

Compuesto (1) Sulfato - Forma FS2

5 La forma FS2 es inestable en el aire y se transforma en la forma FS5. Si se mantiene a 40 °C y 75% HR, la forma FS2 se transforma a la forma FS4. El Compuesto (1) se disolvió en 1 mol equivalente de H₂SO₄ concentrado, precipitado con aproximadamente 4 volúmenes de acetonitrilo y la masa cristalina que se formó se filtró. El patrón de XRPD para FS2 se muestra en la Figura 18 y los picos principales se enumeran en la Tabla 18.

Tabla 18 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS2

2 θ /°	d/Å	I/%
4.17	21.20	2
7.03	12.57	24
7.43	11.89	100
8.09	10.92	11
8.67	10.19	90
9.27	9.54	17
9.65	9.16	19

ES 2 662 359 T3

2 θ /°	d/Å	I/%
10.41	8.49	7
10.98	8.05	6
11.76	7.52	31
12.53	7.06	5
13.84	6.40	26
14.55	6.08	8
15.39	5.75	16
16.24	5.45	4
16.89	5.25	7
17.50	5.06	26
18.05	4.91	17
18.93	4.68	16
19.47	4.56	16
23.20	3.83	24
24.21	3.67	19
25.21	3.53	10
25.75	3.46	14
26.62	3.35	13
27.67	3.22	13

Compuesto (1) Sulfato - Forma FS3

5 La forma FS3 es una forma estable que se observó como producto de la forma FS1 Después del envejecimiento al aire y la transformación de la forma FS6 en un medio ambiente tibio y húmedo (40°C, 75% HR). El patrón de XRPD de una muestra de la forma FS3 que se preparó secar la forma FS1 por 2 días al aire se muestra en la Figura 19 y los picos principales se enumeran en la Tabla 19.

Tabla 19 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS3

2 θ /°	d/Å	I/%
---------------	-----	-----

ES 2 662 359 T3

$2\theta/^\circ$	d/Å	I/%
4.81	18.36	17
5.43	16.25	100
10.30	8.58	48
11.24	7.87	24
12.94	6.84	5
13.98	6.33	7
14.26	6.21	26
14.91	5.94	33
15.62	5.67	12
16.41	5.40	56
17.53	5.05	26
18.38	4.82	28
18.61	4.76	40
19.01	4.66	22
19.38	4.58	10
19.92	4.45	30
20.27	4.38	13
20.71	4.28	6
21.19	4.19	9
21.77	4.08	31
22.67	3.92	20
23.79	3.74	19
24.23	3.67	27
25.36	3.51	21

ES 2 662 359 T3

$2\theta/^\circ$	d/Å	I/%
27.38	3.25	6
28.82	3.09	9

Compuesto (1) Sulfato - Forma FS4

5 La forma FS4 es una forma estable que se observó solamente como un producto de la transformación de la forma FS2 en un medio ambiente tibio y húmedo (40°C, 75%RH). Un patrón de XRPD de una muestra de la forma FS4 que se preparó al incubar la forma FS2 por varias semanas a 40°C y 75% HR se muestra en la Figura 20 y los picos principales se enumeran en la Tabla 20.

Tabla 20. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS4

$2\theta/^\circ$	d/Å	I/%
4.64	19.03	4
7.16	12.34	39
7.48	11.80	100
7.97	11.08	29
8.42	10.49	13
8.82	10.02	34
9.09	9.73	29
9.37	9.43	35
10.45	8.46	30
11.77	7.51	53
13.25	6.68	17
13.54	6.54	16
14.36	6.16	24
15.03	5.89	13
16.21	5.46	21
16.99	5.22	33
17.28	5.13	31

2 θ /°	d/Å	I/%
17.59	5.04	30
17.96	4.93	19
18.90	4.69	24
19.43	4.57	10
19.83	4.47	8
21.36	4.16	12
23.13	3.84	31
23.68	3.75	28
23.96	3.71	32
24.77	3.59	18
25.64	3.47	17
26.19	3.40	14
26.73	3.33	13
27.20	3.28	11
27.76	3.21	17
28.64	3.11	9

Compuesto (1) Sulfato - Forma FS5

5 La forma FS53 es una forma estable que se observó como un producto del envejecimiento de la forma FS2 al aire y la transformación de la forma FS4 en un medio ambiente seco (20°C, 11% HR). El patrón de XRPD de una muestra de la forma FS5 que se preparó dejando secar la forma FS2 por 2 días al aire se muestra en la Figura 21 y los picos principales se enumeran en la Tabla 21.

Tabla 21. Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS5

2 θ /°	d/Å	I/%
4.70	18.80	19
7.11	12.42	56
7.99	11.05	100

ES 2 662 359 T3

$2\theta/^\circ$	$d/\text{\AA}$	I/%
9.33	9.47	42
9.57	9.23	29
10.45	8.46	54
11.64	7.60	30
13.27	6.67	62
14.28	6.20	20
14.65	6.04	13
15.12	5.86	14
15.60	5.67	24
16.98	5.22	88
17.65	5.02	22
18.01	4.92	35
18.80	4.72	48
19.32	4.59	17
19.83	4.47	13
21.08	4.21	18
23.21	3.83	39
23.51	3.78	23
23.92	3.72	36
24.30	3.66	19
25.06	3.55	22
26.24	3.39	37
27.28	3.27	13
28.67	3.11	18

Compuesto (1) sulfato - Forma FS6

La forma FS6 se identificó en un número de experimentos de cristalización diferentes durante el tamizaje de la forma. Es estable al aire pero, en un medio ambiente tibio y húmedo (40°C, 75% HR), se transforma en la forma FS3.

- 5 Una solución saturada de la 1:1 sal de sulfato del Compuesto (1) (preparada disolviendo el Compuesto (1) en H₂SO₄ y evaporando hasta secarse) en DMF se preparó a temperatura ambiente. Una precipitación lenta con aproximadamente 4 volúmenes de tolueno dio la forma FS6. El patrón de XRPD para FS6 se muestra en la Figura 22 y los picos principales se enumeran en la Tabla 22.

Tabla 22 Picos XRPD principales para el Compuesto (1) Sulfato - Forma FS6

2θ/°	d/Å	I/%
4.82	18.32	100
9.98	8.86	32
11.35	7.79	9
12.92	6.85	4
14.45	6.13	36
15.38	5.76	17
16.97	5.22	19
17.52	5.06	7
18.18	4.87	15
19.42	4.57	9
20.23	4.39	16
20.93	4.24	13
21.31	4.17	5
21.66	4.10	5
21.89	4.06	7
22.29	3.98	17
22.84	3.89	8
23.04	3.86	6
23.94	3.71	4

2θ/°	d/Å	I/%
24.51	3.63	4
25.26	3.52	9
29.18	3.06	7

Ejemplo 11

Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica del compuesto de la fórmula (I) se determinó usando el siguiente protocolo.

- 5 Los compuestos se probaron contra un panel de hongos que incluyen *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*-ATCC 36082 y *Cryptococcus neoformans*. Los organismos de prueba se mantuvieron inclinados en agar de dextrosa Sabourahd a 4 °C. Se prepararon suspensiones individuales de cada organismo cultivando la levadura toda la noche a 27 °C en un tambor rotativo en caldo de cultivo a base de levadura-nitrógeno (YNB) con aminoácidos (Difco, Detroit, Mich.), pH 7.0 con 0.05 ácido morfina propanosulfónico (MOPS). La suspensión se
10 centrifugó después y se lavó dos veces con 0.85% NaCl antes de sonicar la suspensión celular lavada por 4 segundos (Branson Sonifier, modelo 350, Danbury, Conn.). Las blastosporas individuales se contaron en un hemocitómetro y se ajustó a la concentración deseada en 0.85% NaCl.

- La actividad de los compuestos de prueba se determinó usando una modificación de una técnica de microdilución del caldo de cultivo. Los compuestos de prueba se diluyeron en DMSO a una relación 1.0 mg/ml y después se diluyeron a 64 µg/ml en caldo de cultivo YNB, pH 7.0 con MOPS (Fluconazol se usó como el control) para proporcionar una solución de trabajo de cada compuesto. Usando una placa de 96-pocillos, los pocillos 1 y 3 a 12 se prepararon con caldo de cultivo YNB, se realizaron diluciones de diez veces de la solución del compuesto en los pocillos 2 a 11 (intervalos de concentración 64 a 0.125 µg/ml). El pocillo 1 sirve como un control de la esterilidad y blanco para los ensayos espectrofotométricos. El pocillo 12 sirve como un control de crecimiento. Las placas de
15 microtítulo se inocularon con 10 µl en cada uno de los pocillos 2 a 11 (tamaño final de inóculo es 10⁴ organismos/ml). Las placas inoculadas se incubaron por 48 horas a 35 °C. Los valores MIC se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm (Lector de Microplaca Automático, DuPont Instruments, Wilmington, Del.) Después de la agitación de las placas por 2 minutos con un mezclador-vórtice (Vorte-Genie 2 Mixer, Scientific Industries, Inc., Bolemia, N.Y.). El punto final MIC se definió como una concentración de fármaco inferior que exhibe aproximadamente 50% (o más) de reducción del crecimiento comparado con el pocillo control.
20 Con el ensayo de turbidez esto se define como la concentración de fármaco inferior a la cual la turbidez en el pocillo es <50% de la del control (IC50). Las concentraciones citolíticas mínimas (MCC) se determinaron subcultivando todos los pocillos de la placa de 96-pocillos en una placa de agar de dextrosa Sabourahd (SDA), incubando por 1 a 2 días a 35 °C y después verificando la viabilidad.

30 Ejemplo 12

Métodos de prueba para reducir el dolor o actividad de prevención del dolor

(I) Prueba de hiperalgnesia inflamatoria

- La hiperalgnesia mecánica puede ser examinada en un modelo de dolor inflamatorio en rata. Los umbrales de retiro de la pata a un estímulo de presión creciente se midieron por la técnica Randal-Sellito usando un analgesímetro (Ugo Basile, Milán), en animales vírgenes antes de una inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (FCA) en la pata trasera izquierda. 24 horas después, los umbrales de retiro de la pata se midieron otra vez antes de (predosis) y después de 10 minutos a 6 horas después de la administración del fármaco o vehículo. La reversión de la hiperalgnesia en la pata ipsilateral se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ reversión} = \frac{\text{umbral postdosis} - \text{umbral predosis}}{\text{umbral vírgenes} - \text{umbral predosis}} \times 100$$

- 40 (ii) Prueba de hiperalgnesia neuropática

5 La hiperalgesia mecánica puede ser examinada en un modelo de rata de dolor neuropático inducido por ligadura parcial del nervio ciático izquierdo. Aproximadamente 14 días después de la cirugía los umbrales de retiro mecánico de las dos patas ligada (ipsilateral) y no ligada (contralateral) se midieron antes de (predosis) y después de 10 minutos a 6 horas después de la administración del fármaco o vehículo. La reversión de la hiperalgesia en cada punto de tiempo se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ reversión} = \frac{\text{umbral postdosis ipsilateral} - \text{umbral predosis ipsilateral}}{\text{umbral predosis contralateral} - \text{umbral predosis ipsilateral}} \times 100$$

10 Todos los experimentos se realizaron usando grupos de 6 animales. Las concentraciones de la materia prima de los fármacos se disolvieron en agua destilada y se realizaron diluciones posteriores en 0.9% salina para la administración subcutánea en un volumen de 4 mlkg⁻¹. Todos los fármacos se guardaron en viales plásticos y se mantuvieron en la oscuridad.

Los análisis estadísticos se realizaron en las lecturas del umbral de retiro (g) usando ANOVA con mediciones repetidas seguido por la prueba HSD de Tukey. Eficacia se refiere a la máxima reversión de la hiperalgesia observada a las dosis usadas.

(iii) Probar los efectos de los compuestos de la fórmula (0) un modelo de dolor por cáncer de hueso en rata

15 A ratas hembra adultas se administran inyecciones intra-tibia de células de carcinoma de glándula mamaria de rata MRMZ-1 (3 µl, 10⁷ células/ml). Los animales típicamente desarrollaron gradualmente hiperalgesia mecánica, alodinia mecánica (sensibilidad de la piel a estímulos no dañinos) y preservación de la pata trasera, comenzando el día 12-14 después de la inyección de las células. Un compuesto de la fórmula (0) (por ejemplo a una dosis de 10 y 30 µg/kg s.c.) se administró 3 veces a la semana desde el día de la inyección de las células, y se determinó la extensión de la
20 inhibición de la preservación de la pata trasera y la alodinia mecánica en comparación con los controles tratados con el vehículo.

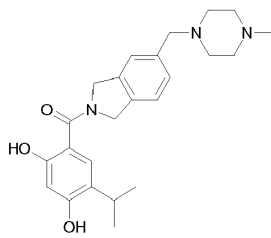
Equivalentes

Los ejemplos anteriores se presentan con el propósito de ilustrar la invención y no deben contruirse como impositivos de ninguna limitación del alcance de la invención.

25

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende una sal de adición ácida de un compuesto de la Fórmula (1)



que es una sal de lactato y uno o más agentes terapéuticos diferentes.

- 5 2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sal de adición ácida es una sal de L-lactato.
3. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sal de adición ácida está en una forma cristalina seleccionada de formas:
- FL1: caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta/^\circ$) pico a 16.81, y
- FL2: caracterizada por un patrón de XRPD con un ángulo de difracción ($2\theta/^\circ$) pico a 22.34.
- 10 4. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que uno o más agentes terapéuticos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en:
- a. Inhibidores de la topoisomerasa I
 - b. Antimetabolitos
 - c Agentes que tienen como objetivo la tubulina
- 15 d. Aglutinante de ADN e inhibidores de topoisomerasa II
- e Agentes alquilantes
 - f. Anticuerpos monoclonales
 - g. Anti-Hormonas
 - h. Inhibidores de la transducción de la señal
- 20 i. Inhibidores de proteasoma
- j. ADN metiltransferasa
 - k. Citoquinas y retinoides
 - l. Terapias dirigidas con cromatina, por ejemplo, moduladores HDAC o HAT
 - m. Radioterapia; y
- 25 n Otros agentes terapéuticos o profilácticos
5. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal de lactato y el uno o más agentes o tratamientos terapéuticos diferentes se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- 30 6. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes están asociados físicamente.
7. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la combinación es una combinación asociada físicamente en la forma de a:

- composición (por ejemplo, formulaciones unitarias) que comprende la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes en mezcla (por ejemplo, dentro de la misma dosis unitaria); o
- 5
- composición que comprende un material en el que la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes están enlazados químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, mediante entrecruzamiento, aglomeración molecular o unión a una porción de vehículo común); o
- 10
- composición que comprende material en el que la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes se co-empacan químicamente/fisicoquímicamente (por ejemplo, se disponen sobre o dentro de vesículas lipídicas, partículas (por ejemplo, micro o nanopartículas) o gotitas de emulsión); o
 - kit farmacéutico, paquete farmacéutico o paquete de paciente en el que la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes se co-empacan o se co-presentan (por ejemplo, como parte de una matriz de dosis unitarias).
8. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes no están físicamente asociados.
9. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la combinación es una combinación no asociada físicamente en la forma de a:
- 15
- material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes junto con instrucciones para la asociación extemporánea del al menos un compuesto para formar una asociación física de los dos o más compuestos/agentes; o
- 20
- material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende la sal de lactato y el uno o más agentes terapéuticos diferentes junto con instrucciones para terapia de combinación con los dos o más compuestos/agentes; o
- material que comprende al menos una de las sales de lactato y uno o más agentes terapéuticos diferentes junto con instrucciones para la administración a una población de pacientes en la que el (los) otro (s) de la sal de lactato y el otro o más agentes terapéuticos han sido (o están siendo) administrados; o
- 25
- material que comprende al menos una de las sales de lactato y uno o más agentes terapéuticos diferentes en una cantidad o en una forma que está específicamente adaptada para uso en combinación con el otro (s) de los dos o más compuestos/agentes.
10. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30
11. Una combinación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para el tratamiento de un cáncer.
12. El uso de una combinación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer.
- 35
13. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para el tratamiento del dolor, apoplejía, uso como agente neuroprotector, uso como agente antifúngico, uso como agente antiprotozoario, o para uso como un agente antiparasitario.
14. Una composición farmacéutica que comprende una sal de adición ácida de un compuesto de la fórmula (1) como se define en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

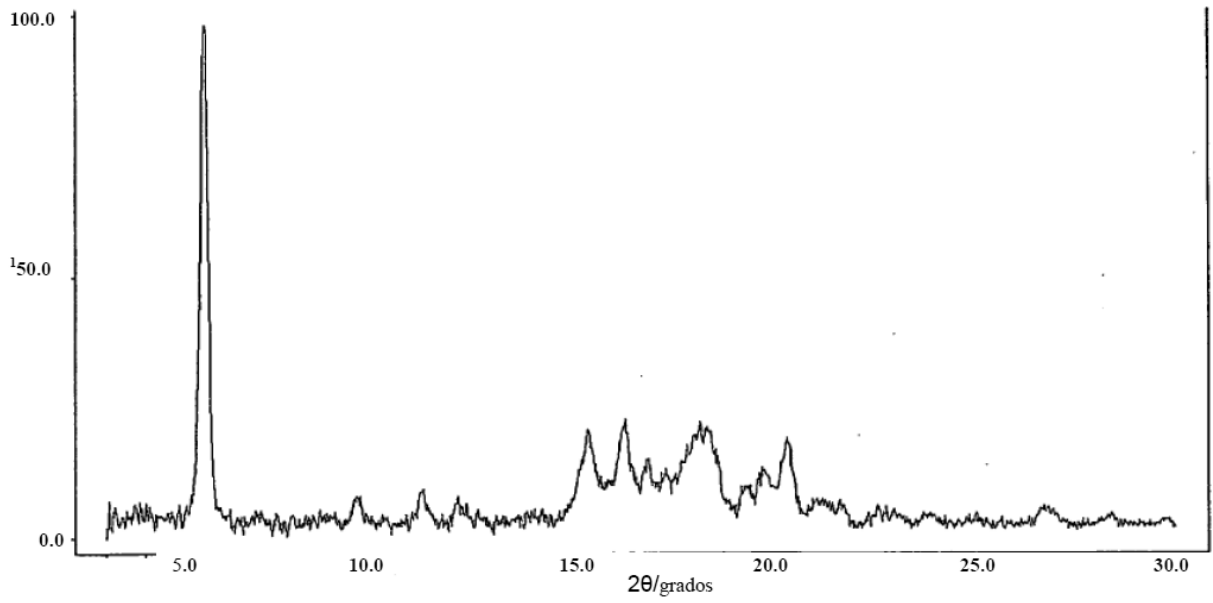


Figura 1

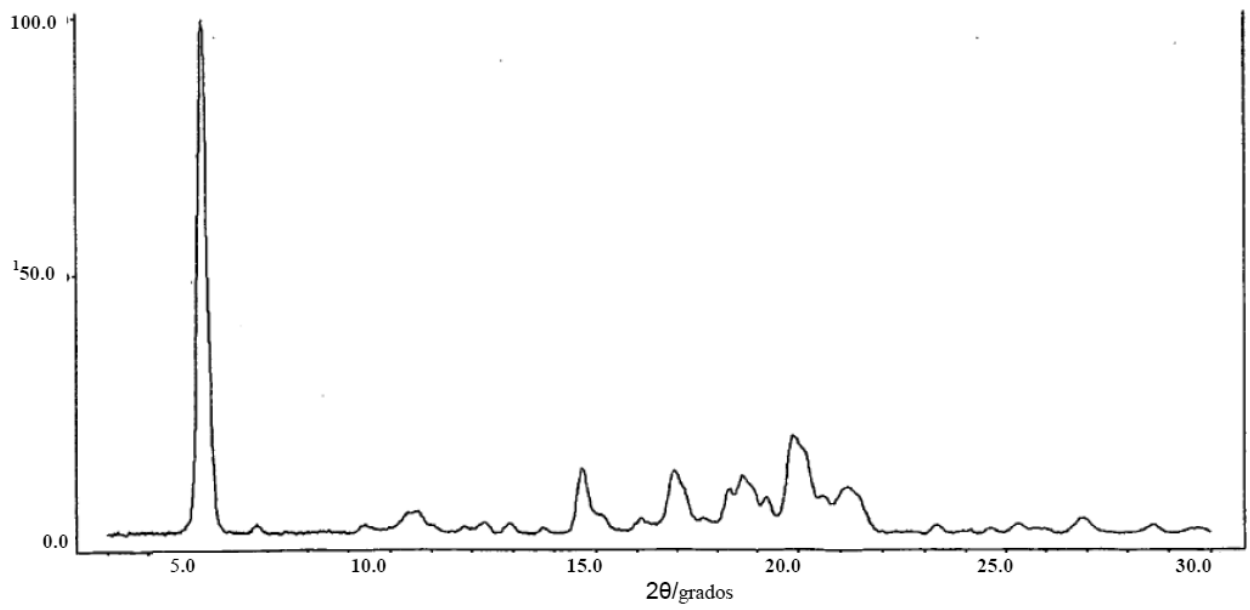


Figura 2

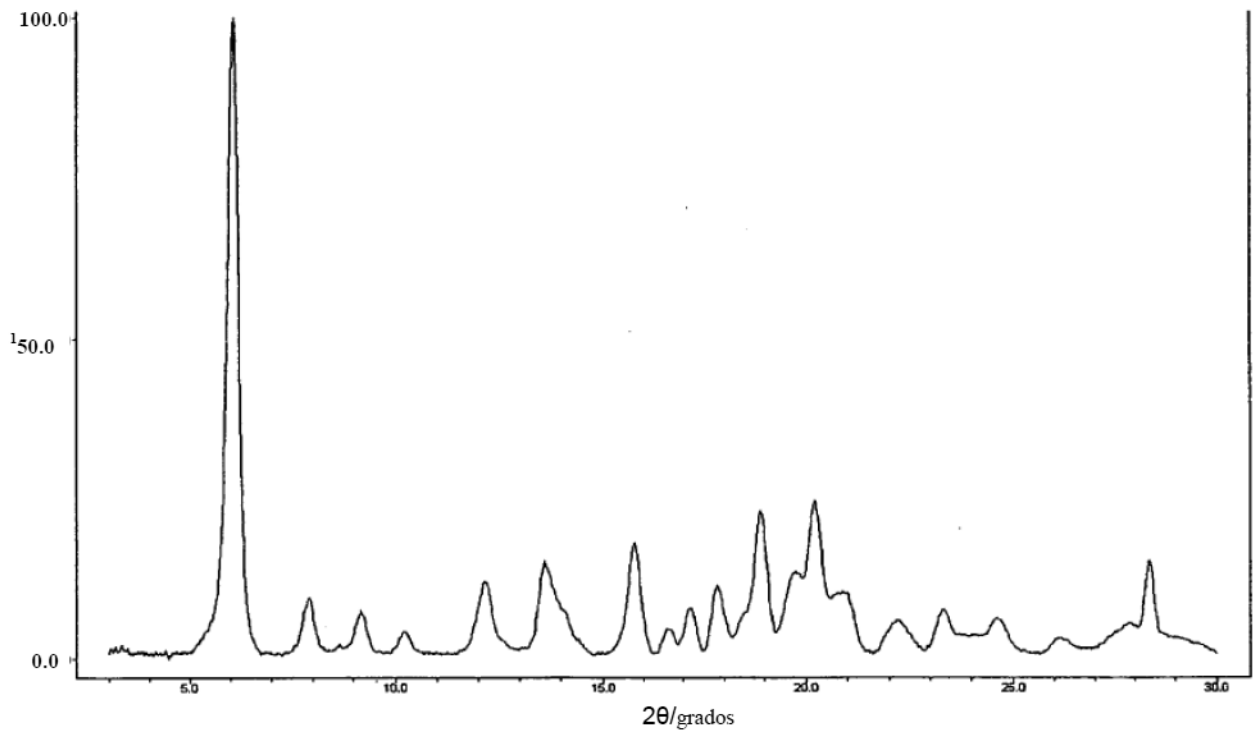


Figura 3

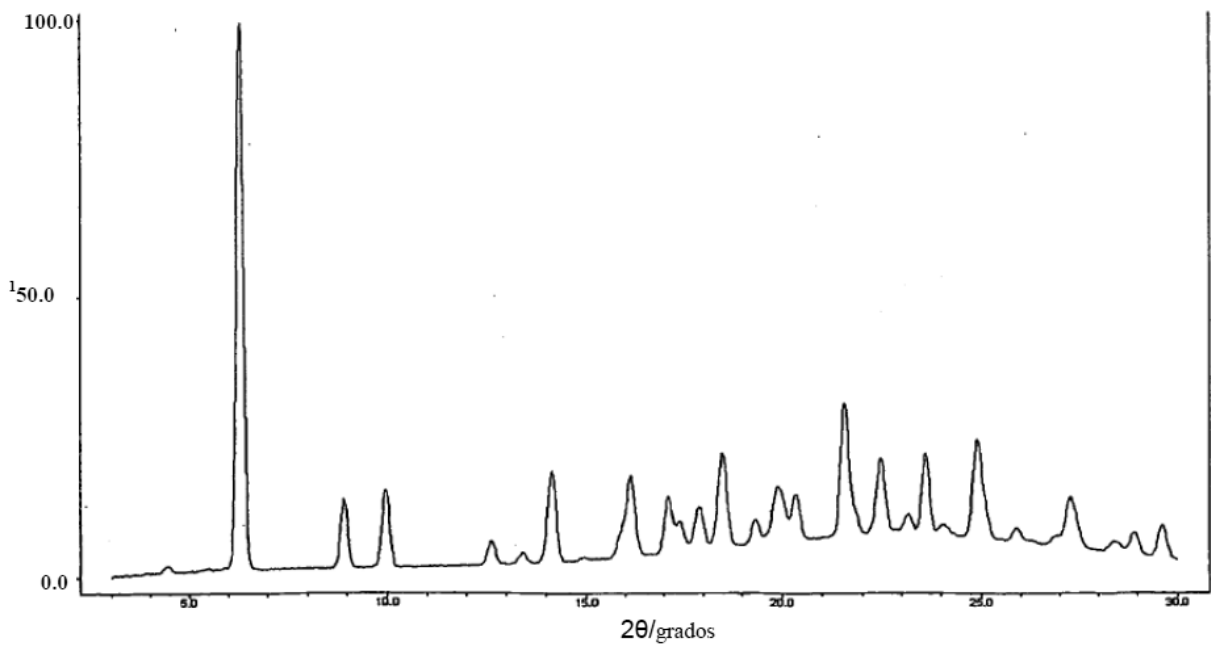


Figura 4

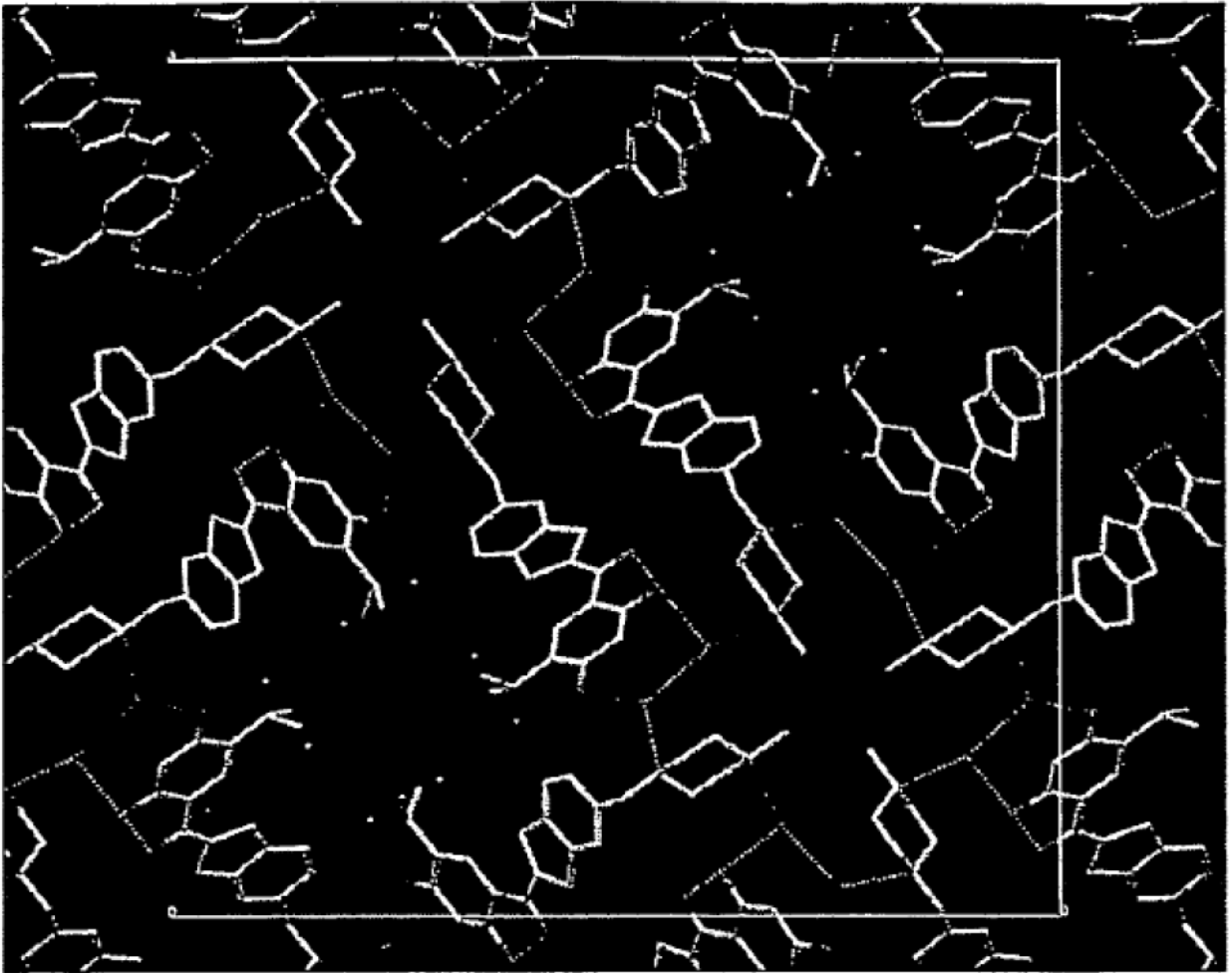


Figura 5

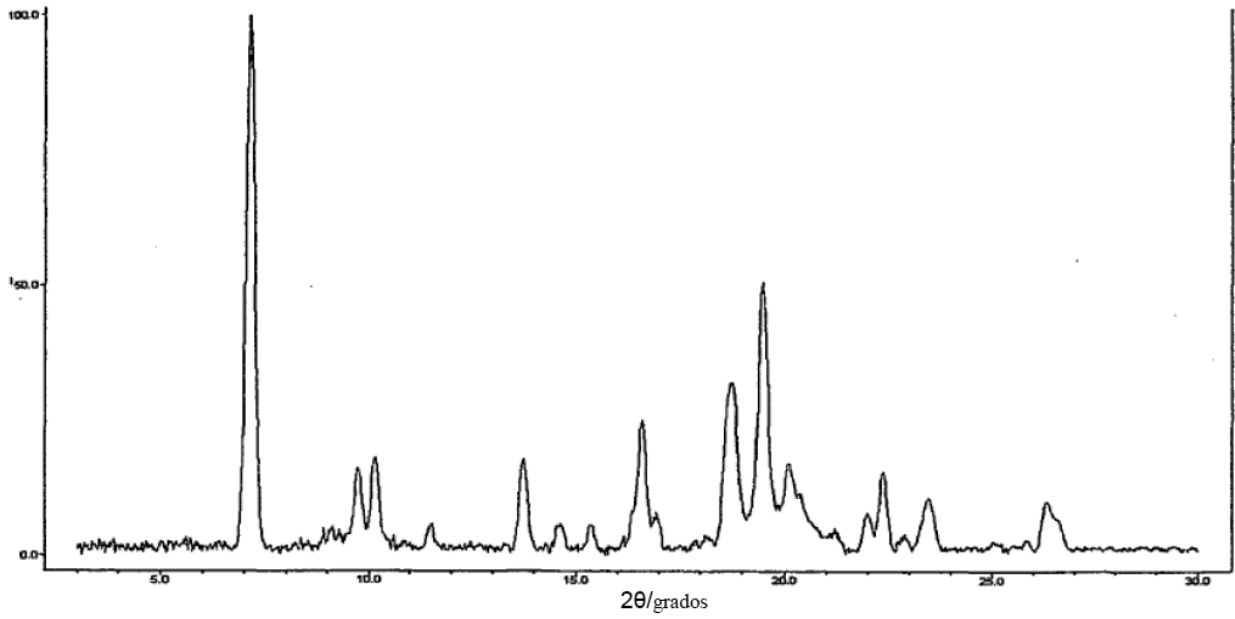


Figura 6

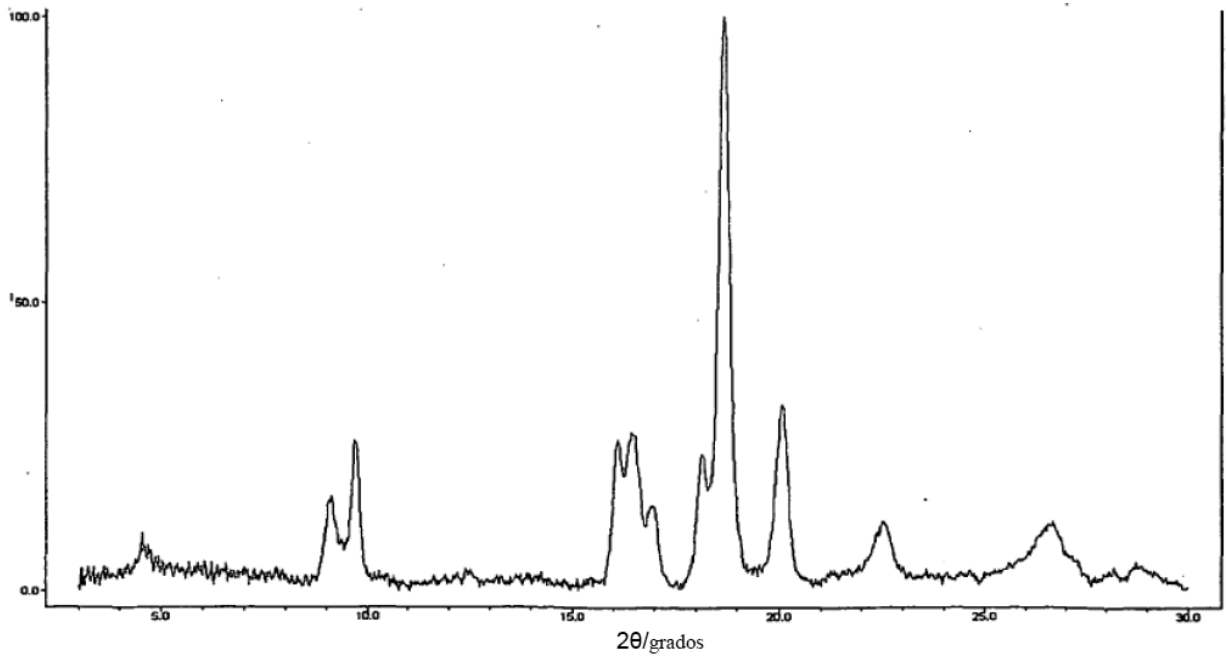


Figura 7

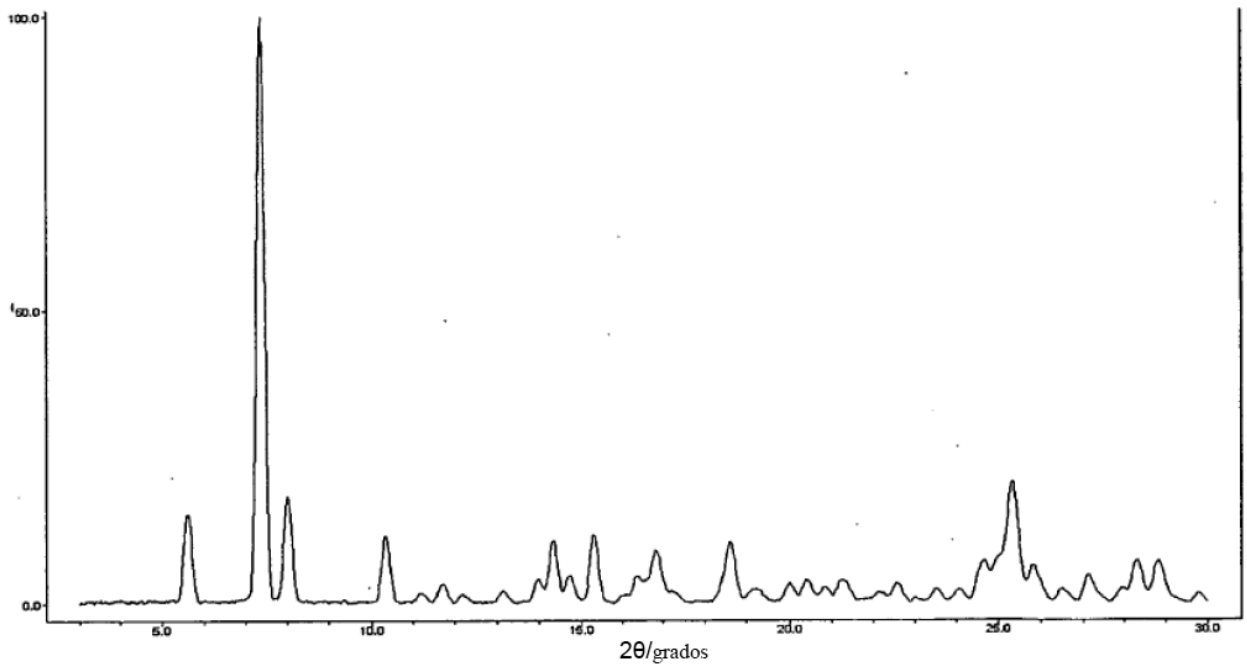


Figura 8

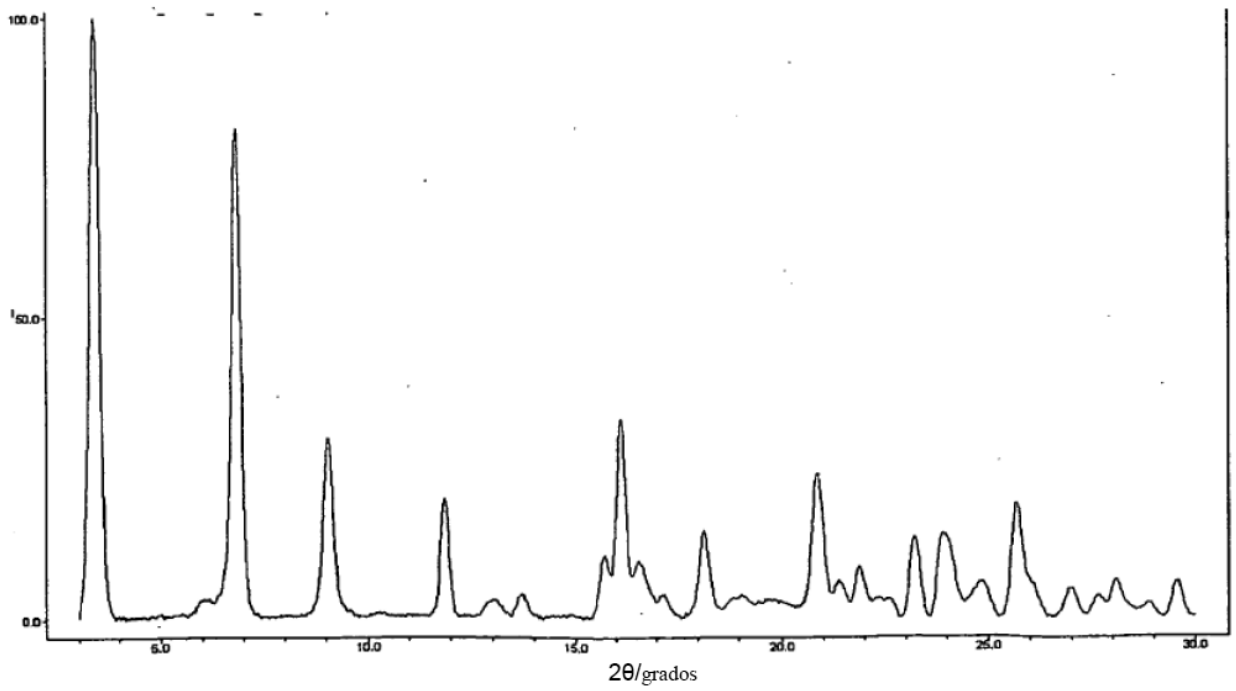


Figura 9

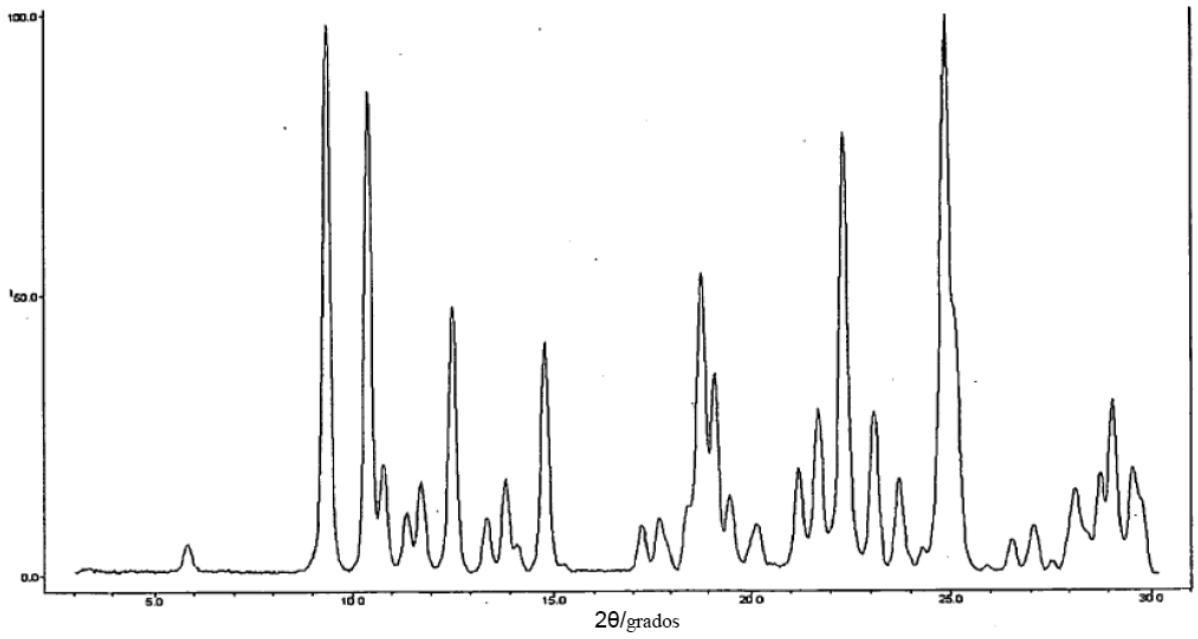


Figura 10

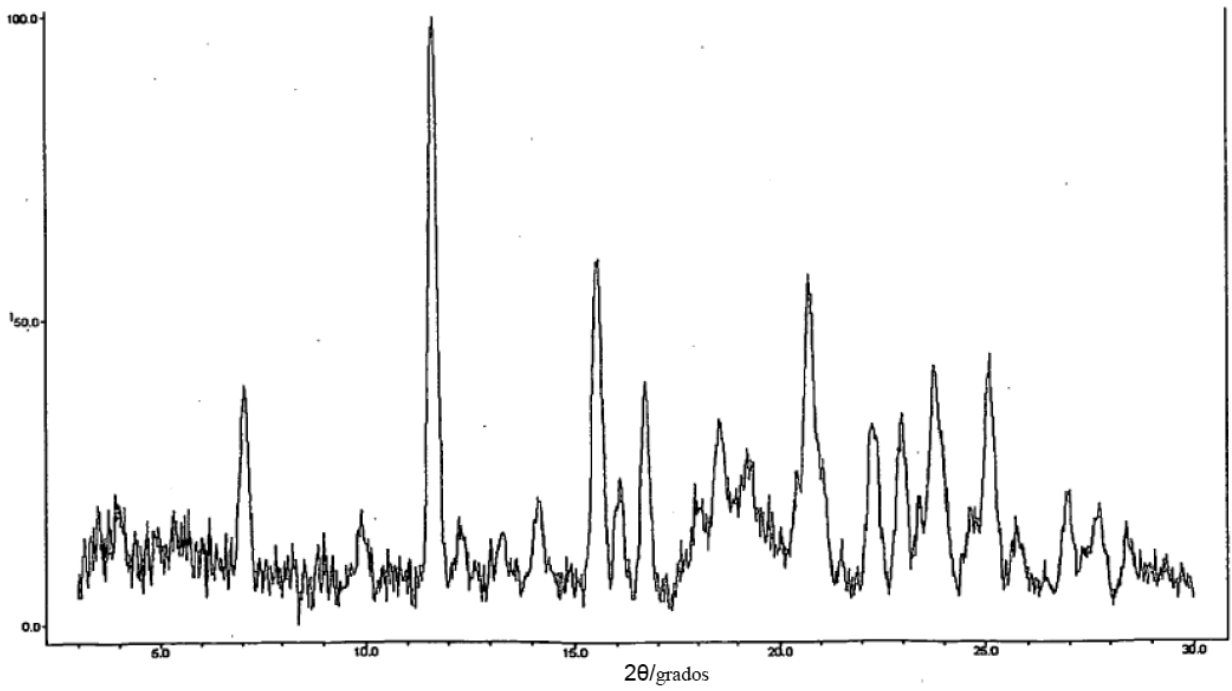


Figura 11

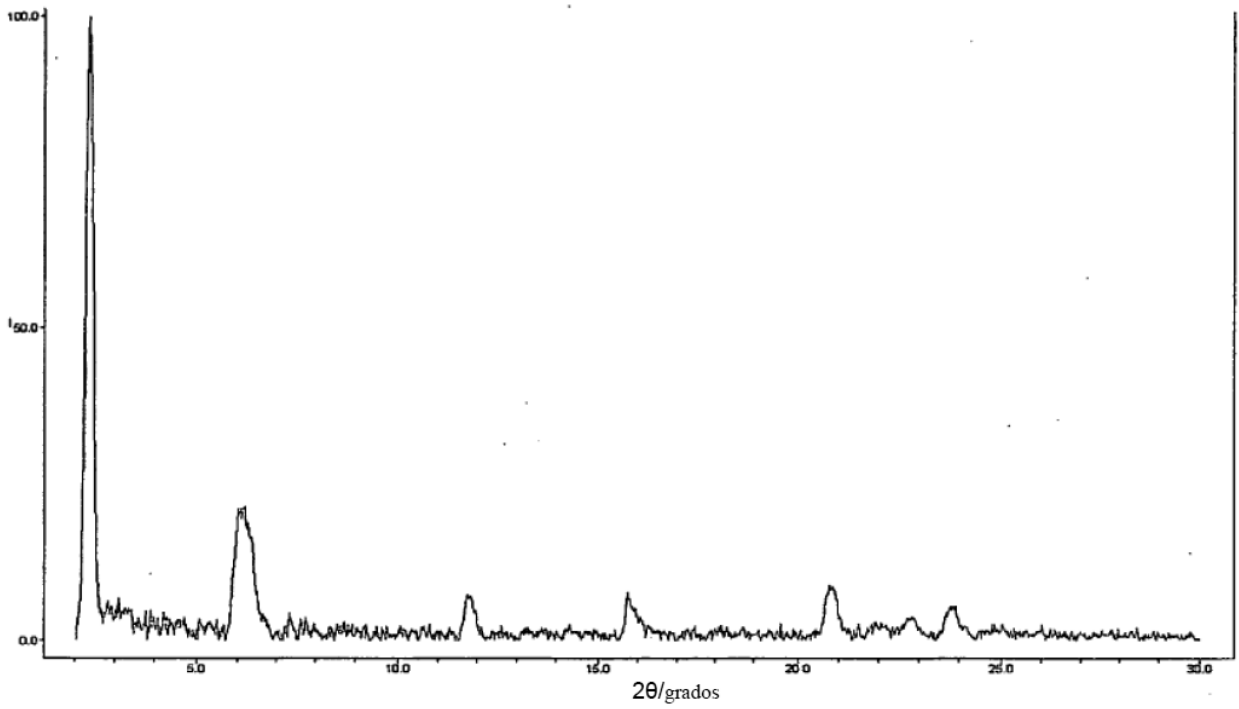


Figura 12

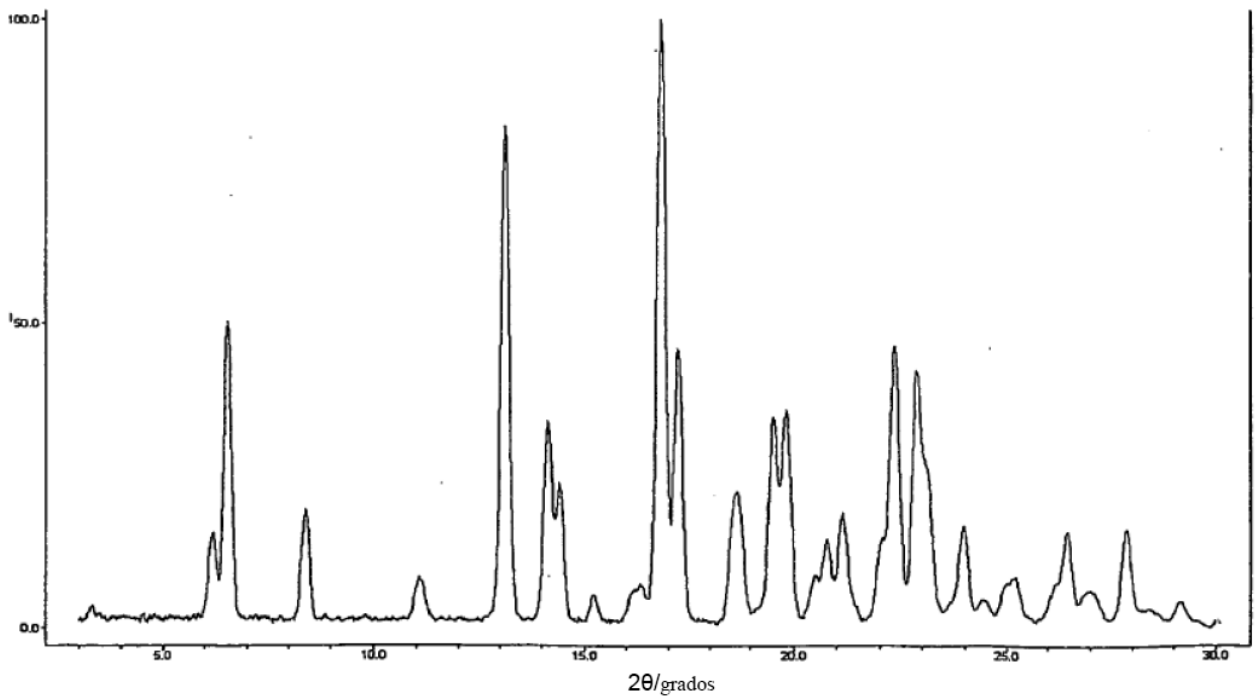


Figura 13

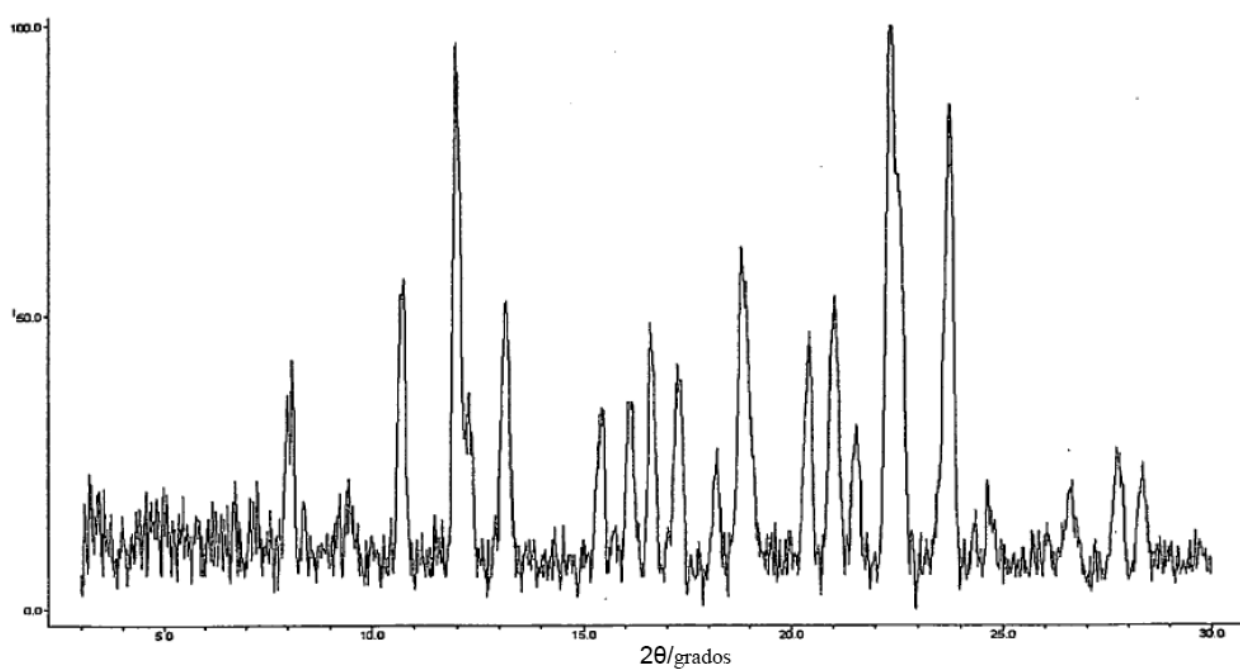


Figura 14

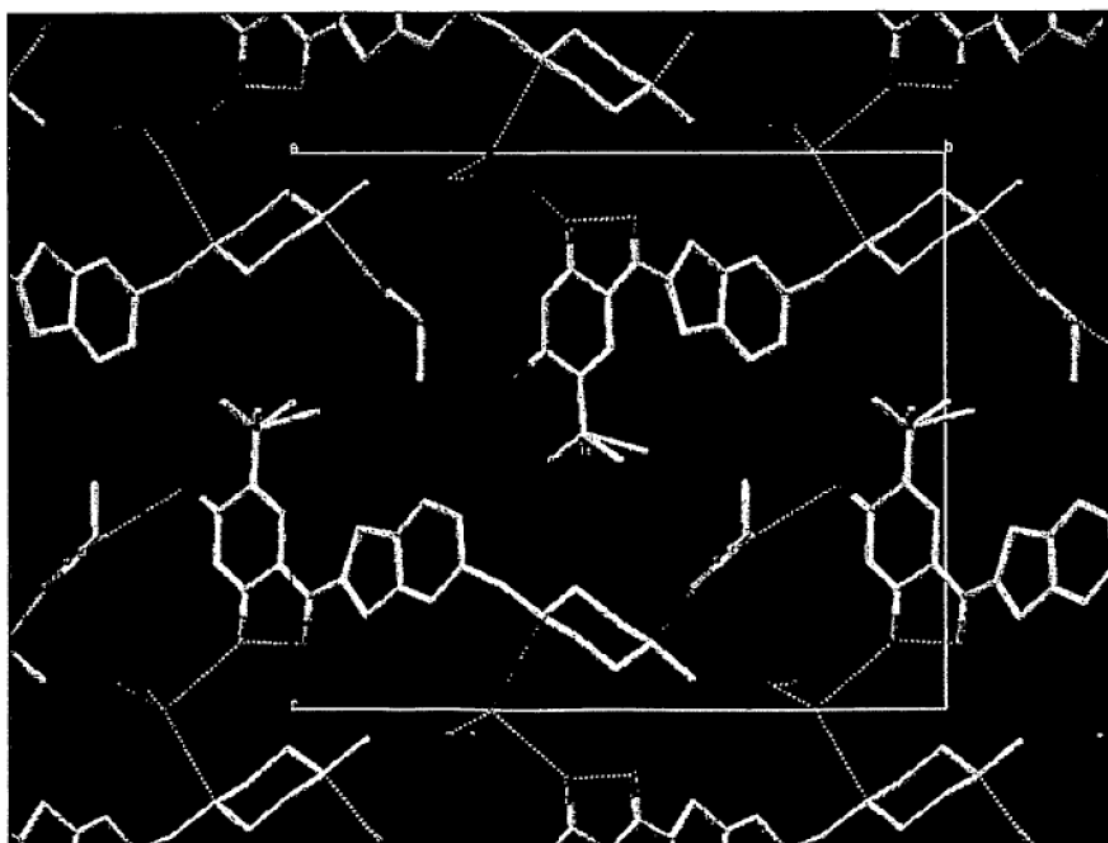


Figura 15

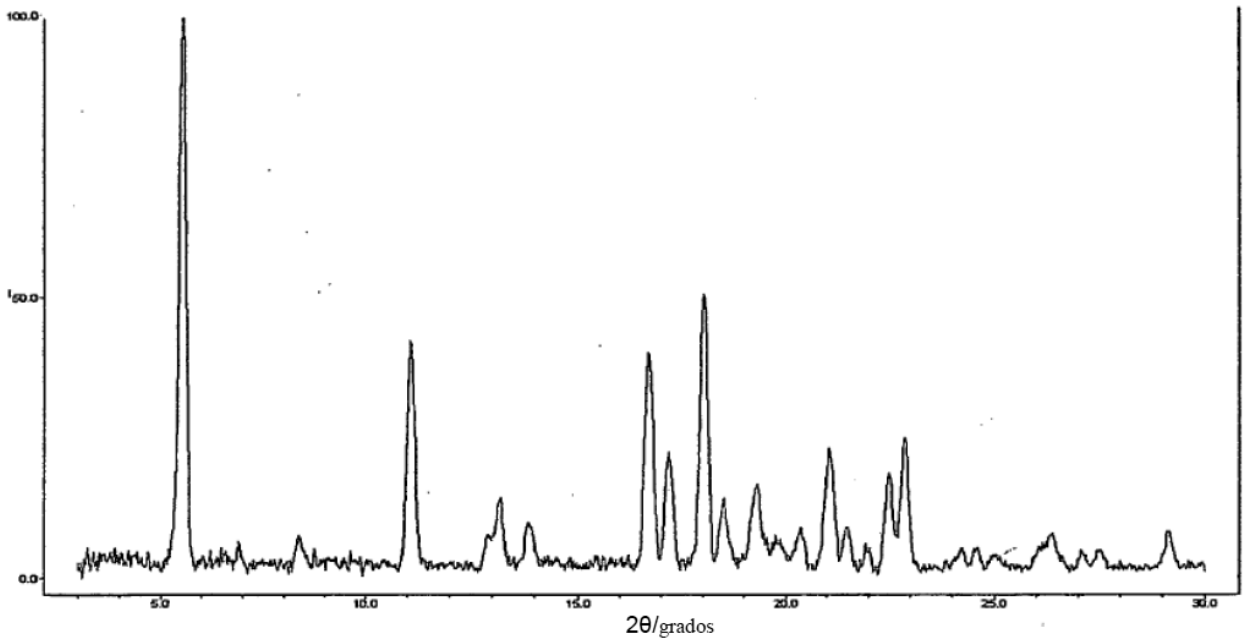


Figura 16

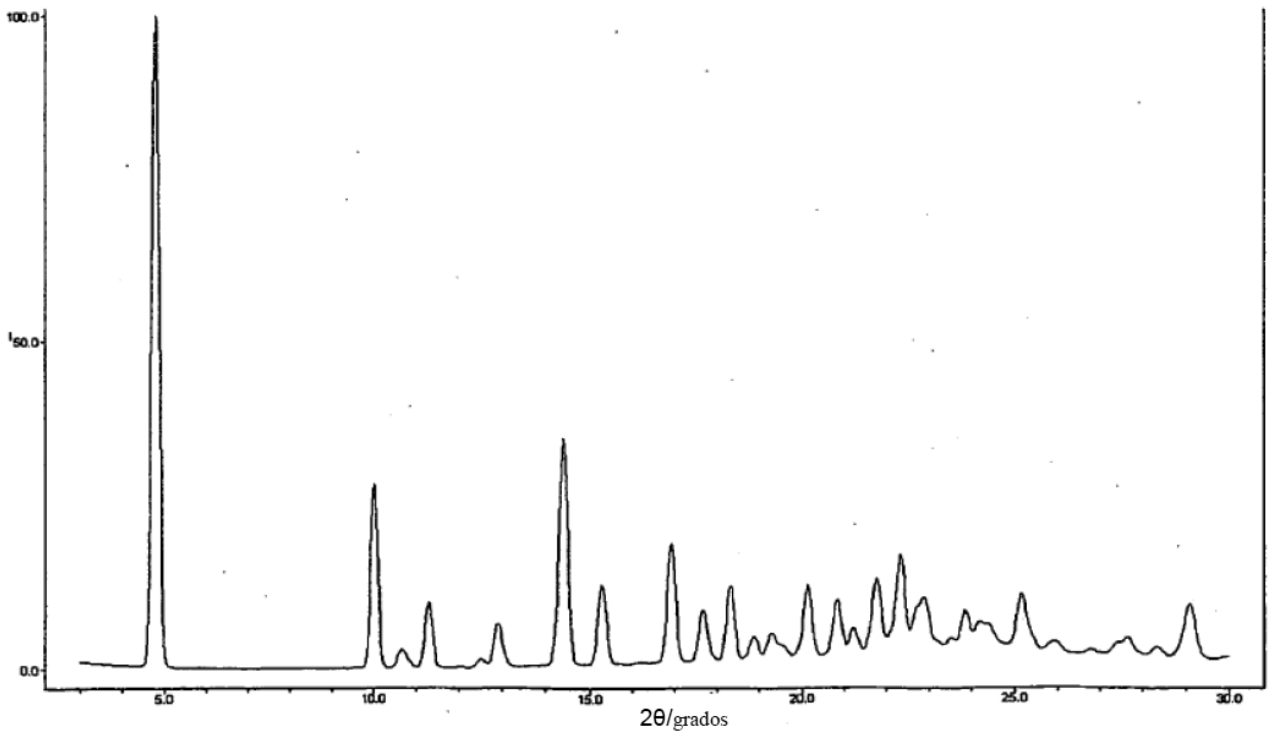


Figura 17

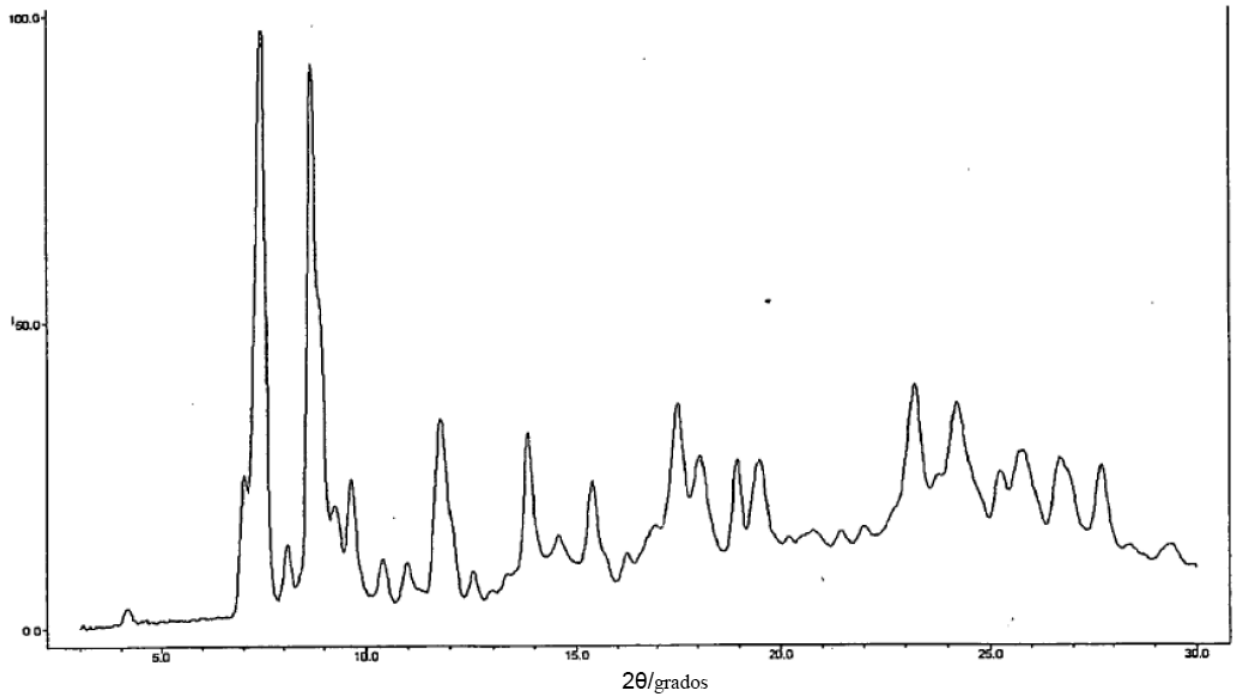


Figura 18

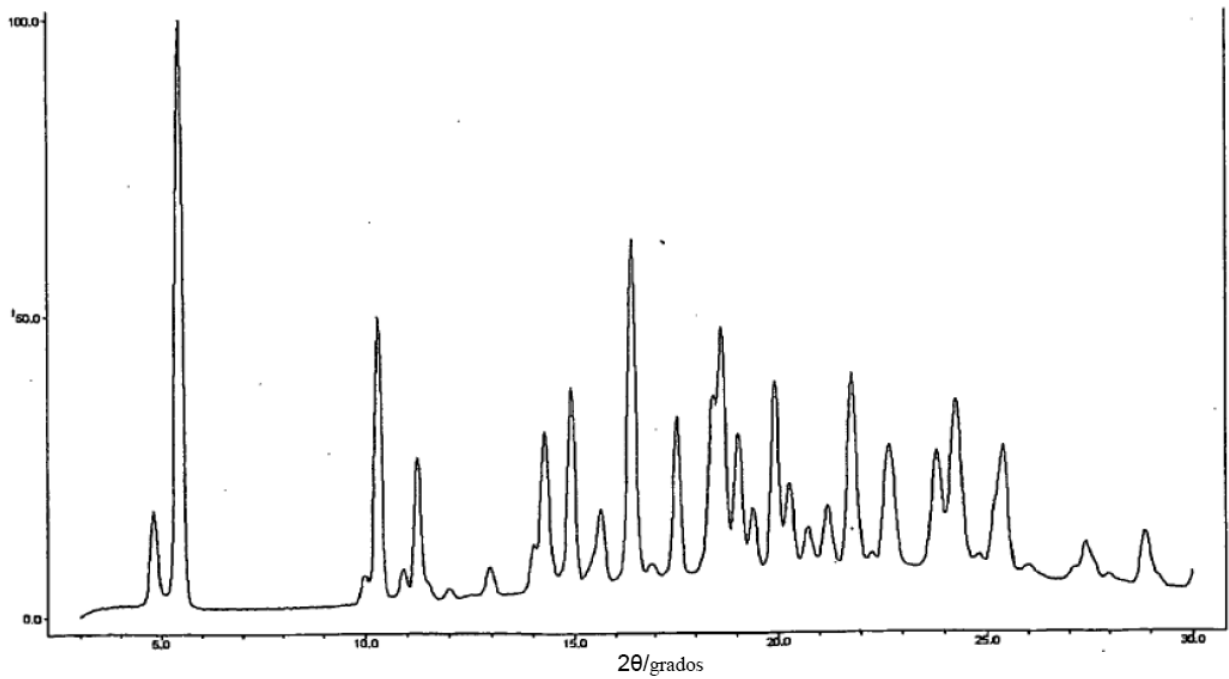


Figura 19

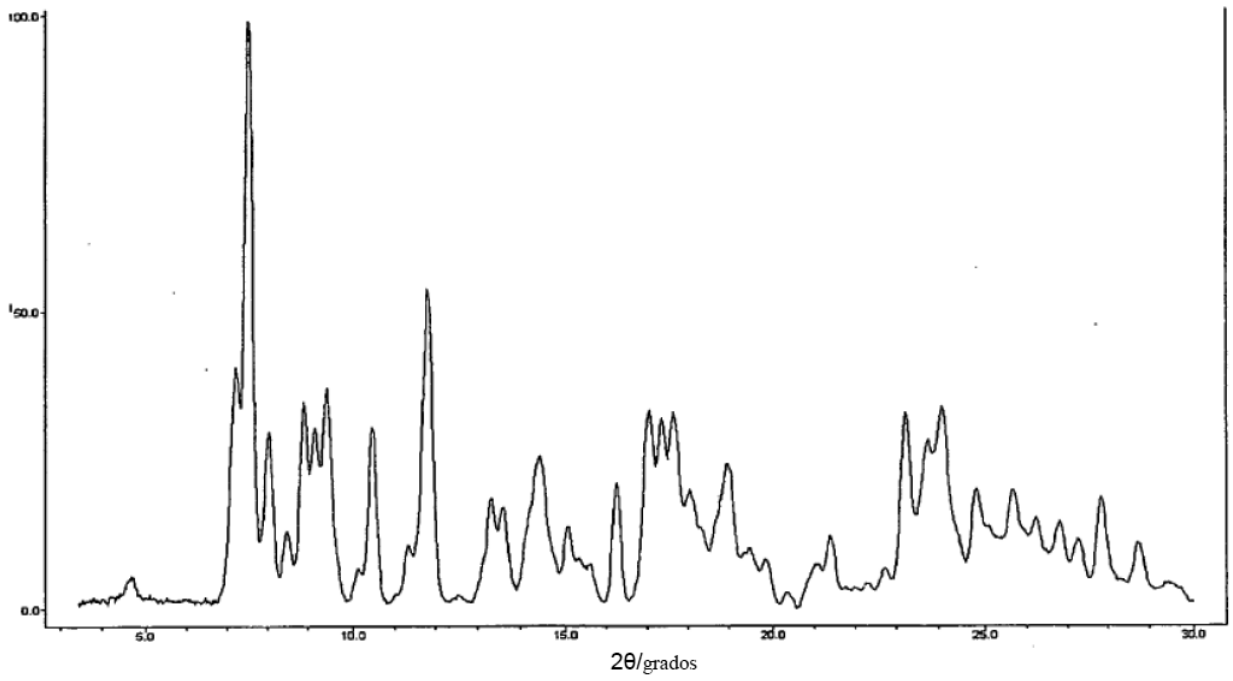


Figura 20

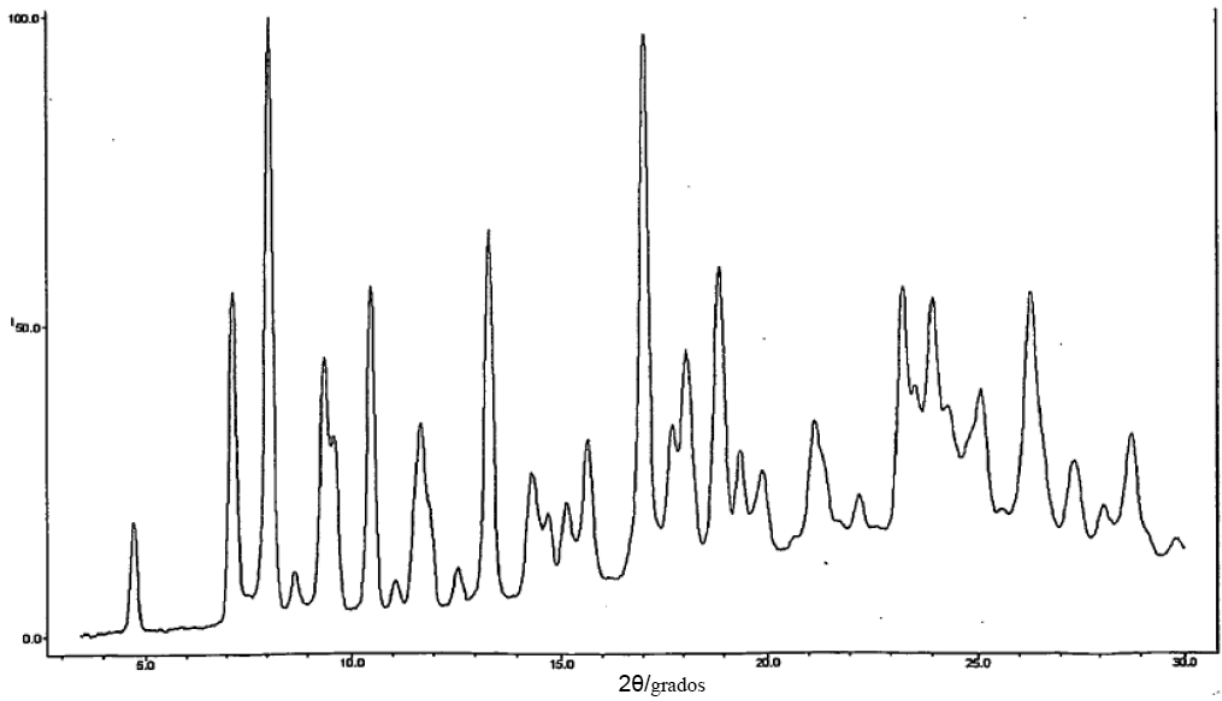


Figura 21

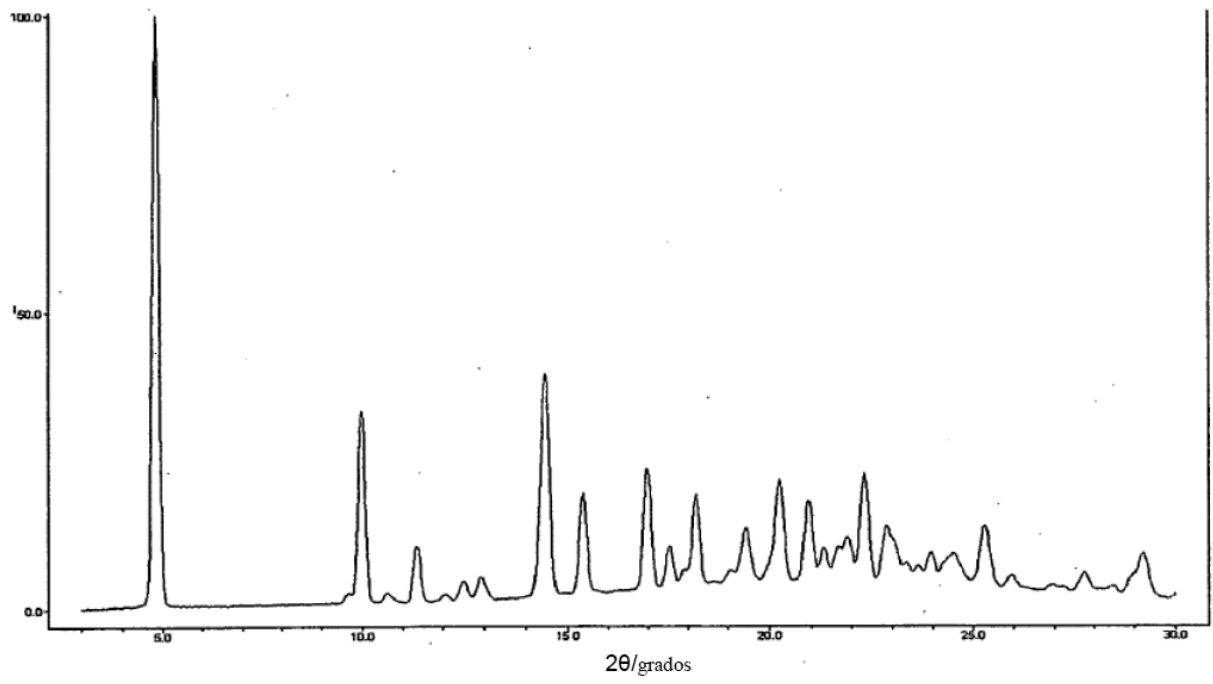


Figura 22