

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 996**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2020 PCT/CN2020/107474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2021 WO21023272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2020 E 20851028 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025 EP 4011881**

54 Título: **Formas cristalinas de un inhibidor de la ATR y su uso**

30 Prioridad:

06.08.2019 CN 201910722102

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

16.04.2025

73 Titular/es:

WUXI BIO CITY BIOPHARMACEUTICS CO., LTD.
(100.00%)

Room 315, Meiliang Road No.88 Mashan, Binhu District

Wuxi, Jiangsu 214000, CN

72 Inventor/es:

WANG, JIAN;

YAO, TING;

QIAN, WENYUAN;

LI, JIAN y

CHEN, SHUHUI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 013 996 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

Formas cristalinas de un inhibidor de la ATR y su uso

5 Prioridad

El documento CN201910722102.7, con la fecha de presentación del 6 de agosto de 2019.

10 Campo técnico

Se proporcionan formas cristalinas de un inhibidor de la ATR y sus procesos de preparación y uso para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad relacionada con la ATR.

15 Antecedentes

La ATR (proteína cinasa relacionada con mutación de ataxia telangiectasia y con Rad3) pertenece a la familia PIKK (cinasa relacionada con la fosfatidilinositol-3-cinasa) y participa en la reparación del daño del ADN para mantener la estabilidad génica. La proteína cinasa ATR tiene una respuesta sinérgica sobre el daño del ADN, el estrés de replicación y las alteraciones del ciclo celular. La ATR y la ATM pertenecen a la familia PIKK de las proteínas cinasas de serina/treonina, y son componentes comunes del ciclo celular y la reparación del daño del ADN, y otros miembros incluyen Chk1, BRCA1, p53. La ATR es principalmente responsable del estrés de replicación del ADN (detención de la horquilla de duplicación) y la reparación de la rotura de una sola hebra.

25 Cuando el ADN bicatenario se rompe o la horquilla de replicación se detiene, la ATR se activa por la estructura del ADN monocatenario. La ADN polimerasa permanece en el proceso de replicación del ADN, y la helicasa de replicación continúa desenrollándose en el extremo conductor de la horquilla de replicación del ADN, lo que da como resultado la producción de ADN monocatenario (ADNmc) largo, que después se une por el ADN monocatenario y la RPA (proteína de replicación A). El complejo proteico de ATR/ATR actuante es reclutado por la RPA tras el estrés de replicación o daño del ADN en el sitio de daño, el complejo de RPA-ADN monocatenario activa el complejo RAD17/rfc2-5 para unirse al sitio de daño, la unión de ADN-ADNmc activa el heterotrímero Rad9-HUS-RAD1 (9-1-1), 9-1-1 a su vez recluta a TopBP1 para activar a la ATR. Una vez que la ATR se activa, la ATR promueve la reparación del ADN a través de las dianas aguas abajo, lo que estabiliza y reinicia las horquillas de replicación detenidas y la detención transitoria del ciclo celular. Estas funciones se logran por la ATR a través de la mediación de la diana Chk1 aguas abajo. La ATR actúa como punto de control para el daño del ADN en el ciclo celular durante la fase S. Puede mediar la degradación de CDC25A a través de Chk1, de esta manera se retrasa el proceso de replicación del ADN y se proporciona tiempo para reparar la horquilla de replicación. La ATR también es el principal regulador del punto de control del ciclo celular en G2/M, al impedir que las células entren en mitosis prematuramente antes de que se complete la replicación del ADN o se dañe el ADN. Esta detención del ciclo celular en G2/M dependiente de la ATR se realiza principalmente mediante dos mecanismos: 1. Degradación de CDC25A; 2. Fosforilación de Cdc25C por Chk1 para unirse a la proteína 14-3. La unión de Cdc25C a la proteína 14-3-3 promueve su exportación desde el núcleo y el aislamiento citoplasmático, de esta manera inhibe su capacidad de desfosforilar y activar Cdc2 nuclear, lo que a su vez impide la entrada en la mitosis.

45 Las mutaciones del gen de la ATR son muy raras, y solo unos pocos pacientes con síndrome de Seckel tienen mutaciones del gen de la ATR, que se caracterizan por retraso en el crecimiento y microcefalia. La interrupción de las vías relacionadas con la ATR puede conducir a la inestabilidad del genoma, y la proteína ATR se activa por la mayoría de las quimioterapias contra el cáncer. Además, la duplicación del gen de la ATR se ha descrito como un factor de riesgo para el rhabdomyosarcoma.

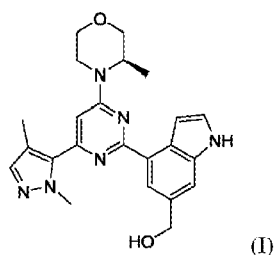
50 La ATR es esencial para la autorreplicación celular y se activa en la fase S para regular el origen de la replicación y reparar las horquillas de replicación dañadas. El daño a las horquillas de replicación puede aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes antineoplásicos de platino e hidroxurea y reducir la resistencia de las células cancerosas. Por lo tanto, la inhibición de la ATR puede ser un método efectivo en el tratamiento del cáncer en el futuro. Los documentos EP3753937, WO2019/036641, WO2011/154737 y WO2019/050889 describen inhibidores de la cinasa ATR.

55 Resumen

60 Se proporciona una Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (I), la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,10 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.

65

ES 3 013 996 T3



En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46 \pm 0,20^\circ$, $8,10 \pm 0,20^\circ$, $13,03 \pm 0,20^\circ$, $15,07 \pm 0,20^\circ$, $15,58 \pm 0,20^\circ$, $16,19 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46 \pm 0,20^\circ$, $8,10 \pm 0,20^\circ$, $13,03 \pm 0,20^\circ$, $13,46 \pm 0,20^\circ$, $15,07 \pm 0,20^\circ$, $15,58 \pm 0,20^\circ$, $16,19 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$, $21,17 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46^\circ$, $8,10^\circ$, $11,24^\circ$, $13,03^\circ$, $13,46^\circ$, $15,07^\circ$, $15,58^\circ$, $15,98^\circ$, $16,19^\circ$, $17,70^\circ$, $18,33^\circ$, $19,60^\circ$, $21,17^\circ$, $22,63^\circ$, $23,84^\circ$, $25,56^\circ$ y $26,57^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina A tiene un patrón de XRPD como se muestra en la Figura 1.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina A tiene un patrón de XRPD con los Datos de Análisis mostrados en la Tabla 1:

Tabla 1: Datos de Análisis del Patrón de XRPD de la Forma Cristalina A

Núm.	Ángulo de 2θ ($^\circ$)	Separación interplanar (Å)	Altura máxima [cts]	Intensidad relativa (%)
1	7,46	11,85	269,54	10,16
2	8,10	10,92	2653,98	100,00
3	11,24	7,87	50,84	1,92
4	13,03	6,79	234,60	8,84
5	13,46	6,58	220,36	8,30
6	15,07	5,88	454,97	17,14
7	15,58	5,69	358,73	13,52
8	15,98	5,55	440,38	16,59
9	16,19	5,48	563,23	21,22
10	17,70	5,01	123,10	4,64
11	18,33	4,84	593,05	22,35
12	19,60	4,53	54,26	2,04
13	21,17	4,20	229,79	8,66
14	22,63	3,93	610,20	22,99
15	23,84	3,73	150,71	5,68
16	25,56	3,49	81,84	3,08
17	26,57	3,35	108,56	4,09

Se proporciona una Forma Cristalina B de un compuesto de la fórmula (I), en donde la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$ y $20,56 \pm 0,20^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$, $14,83 \pm 0,20^\circ$, $15,54 \pm 0,20^\circ$, $17,33 \pm 0,20^\circ$, $20,56 \pm 0,20^\circ$, $22,00 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$, $14,83 \pm 0,20^\circ$, $15,54 \pm 0,20^\circ$, $17,33 \pm 0,20^\circ$, $20,08 \pm 0,20^\circ$, $20,56 \pm 0,20^\circ$, $22,00 \pm 0,20^\circ$, $22,63 \pm 0,20^\circ$ y $25,26 \pm 0,20^\circ$.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ :

ES 3 013 996 T3

8,45°, 9,20°, 10,87°, 12,57°, 14,14°, 14,53°, 14,83°, 15,54°, 16,80°, 17,33°, 18,43°, 19,84°, 20,08°, 20,56°, 21,39°, 22,00°, 22,44°, 22,63°, 23,26°, 25,26°, 25,85° y 26,98°.

5 En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de XRPD como se muestra en la Figura 2.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de XRPD con los Datos de Análisis mostrados en la Tabla 2:

10

Tabla 2: Datos de Análisis del Patrón de XRPD de la Forma Cristalina B

Núm.	Ángulo de 2θ (°)	Separación interplanar (Å)	Altura máxima [cts]	Intensidad relativa (%)
1	8,45	10,47	6122,78	46,61
2	9,20	9,62	230,71	1,76
3	10,87	8,14	5097,37	38,80
4	12,57	7,04	196,72	1,50
5	14,14	6,26	330,21	2,51
6	14,53	6,10	2326,39	17,71
7	14,83	5,97	2921,87	22,24
8	15,54	5,70	3353,73	25,53
9	16,80	5,28	127,81	0,97
10	17,33	5,12	1550,97	11,81
11	18,43	4,81	127,76	0,97
12	19,84	4,48	505,61	3,85
13	20,08	4,42	1930,70	14,70
14	20,56	4,32	13 137,09	100,00
15	21,39	4,15	482,03	3,67
16	22,00	4,04	2057,14	15,66
17	22,44	3,96	2064,89	15,72
18	22,63	3,93	1791,66	13,64
19	23,26	3,82	1209,28	9,21
20	25,26	3,53	1512,61	11,51
21	25,85	3,45	377,13	2,87
22	26,98	3,30	280,24	2,13

35

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene una curva de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) que tiene un punto de inicio de valor máximo endotérmico en $174,3 \pm 3$ °C.

40

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de DSC como se muestra en la Figura 3.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene una curva de Análisis Termogravimétrico (TGA), en donde la pérdida de peso a 150 °C \pm 3 °C es de 1,49 %.

45

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la Forma Cristalina B tiene un patrón de TGA como se muestra en la Figura 4.

Se proporciona un proceso para preparar una Forma Cristalina A de un compuesto de la fórmula (I), que comprende:

50

- 1) añadir el compuesto de la fórmula (I) a solvente de etanol;
- 2) añadir agua;
- 3) agitar durante 100-120 h;
- 4) realizar la recristalización a temperatura ambiente para obtener la Forma Cristalina A.

55

Se proporciona un proceso para preparar una Forma Cristalina B de un compuesto de la fórmula (I), que comprende:

60

- 1) añadir el compuesto de la fórmula (I) a un solvente;
- 2) calentar a una temperatura con agitación durante 2,5-120 h;
- 3) realizar la recristalización a temperatura ambiente para obtener la Forma Cristalina B.

65

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, el solvente es: metanol, éter metil terciario butílico, metanol/agua (V/V, 1:0,3-1), acetona/agua (V/V, 1:1), isopropanol/agua (V/V, 1:1), acetato de etilo/n-heptano (V/V, 1:1), acetato de isopropilo/n-heptano (V/V, 1:1), etanol/n-heptano (V/V, 1:1), acetonitrilo/n-heptano (V/V, 1:1), isopropanol/n-heptano (V/V, 1:1) o diclorometano/n-heptano (V/V, 1:1).

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la temperatura es de 25-70 °C.

ES 3 013 996 T3

Se proporciona un proceso para preparar una Forma Cristalina B de un compuesto de la fórmula (I), que comprende:

- 1) añadir el compuesto de la fórmula (I) a solvente de alcohol;
- 2) añadir agua;
- 3) agitar durante 15-20 h;
- 4) realizar la recristalización a temperatura ambiente para obtener la Forma Cristalina B.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, la relación en volumen del solvente de alcohol y agua es 1:1-1:4.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, el solvente de alcohol se selecciona del grupo que consiste en metanol.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, el intervalo de concentración del compuesto de la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en 25 mg/ml-50 mg/ml.

También se proporciona el uso del compuesto de la fórmula (I), la Forma Cristalina A o la Forma Cristalina B para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a la ATR.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, el medicamento es para su uso en el tratamiento de un tumor sólido o un tumor sanguíneo.

En algunas modalidades de acuerdo con la presente descripción, el medicamento es para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma peritoneal primario, carcinoma corticosuprarrenal, carcinoma de células claras renales, cáncer de próstata, carcinoma urotelial de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinoma endometrial, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

Efecto técnico

La Forma Cristalina A y la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la presente descripción son estables, se afectan menos por la luz, el calor y la humedad, tienen una buena eficacia farmacológica in vivo y son prometedoras para la capacidad de convertirse en fármaco.

Definición y descripción

A menos que se indique de cualquier otra manera, los siguientes términos y frases tienen las siguientes definiciones. Un término o frase específico no debe considerarse indefinido o poco claro sin una definición específica y debe entenderse de acuerdo con los significados normales. Un nombre comercial usado en la presente descripción se referirá al artículo correspondiente o al ingrediente activo.

Los compuestos intermediarios en la presente descripción pueden prepararse mediante varios procesos de síntesis bien conocidos por un experto en la técnica, que incluyen las modalidades específicas enumeradas más abajo, las modalidades mediante una combinación con otros procesos de síntesis química, y alternativas equivalentes bien conocidas por un experto en la técnica. Las modalidades preferidas incluyen, pero no se limitan a, los Ejemplos más abajo.

La reacción química de las modalidades específicas se realiza en un solvente adecuado y el solvente debe ser adecuado para los cambios químicos de la presente descripción y los reactivos y materiales requeridos. Para obtener el compuesto de la presente descripción, un experto en la técnica puede modificar o seleccionar una etapa de síntesis o un esquema de reacción basado en las modalidades disponibles.

La presente descripción se describirá de una manera detallada y los Ejemplos no deben considerarse como limitación a esta.

Los solventes usados en la presente descripción están disponibles comercialmente y pueden usarse sin necesidad de purificación adicional.

Los solventes usados en la presente descripción pueden estar disponibles comercialmente. Las siguientes abreviaturas se usan en la presente descripción: EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; TFA representa ácido trifluoroacético; TsOH representa ácido p-toluenosulfónico; mp representa punto de fusión; EtSO₃H representa ácido etanosulfónico; MeSO₃H representa ácido metanosulfónico; THF representa tetrahidrofurano; EtOAc representa acetato de etilo.

Difractómetro de rayos X en polvo (XRPD)

Dispositivo:

Método de análisis: se usan aproximadamente 10-20 mg de la muestra para la detección por XRPD.

Los parámetros de XRPD detallados son los siguientes:

- 5 Fuente de radiación: Cu, $K\alpha$ ($K\alpha_1=1,540598 \text{ \AA}$, $K\alpha_2=1,544426 \text{ \AA}$, relación de intensidad $K\alpha_2/K\alpha_1$: 0,5)
 Tensión del tubo de luz: 45 kV, Corriente del tubo de luz: 40 mA
 Rendija de divergencia: fija a 1/8 grados
 1^{ra} rendija de soller: 0,04 rad
 2^{da} rendija de soller: 0,04 rad
 10 Rendija receptora: ninguna
 Rendija antidispersión: 7,5 mm
 Tiempo de medición: 5 min
 Intervalo de ángulo de barrido: 3-40 grados
 Ángulo de ancho de etapa: 0,0263 grados
 15 Tiempo/etapa: 46,665 segundos
 Velocidad de la placa de la muestra: 15 rpm

Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC)

- 20 Dispositivo: Calorímetro Diferencial de Barrido TA Q200/Q2000/2500
 Método de análisis: La muestra (aproximadamente 1-5 mg) se coloca en una placa de aluminio de DSC para el análisis, bajo 50 ml/min de N_2 , y se calienta de 25 °C (temperatura ambiente) hasta la descomposición a la velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

25 Analizador Gravimétrico Térmico (TGA)

- Dispositivo: Analizador Gravimétrico Térmico TA Q5000/5500
 Método de análisis: La muestra (aproximadamente 1-5 mg) se coloca en una placa de aluminio del TGA para el análisis, bajo 10 ml/min de N_2 , y se calienta de temperatura ambiente a 350 °C a la velocidad de calentamiento de 10 °C/min.
 30

Breve descripción de las Figuras

- 35 La Figura 1 muestra el patrón de XRPD a radiación Cu- $K\alpha$ de la Forma Cristalina A del compuesto de la Fórmula (I);
 La Figura 2 muestra el patrón de XRPD a radiación Cu- $K\alpha$ de la Forma Cristalina B del compuesto de la Fórmula (I);
 La Figura 3 muestra el patrón de DSC de la Forma Cristalina B del compuesto de la Fórmula (I);
 La Figura 4 muestra el patrón de TGA de la Forma Cristalina B del compuesto de la Fórmula (I).

40

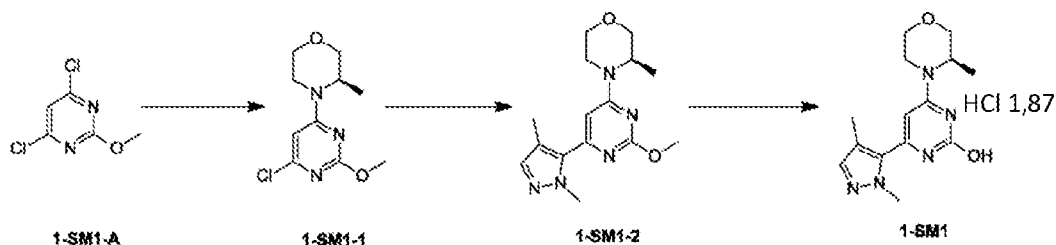
Descripción detallada

Para una mejor comprensión de la presente descripción, se proporcionará más abajo una descripción adicional por referencia a los ejemplos específicos, que no son ninguna limitación a estos.

45

Ejemplo 1: Preparación del compuesto de la fórmula (I)

50



55

Etapa 1: Preparación del compuesto 1-SM1-2

- 60 Se añadieron 4,0 l de dimetilsulfóxido a un reactor de tanque de 50 l a temperatura ambiente, al que se añadieron sucesivamente 1-SM1-A (1500,69 g, 8,39 mol), (R)-3-Metilmorfolina (854,97 g, 8,45 mol), carbonato de potasio (2891 g, 20,92 mol), y después se añadieron nuevamente 6,0 l de dimetilsulfóxido para la dilución. Después de la adición, el sistema de reacción se agitó a 95 °C durante 3 h. Después de detectar la conversión completa a 1-SM1-1, la temperatura se redujo a 45 °C y el reactor de tanque se purgó con nitrógeno durante 5 min y después se añadió éster de pinacol de ácido 1,4-dimetilpirazol-5-borónico (1952,44 g, 8,79 mol), tetraquis(trifenilfosfina)paladio (192,98 g, 0,167 mol). Después de la adición, se añadieron 2,0 l de dimetilsulfóxido para enjuagar la pared interior, y después se realizó

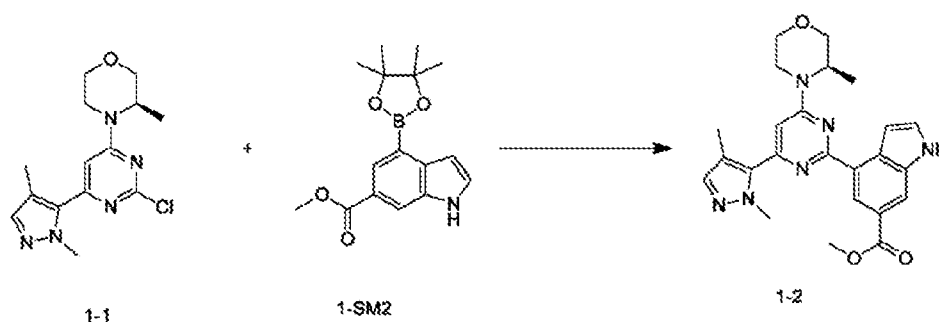
65

sodio (4 M) y la temperatura se controló a 20-40 °C. Después de ajustar el pH, se añadieron 7,5 l de acetato de etilo al reactor de tanque con agitación uniforme para el estratificado. La fase acuosa se extrajo con 15,0 l de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con 12,0 l de salmuera saturada, se concentraron a presión reducida a ninguna fracción para dar el producto crudo. El producto crudo se disolvió con 1,5 l de éter metil terciario butílico, al que se añadieron 12,0 l de n-heptano en porciones con agitación, y la mezcla se agitó durante 5 min y se filtró. La torta de filtración se enjuagó con 5,0 l de n-heptano, y el sólido se colocó en una bandeja y se dejó secar espontáneamente para dar el Compuesto 1-1.

MS m/z : 308,0[M+H]⁺

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,29 (br d, *J*=6,78 Hz, 3 H) 2,17 (s, 3 H) 3,24 - 3,32 (m, 1 H) 3,52 (br s, 1 H) 3,63 - 3,69 (m, 1 H) 3,78 (br d, *J*=11,54 Hz, 1 H) 3,96 (s, 3 H) 4,01 (br s, 1 H) 4,14 (br s, 1 H) 4,47 (br s, 1 H) 6,89 (s, 1 H) 7,42 (s, 1 H)

Etapa 5: Preparación del compuesto 1-2



A 20-30 °C bajo protección de nitrógeno, se añadieron 2,1 l de dimetilsulfóxido a una caldera de vidrio de 10 l con agitación, a la que se añadieron el Compuesto 1-1 (0,21 kg), el Compuesto 1-SM2 (0,306 kg), la solución acuosa de carbonato de sodio (1,3 M, 1,05 l), [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,00749 kg) sucesivamente con un embudo de adición. El sistema de reacción se calentó a una temperatura interna de 60-70 °C, y la temperatura se mantuvo durante 4-16 h. El sistema se enfrió a 40-45 °C, al que se añadieron gota a gota 5,25 l de agua dentro de 30 min, y después se agitó durante 30 min. El sistema se filtró con succión y la torta de filtración se lavó con 2,1 l de agua. El secado al vacío a 45 °C dio el producto crudo. Al producto crudo obtenido en la etapa anterior se le añadieron 2,625 l de acetato de etilo. Después de agitar uniformemente hasta la disolución, se añadieron de nuevo 10,5 l de éter metil terciario butílico con agitación adicional durante 30 min. Después de la filtración con embudo de Buchner recubierto con celite, la capa de celite se lavó nuevamente con una solución mezclada de 2,1 l de acetato de etilo y éter metil terciario butílico (relación de volumen 1:4). Los filtrados se combinaron y la fase orgánica se concentró para dar un concentrado. Se recogió la torta de filtración negra superior de celite, a la que se añadieron 1,5 l de acetato de etilo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, se realizó la filtración con un embudo de Buchner recubierto con celite, la torta de filtración se lavó con 0,5 l de acetato de etilo y el filtrado se concentró. Los concentrados obtenidos en las dos etapas anteriores se combinaron.

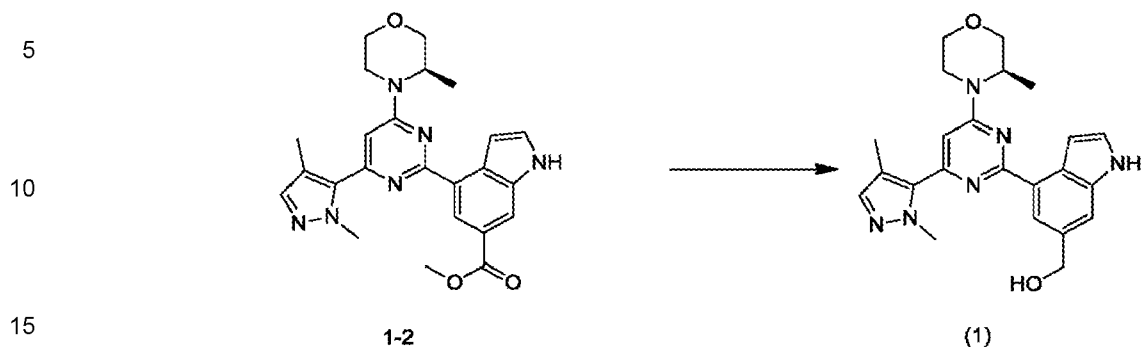
Al concentrado obtenido previamente se añadieron 1,5 l de acetato de etilo para la disolución, y después se añadió lentamente gota a gota a una solución de 4,5 l de n-heptano en agitación (1,5 h), y después se agitó adicionalmente durante 2 h. El sistema se filtró y la torta de filtración se lavó con una solución mezclada de 0,4 l de acetato de etilo y n-heptano (relación de volumen 1:3). Después del secado al vacío, la torta de filtración se añadió a un matraz de un cuello de 2 l, al que se añadió 0,8 l de acetato de isopropilo. Después del reflujo durante 4 h, el sistema de reacción se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El sistema de reacción se filtró con un embudo de Buchner y la torta de filtración se lavó con 0,3 l de acetato de isopropilo. El sólido se recogió y se secó al vacío para dar el producto.

El producto se disolvió en 4,2 l de acetato de etilo y se añadieron 42 g de carbón activado con agitación. El sistema de reacción se agitó durante la noche a reflujo, se filtró mientras estaba caliente y se filtró a través de un embudo de Buchner recubierto con celite. La capa de celite se lavó nuevamente con 2,0 l de acetato de etilo y los filtrados se combinaron. La fase orgánica se concentró a 3,0 l. Se añadieron 1,2 l de acetato de etilo y 43 g de carbón activado a la fase orgánica anterior, que se agitó a reflujo durante 8 h y después se filtró mientras estaba caliente. El sistema de reacción se filtró a través de un embudo de Buchner recubierto con celite. La capa de celite se lavó con 2,0 l de acetato de etilo y los filtrados se combinaron. La fase orgánica se concentró y secó al vacío para dar el Compuesto 1-2.

MS m/z : 447,0 [M+H]⁺

RMN ¹H (CHCl₃-*d*, 400 MHz): δ = 8,98 (d, *J*=1,3 Hz, 1H), 8,57 (br s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,58 (d, *J*=2,0 Hz, 1H), 7,49 (t, *J*=2,8 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 4,48 (br s, 1H), 4,29 (br d, *J*=12,5 Hz, 1H), 4,17 (s, 3H), 4,13 (dd,

J=11,9, 2,9 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,87-3,93 (m, 1H), 3,80-3,87 (m, 1H), 3,69 (td, J=11,9, 3,0 Hz, 1H), 3,44 (td, J=12,8, 3,8 Hz, 1H), 2,25 (s, 3H), 1,44 ppm (d, J=7,0 Hz, 3H)



Etapa 6: Preparación del compuesto de la fórmula (1)

20 A 20 °C, se añadió hidruro de litio y aluminio (63,0 ml, 2,5 M) al Compuesto 1-2 (35,0 g, 78,39 mmol) en tetrahidrofurano (50,0 ml), y el sistema de reacción se agitó a 20 °C durante 1 h. A 0-5 °C, se añadieron lentamente 6,9 ml de agua, 6,9 ml de hidróxido de sodio al 15 % y 20,7 ml de agua a la solución de reacción sucesivamente, la que después se filtró. El filtrado se concentró para dar el producto crudo, que se separó por cromatografía en columna (acetato de etilo/éter de petróleo: 50-100 %) para dar el producto. El producto anterior se disolvió en 20,0 ml de dimetilsulfóxido a temperatura ambiente, se añadió lentamente gota a gota a 400 ml de agua agitada, se filtró y se secó para dar el compuesto de la fórmula (1).

MS m/z: 419,1 [M+H]⁺

30 RMN ¹H (400 MHz, CHCl₃-d) δ ppm 8,39 (br s, 1 H), 8,28 (s, 1 H), 7,58 (s, 1 H), 7,51 (br s, 1 H), 7,42 (s, 1 H), 7,35 (t, J=2,76 Hz, 1 H), 6,49 (s, 1 H), 4,89 (s, 2 H), 4,51 (br s, 1 H), 4,30 (br d, J=14,05 Hz, 1 H), 4,11 - 4,18 (m, 4 H), 3,81 - 3,94 (m, 2 H), 3,70 (td, J=11,86, 3,14 Hz, 1 H), 3,44 (td, J=12,86, 3,89 Hz, 1 H), 2,26 (s, 3 H), 1,45 (d, J=6,78 Hz, 3 H)

Ejemplo 2: Preparación de la Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (1)

35 Se pesaron aproximadamente 500,0 mg del compuesto de la fórmula (1) y se disolvieron en 5 ml de etanol, a los que se añadieron gota a gota 15 ml de agua purificada. Después de la adición, el sistema de reacción se colocó en un agitador magnético (20 °C) y se agitó durante 120 h. La suspensión se filtró para dar un sólido, que se secó durante la noche en un gabinete de secado al vacío para dar la Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (1).

40 RMN ¹H (400 MHz, CHCl₃-d) δ = 8,39 (br s, 1H), 8,25 (d, J=1,3 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,49 (t, J=2,3 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,31 (t, J=2,8 Hz, 1H), 6,46 (s, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,48 (br d, J=4,8 Hz, 1H), 4,28 (br d, J=12,5 Hz, 1H), 4,15 - 4,07 (m, 4H), 3,91 - 3,86 (m, 1H), 3,84 - 3,79 (m, 1H), 3,67 (dt, J=3,0, 11,9 Hz, 1H), 3,42 (dt, J=3,9, 12,9 Hz, 1H), 2,23 (s, 3H), 1,42 (d, J=7,0 Hz, 3H)

45 Ejemplo 3: Preparación de la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (1)

50 Se añadieron aproximadamente 100 mg del compuesto de la fórmula (1) en diferentes botellas de vidrio, a las que se añadieron cantidades apropiadas de solventes orgánicos o mezclas de solventes (Tabla 3). Las muestras anteriores se agitaron en un mezclador de temperatura constante (40 °C) (véase la Tabla 3 para determinar el tiempo de agitación) (con protección de la luz). Después, el sólido se filtró y se colocó en un gabinete de secado al vacío (40 °C) para realizar el secado durante la noche. Todos los tratamientos dieron la Forma Cristalina B.

Tabla 3. Varias cantidades apropiadas de solventes orgánicos y tiempo de agitación

55

Solvente (ml)	Tiempo de agitación (h)
Acetona 0,7+ Agua 0,7	120
Isopropanol 1+ Agua 1	72
Metanol 1+ Agua 1	120
Éter metil terciario butílico 1	72
60 Acetato de etilo 1+ n-heptano 1	120
Acetato de isopropilo 1+ n-heptano 1	120
Etanol 1+ n-heptano 1	120
Acetonitrilo 1+ n-heptano 1	120
Isopropanol 1+ n-heptano 1	120
65 Diclorometano 2+ n-heptano 2	120

ES 3 013 996 T3

Ejemplo 4: Preparación de la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (1)

El compuesto de la fórmula (1) (véase la Tabla 4 para la masa) se añadió lentamente al solvente de metanol a (60-70 °C) (véase la Tabla 4 para el volumen), y después se añadió lentamente agua (véase la Tabla 4 para el volumen). Después de agitar durante 0,5 h a 60 °C, la temperatura se redujo a 55 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 50 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 45 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 40 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 35 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 30 °C y se agitó durante 0,5 h. Después, la temperatura se redujo a 20-25 °C y se agitó durante 10 h. El sólido se filtró para dar la Forma Cristalina B.

Tabla 4. Varias cantidades apropiadas de solventes orgánicos y tiempo de agitación

Compuesto de la fórmula (1) (g)	Solvente (ml)	Tiempo de agitación (h)
3	Metanol 30	13,5
2	Metanol 40+Agua 40	13,5
2	Metanol 40+Agua 20	13,5
2	Metanol 40+Agua 13,3	13,5

Ejemplo 5: Preparación de la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (1)

Procedimiento experimental: Se añadieron lentamente aproximadamente 5,5 g del compuesto de la fórmula (1) a 50 ml de solvente de metanol a (60-70 °C). Después de agitar a 60 °C durante 0,5 h, la temperatura se redujo a 25 °C y se agitó durante 2 h, y el sólido se filtró para dar la Forma Cristalina B.

Ejemplo 6: Preparación de la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (1)

Se disolvieron 900,0 g del compuesto de la fórmula (1) en 9,0 l de metanol, al que se añadieron lentamente gota a gota 9,0 l de agua purificada a temperatura ambiente (25 °C). El sistema de reacción se agitó adicionalmente durante 20 h y se filtró a presión reducida. La torta de filtración se lavó con 6,0 l de agua purificada y el sólido se secó al vacío para dar la Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (1).

MS m/z: 419,0 [M+H]⁺

RMN ¹H (CHCl₃-d, 400 MHz): δ = 8,60 (br s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,45 (br s, 1H), 7,42 (br s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,25 (br d, J=2,5 Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 4,81 (br s, 2H), 4,47 (br d, J=5,8 Hz, 1H), 4,27 (br d, J=13,8 Hz, 1H), 4,07-4,13 (m, 4H), 3,85-3,91 (m, 1H), 3,78-3,84 (m, 1H), 3,66 (td, J=11,9, 3,0 Hz, 1H), 3,41 (td, J=12,8, 3,8 Hz, 1H), 2,22 (s, 3H), 1,41 ppm (d, J=6,8 Hz, 3H)

Ejemplo 7: Análisis de estabilidad sólida de la Forma Cristalina A en condiciones de alta temperatura y alta humedad

Dos muestras de la Forma Cristalina A se pesaron en paralelo, cada una de aproximadamente 100 mg, se colocaron en la parte inferior de una botella de vidrio para muestra y se extendieron en una capa delgada. Las muestras se sellaron con papel de aluminio y se perforaron algunos agujeros pequeños en el papel de aluminio para garantizar que la muestra pueda ponerse en contacto completamente con el aire ambiental. Las muestras se colocaron en una caja a temperatura y humedad constantes en la condición de 40 °C/75 % de humedad. Las muestras en las condiciones anteriores se muestrearon y se analizaron el día 30, y los resultados del análisis se compararon con el resultado del análisis inicial del día 0. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5 más abajo:

Tabla 5: Análisis de estabilidad sólida de la Forma Cristalina A

Punto en el tiempo (día)	Apariencia	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Polvo blanco	Forma Cristalina A	99,61	0,39
30	Polvo blanco	Forma Cristalina A	99,59	0,45
Conclusión: La Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (1) tiene buena estabilidad y es fácil para la fabricación de medicinas.				

Ejemplo 8: Análisis de estabilidad física sólida de la Forma Cristalina A en diferentes condiciones de temperatura, humedad y luz

Cuatro muestras de la Forma Cristalina A se pesaron en paralelo, cada una de aproximadamente 100 mg, se colocaron en la parte inferior de una botella de vidrio para muestra y se extendieron en una capa delgada. Las muestras se sellaron con papel de aluminio y se perforaron algunos agujeros pequeños en el papel de aluminio para garantizar que la muestra pueda ponerse en contacto completamente con el aire ambiental. Cuatro muestras preparadas se colocaron a 25 °C/92,5 % de humedad relativa, 60 °C, 40 °C/75 % y condiciones de luz, respectivamente, y se investigó la estabilidad física de las muestras en el 10^{mo} día. Al mismo tiempo, se pesó una muestra de aproximadamente 100 mg de la Forma Cristalina A por separado, se colocó en la parte inferior de la botella de vidrio para muestra, se selló con una tapa de rosca y se almacenó a -20 °C para su uso como control. En el 10^{mo} día, se extrajeron todas las muestras, se pusieron de nuevo a temperatura ambiente y se observaron los cambios de apariencia de las muestras. Se usó

ES 3 013 996 T3

XRPD para detectar las formas cristalinas de la muestra. Al comparar las muestras aceleradas con la muestra de control, se determinó la estabilidad física sólida de la Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (I). La siguiente Tabla 6 mostró los resultados del experimento de estabilidad física sólida de la Forma Cristalina A.

5 Tabla 6 Análisis de estabilidad física sólida de la Forma Cristalina A en diferentes condiciones de temperatura y humedad y bajo luz

Ítem	Punto en el tiempo	-20 °C sellado (control)	25 °C/92,5 % de humedad relativa (abierto)	60 °C (abierto)	40 °C/75 % de humedad relativa (abierto)	luz
Forma Cristalina	Día 10	Forma Cristalina A	Forma Cristalina A	Forma Cristalina A	Forma Cristalina A	Forma Cristalina A
Conclusión: La Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad y es fácil para la fabricación de medicinas.						

15 Ejemplo 9: Análisis de estabilidad física sólida de la Forma Cristalina B en condiciones de alta temperatura, alta humedad y luz

20 Dos muestras de la Forma Cristalina B se pesaron en paralelo para cada grupo, se colocaron en la parte inferior de una botella de vidrio para muestra y se extendieron en una capa delgada. Las muestras se sellaron con papel de aluminio y se perforaron algunos agujeros pequeños en el papel de aluminio para garantizar que la muestra pueda ponerse en contacto completamente con el aire ambiental. Las muestras se colocaron en una caja a temperatura y humedad constantes o a la luz en diferentes condiciones de humedad. Las muestras colocadas en las condiciones anteriores se muestrearon y se analizaron el día 5, día 10, día 30, 1 mes, 3 meses o 6 meses. Los resultados del análisis se compararon con los resultados del análisis inicial del día 0. Los resultados del análisis se muestran en las Tablas 7-11 más abajo:

30 Tabla 7. Análisis de estabilidad sólida a alta temperatura de la Forma Cristalina B a 60 °C

Punto en el tiempo (día)	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Forma Cristalina B	99,0	0,42
5	Forma Cristalina B	101,5	0,43
10	Forma Cristalina B	101,6	0,39
30	Forma Cristalina B	99,4	0,41
Conclusión: La Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad a alta temperatura y es fácil para la fabricación de medicinas.			

35 Tabla 8. Análisis de estabilidad sólida a humedad alta de la Forma Cristalina B a 25 °C/92,5 % de RH

Punto en el tiempo (día)	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Forma Cristalina B	99,0	0,42
5	Forma Cristalina B	98,9	0,44
10	Forma Cristalina B	100,1	0,41
30	Forma Cristalina B	99,7	0,41
Conclusión: La Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad a humedad alta y es fácil para la fabricación de medicinas.			

40 Tabla 9. Análisis de estabilidad sólida a la luz de la Forma Cristalina B

Punto en el tiempo (día)	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Forma Cristalina B	99,0	0,42
5	Forma Cristalina B	101,0	0,44
10	Forma Cristalina B	100,7	0,42
Conclusión: La Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad a la luz.			

45 Tabla 10. Análisis de estabilidad sólida de la Forma Cristalina B a 40 °C/75 % de RH

Punto en el tiempo (día)	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Forma Cristalina B	99,0	0,42
1 mes	Forma Cristalina B	100,6	0,45
2 meses	Forma Cristalina B	100,4	0,42
3 meses	Forma Cristalina B	98,8	0,44
6 meses	Forma Cristalina B	99,8	0,43
Conclusión: La Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad y es fácil para la fabricación de medicinas.			

50 Tabla 11. Análisis de estabilidad sólida de la Forma Cristalina B a 25 °C/65 % de RH

55

ES 3 013 996 T3

Punto en el tiempo (día)	Forma Cristalina	Contenido (%)	Impureza total (%)
0	Forma Cristalina B	99,0	0,42
3 meses	Forma Cristalina B	98,4	0,45
6 meses	Forma Cristalina B	99,8	0,43

5 Conclusión: La Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I) tiene buena estabilidad y es fácil para la fabricación de medicinas.

Ejemplo Experimental 1: Evaluación in vitro

10 Se determinaron los valores de IC₅₀ para evaluar la actividad inhibitoria del compuesto de análisis sobre la cinasa ATR humana.

15 La ATR/ATRIP(h) se incubó en un tampón de ensayo que contiene GST-cMyc-p53 50 nM y Mg/ATP (concentración según se requiera). La reacción se inició mediante la adición de una mezcla de Mg/ATP. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de parada que contiene EDTA para terminar la reacción. Finalmente, se añadieron el tampón de detección que contiene el anticuerpo monoclonal anti-GST marcado con d² y el anticuerpo anti-fosfo Ser15 marcado con europio contra p⁵³. Después, se leyó la placa en modo de fluorescencia resuelta en el tiempo y se realizó una resolución en el tiempo homogénea.

20 La señal de fluorescencia (HTRF) se determinó de acuerdo con la fórmula: HTRF = HTRF = 10 000 × (Em665 nm / Em620 nm).

25 Se usó XLFit versión 5.3 (ID Business Solutions) para analizar los datos de IC₅₀. Se usó el análisis de regresión no lineal para ajustar la curva de respuesta a la dosis en forma de S (pendiente variable). El resultado del análisis se muestra en la Tabla 12:

Tabla 12: Resultado del análisis de cribado in vitro del compuesto presente

Compuesto Núm.	IC ₅₀ promedio de ATR (nM)
Compuesto de la fórmula (1)	29
30 Conclusión: El presente compuesto de la fórmula (I) tiene un buen efecto inhibitorio sobre la cinasa ATR.	

Ejemplo Experimental 2: Análisis de viabilidad celular in vitro

35 El efecto del compuesto sobre la inhibición de la proliferación celular se investigó en este análisis mediante la detección del efecto del compuesto sobre la actividad celular in vitro en líneas celulares tumorales LoVo.

Detección de la viabilidad celular mediante método de luminiscencia CellTiter-Glo

40 Las siguientes etapas se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del Kit de Detección de Viabilidad Celular mediante Luminiscencia CellTiter-Glo de Promega (Promega-G7573).

- (1). El tampón de CellTiter-Glo se fundió y se dejó a temperatura ambiente.
- (2). El sustrato de CellTiter-Glo se dejó a temperatura ambiente.
- 45 (3). Se añadió el tampón de CellTiter-Glo a una botella de sustrato de CellTiter-Glo para disolver el sustrato para preparar la solución de trabajo de CellTiter-Glo
- (4). La agitación mediante vórtex se realizó lentamente para lograr una disolución completa.
- (5). La laca de cultivo celular se extrajo y se colocó durante 30 min para equilibrar a temperatura ambiente.
- (6). Se añadieron 50 µl (volumen medio del medio de cultivo celular en cada pocillo) de la solución de trabajo de CellTiter-Glo a cada pocillo. La placa celular se envolvió con papel de aluminio para protegerla de la luz.
- 50 (7). La placa de cultivo se agitó en un agitador orbital durante 2 min para inducir la lisis celular.
- (8). La placa de cultivo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min para estabilizar la señal de luminiscencia.
- (9). La señal de luminiscencia se detectó en el lector de placas SpectraMax i3x de Molecular Devices.

55 Análisis de datos

Se usó la siguiente fórmula para calcular la tasa de inhibición (IR) del compuesto de análisis: IR (%) = (1 - (RLU compuesto - RLU control de blanco) / (RLU control de vehículo - RLU control de blanco))*100 %.

60 Las tasas de inhibición de diferentes concentraciones de los compuestos se calcularon en Excel, y después se usó el programa GraphPad Prism para trazar la curva de inhibición y calcular los parámetros relevantes, que incluyen la tasa de inhibición mínima, la tasa de inhibición máxima y la IC₅₀.

65 Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 13:

Tabla 13 Resultados del análisis de la inhibición de la proliferación de células LoVo *in vitro*

	Compuesto de la fórmula (1)
IC ₅₀ (µM)	0,51
Conclusión: El presente compuesto de la fórmula (1) TR tiene un buen efecto inhibitorio sobre las células tumorales LoVo con mutación en la vía de señalización de ATM.	

Ejemplo experimental 3: Estudio de las propiedades farmacocinéticas in vivo

Muestras de análisis: Sobre la base de los análisis anteriores, algunos de estos compuestos con alta actividad y estructuras representativas se seleccionaron para análisis adicionales.

Procedimiento experimental: El propósito de este estudio es determinar los parámetros farmacocinéticos del compuesto y calcular su biodisponibilidad por sonda gástrica en ratones Balb/c desnudos hembras.

En este proyecto se usaron seis ratones Balb/c desnudos hembras, tres ratones se inyectaron por vía intravenosa, con la dosis de 1 mg/kg, donde se recogieron muestras de plasma a las 0 h (antes de la administración) y a las 0,0833, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la administración, y a los otros tres ratones se les administró por vía intragástrica con la dosis de 10 mg/kg o 25 mg/kg, donde se recogieron muestras de plasma a las 0 h (antes de la administración) y a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h después de la administración. El análisis de LC-MS/MS se realizó en las muestras recogidas y se recogieron los datos. Los datos de análisis recogidos se calcularon con el programa Phoenix WinNonlin 6.2.1 para determinar los parámetros farmacocinéticos relevantes. Los resultados del análisis se muestran en las Tablas 14.1 y 14.2

14.1 Resultados de la administración por inyección intravenosa

	Compuesto de la fórmula (1) (1 mg/kg IV)
C ₀ (nM)	1955
Cl (ml/min/kg)	34,3
Vd _{ss} (l/kg)	2,21
T _{1/2} (h)	2,57
AUC _{0-t} (nM.h)	1087

14.2 Resultados de la administración intragástrica

	Compuesto de la fórmula (1) (10 mg/kg)
C _{máx} (nM)	6500
T _{1/2} (h)	2,02
AUC _{0-t} (nM.h)	14 983
F (%)	129,0

Nota: C₀ (nM) es la concentración del fármaco en el cuerpo a 0 min; Cl (ml/min/kg) es la velocidad de aclaramiento del fármaco en el cuerpo; Vd_{ss} (l/kg) es el volumen de distribución del fármaco en el cuerpo; T_{1/2} (h) es la semivida; AUC_{0-t} (nM.h) es la cantidad de exposición al fármaco en el cuerpo; C_{máx} (nM) es la concentración más alta del fármaco en el cuerpo; F es la biodisponibilidad.

Conclusión: el presente compuesto de la fórmula (1) tiene buena absorción y exposición en la administración intragástrica y es adecuado para la administración oral.

Ejemplo Experimental 4: Estudio de eficacia in vivo de CDX LoVo de cáncer colorrectal

Propósito: LoVo es una célula tumoral de adenocarcinoma colorrectal con mutación de MRE11A (MRE11A es un componente clave de la vía de señalización de ATM para la reparación de rotura de la doble hebra del ADN), que es sensible al inhibidor de la ATR. Este análisis usa el modelo CDX LoVo de cáncer rectal para verificar el efecto inhibitorio del inhibidor de ATR en un tumor con la vía de señalización de ATM defectuosa.

Procedimiento experimental:

1. Animales experimentales

Especie: Ratón

Cepa: Ratones BALB/c desnudos

Proveedor: Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

Edad y peso semanales: 6-8 semanas de edad, 18-22 g

Género: femenino

2. Cultivo de células

Células de cáncer de colon humano LoVo (ECACC, catálogo: 87060101), cultivo *in vitro* en monocapa, las condiciones de cultivo fueron medio F-12 de Ham con suero bovino fetal al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y glutamina 2 mM, a 37 °C, 5 % de CO₂.

5 Se usó pancreatina-EDTA para la digestión y el pase de rutina dos veces a la semana. Cuando la saturación celular fue del 80 %-90 %, las células se recogieron, se contaron y se sembraron. Se inocularon 0,1 ml (10×10^6) de células LoVo por vía subcutánea en el lomo derecho de cada ratón desnudo, y la administración grupal se inició cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 173 mm³.

10 3. Preparación de la sustancia de análisis y dosificación

Se pesaron 25,51 mg del compuesto de la fórmula (1) y se disolvieron en 0,500 ml de DMSO. Se añadieron 2,000 ml de propilenglicol y 2,500 ml de agua desionizada, que se agitaron con vórtex y se mezclaron bien y se ajustaron a pH=6,0 para dar una solución transparente.

15 Dosificación: Se administraron 25 mg/kg de todos los compuestos de análisis mediante sonda gástrica dos veces al día, con un intervalo de 8 h dentro de un día.

20 4. Medición del tumor e indicadores experimentales

El diámetro tumoral se midió con un calibrador vernier dos veces a la semana. La fórmula de cálculo para el volumen tumoral: $V = 0,5a \times b^2$, donde a y b representan el diámetro tumoral largo y el diámetro tumoral corto, respectivamente.

25 La eficacia antitumoral del compuesto se evaluó mediante la TGI (%) o la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%).

30 Tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%) = $\text{TRTV} / \text{CRTV} \times 100 \%$ (TRTV: RTV promedio del grupo de tratamiento; CRTV: RTV promedio del grupo de control negativo). De acuerdo con los resultados de la medición del tumor, se calculó el volumen tumoral relativo (RTV), y la fórmula de cálculo fue $\text{RTV} = V_t / V_0$, donde V_0 es el volumen tumoral medido en el momento de la administración del grupo (es decir, D0), V_t es el volumen tumoral en una medición determinada, y TRTV y CRTV usan los datos del mismo día.

35 TGI (%) representa la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. $\text{TGI} (\%) = [1 - (\text{volumen tumoral promedio al final de un grupo de tratamiento determinado} - \text{volumen tumoral promedio al comienzo del grupo de tratamiento}) / (\text{volumen tumoral promedio al final del tratamiento en el grupo de control de solvente} - \text{volumen tumoral promedio al comienzo del tratamiento en el grupo de control de solvente})] \times 100 \%$.

40 Después de terminar el experimento, se detectó el peso del tumor y se calculó el porcentaje de peso de T/C, donde el peso de T y el peso de C representan el peso del tumor del grupo de administración y del grupo de control de vehículo, respectivamente.

45 5. Resultados del análisis

La eficacia del compuesto en el modelo de tumor de xenoinjerto de cáncer colorrectal humano se evaluó en este análisis, con el grupo de control de solvente como referencia. En el día 17 de la administración, el grupo del compuesto de la fórmula (1) (25 mg/kg) tuvo T/C y TGI de 27,8 % y 90,7 %, respectivamente, en comparación con el grupo de control de vehículo

50 6. Conclusión

En este experimento, el presente compuesto de la fórmula (1) muestra un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ratones con xenoinjertos subcutáneos de células LoVo de cáncer colorrectal humano.

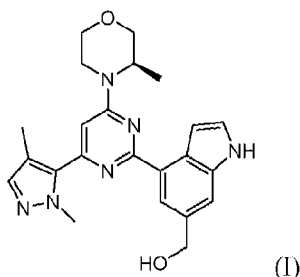
55

60

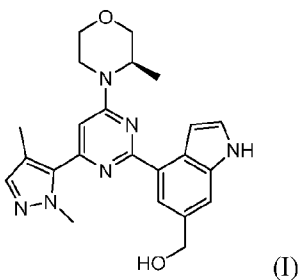
65

REIVINDICACIONES

1. Una Forma Cristalina A del compuesto de la fórmula (I), en donde la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,10 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$ a radiación Cu α



2. La Forma Cristalina A de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46 \pm 0,20^\circ$, $8,10 \pm 0,20^\circ$, $13,03 \pm 0,20^\circ$, $15,07 \pm 0,20^\circ$, $15,58 \pm 0,20^\circ$, $16,19 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.
3. La Forma Cristalina A de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46 \pm 0,20^\circ$, $8,10 \pm 0,20^\circ$, $13,03 \pm 0,20^\circ$, $13,46 \pm 0,20^\circ$, $15,07 \pm 0,20^\circ$, $15,58 \pm 0,20^\circ$, $16,19 \pm 0,20^\circ$, $18,33 \pm 0,20^\circ$, $21,17 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.
4. La Forma Cristalina A de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la Forma Cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $7,46^\circ$, $8,10^\circ$, $11,24^\circ$, $13,03^\circ$, $13,46^\circ$, $15,07^\circ$, $15,58^\circ$, $15,98^\circ$, $16,19^\circ$, $17,70^\circ$, $18,33^\circ$, $19,60^\circ$, $21,17^\circ$, $22,63^\circ$, $23,84^\circ$, $25,56^\circ$ y $26,57^\circ$.
5. Una Forma Cristalina B del compuesto de la fórmula (I), en donde, la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$ y $20,56 \pm 0,20^\circ$ a radiación Cu α



6. La Forma Cristalina B de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$, $14,83 \pm 0,20^\circ$, $15,54 \pm 0,20^\circ$, $17,33 \pm 0,20^\circ$, $20,56 \pm 0,20^\circ$, $22,00 \pm 0,20^\circ$ y $22,63 \pm 0,20^\circ$.
7. La Forma Cristalina B de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45 \pm 0,20^\circ$, $10,87 \pm 0,20^\circ$, $14,83 \pm 0,20^\circ$, $15,54 \pm 0,20^\circ$, $17,33 \pm 0,20^\circ$, $20,08 \pm 0,20^\circ$, $20,56 \pm 0,20^\circ$, $22,00 \pm 0,20^\circ$, $22,63 \pm 0,20^\circ$ y $25,26 \pm 0,20^\circ$.
8. La Forma Cristalina B de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la Forma Cristalina B tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene valores máximos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,45^\circ$, $9,20^\circ$, $10,87^\circ$, $12,57^\circ$, $14,14^\circ$, $14,53^\circ$, $14,83^\circ$, $15,54^\circ$, $16,80^\circ$, $17,33^\circ$, $18,43^\circ$, $19,84^\circ$, $20,08^\circ$, $20,56^\circ$, $21,39^\circ$, $22,00^\circ$, $22,44^\circ$, $22,63^\circ$, $23,26^\circ$, $25,26^\circ$, $25,85^\circ$ y $26,98^\circ$.
9. La Forma Cristalina B de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la Forma Cristalina B tiene una curva de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) que tiene un punto de inicio de valor máximo endotérmico en $174,3 \pm 3^\circ\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

10. La Forma Cristalina B de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la Forma Cristalina B tiene una curva de Análisis Termogravimétrico (TGA), en donde la pérdida de peso a 150 °C ± 3 °C es de 1,49 % a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.
- 5 11. Un proceso para preparar una Forma Cristalina A de un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
- 10 1) añadir el compuesto de la fórmula (I) a solvente de etanol;
2) añadir agua;
3) agitar durante 100-120 h;
4) realizar la recristalización a temperatura ambiente para obtener la Forma Cristalina A.
12. Un proceso para preparar una Forma Cristalina B de un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que comprende:
- 15 1) añadir el compuesto de la fórmula (I) a un solvente;
2) calentar a una temperatura con agitación durante 2,5-120 h;
3) realizar la recristalización a temperatura ambiente para obtener la Forma Cristalina B.
- 20 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde
- 25 (i) el solvente es metanol, éter metil terciario butílico, metanol/agua (V/V, 1:0,3-1), acetona/agua (V/V, 1:1), isopropanol/agua (V/V, 1:1), acetato de etilo/n-heptano (V/V, 1:1), acetato de isopropilo/n-heptano (V/V, 1:1), etanol/n-heptano (V/V, 1:1), acetonitrilo/n-heptano (V/V, 1:1), isopropanol/n-heptano (V/V, 1:1) o diclorometano/n-heptano (V/V, 1:1);
(ii) la temperatura es de 25-70 °C; y/o
(iii) el intervalo de concentración del compuesto de la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en 25 mg/ml-50 mg/ml.
- 30 14. La Forma Cristalina A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la Forma Cristalina B de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada a la ATR, en donde la enfermedad es un tumor sólido o un tumor sanguíneo.
- 35 15. La Forma Cristalina A o la Forma Cristalina B para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad es cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer esofágico, carcinoma peritoneal primario, carcinoma corticosuprarrenal, carcinoma de células claras renales, cáncer de próstata, carcinoma urotelial de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinoma endometrial, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

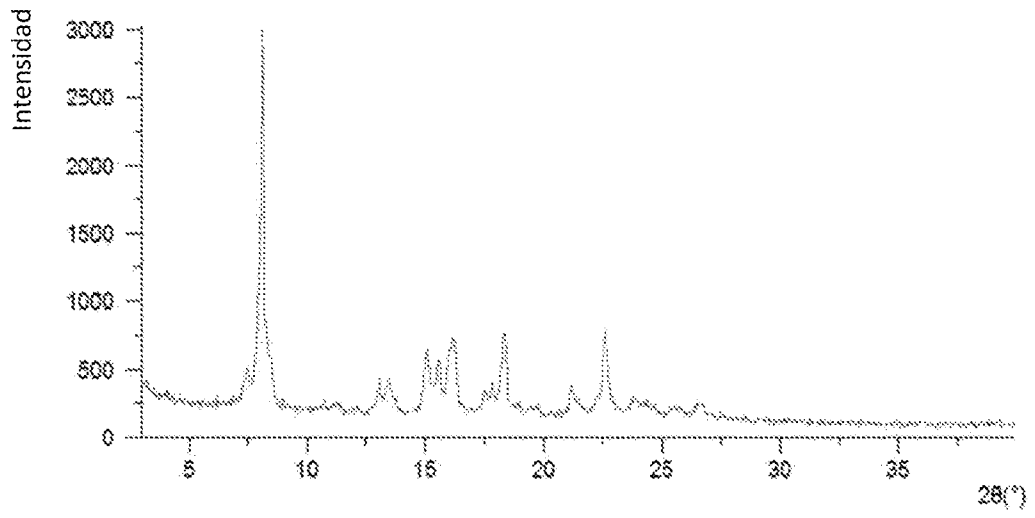


Figura 1

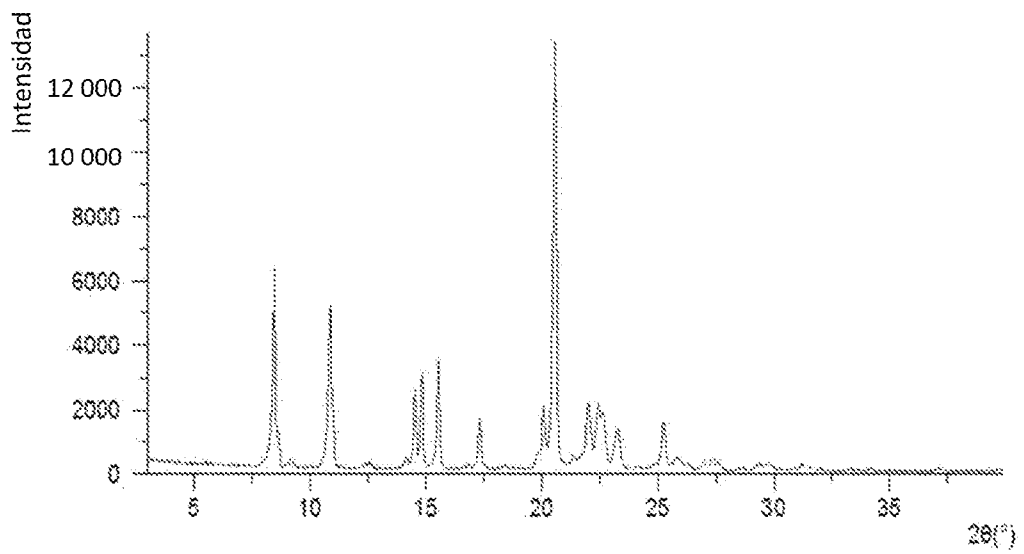


Figura 2

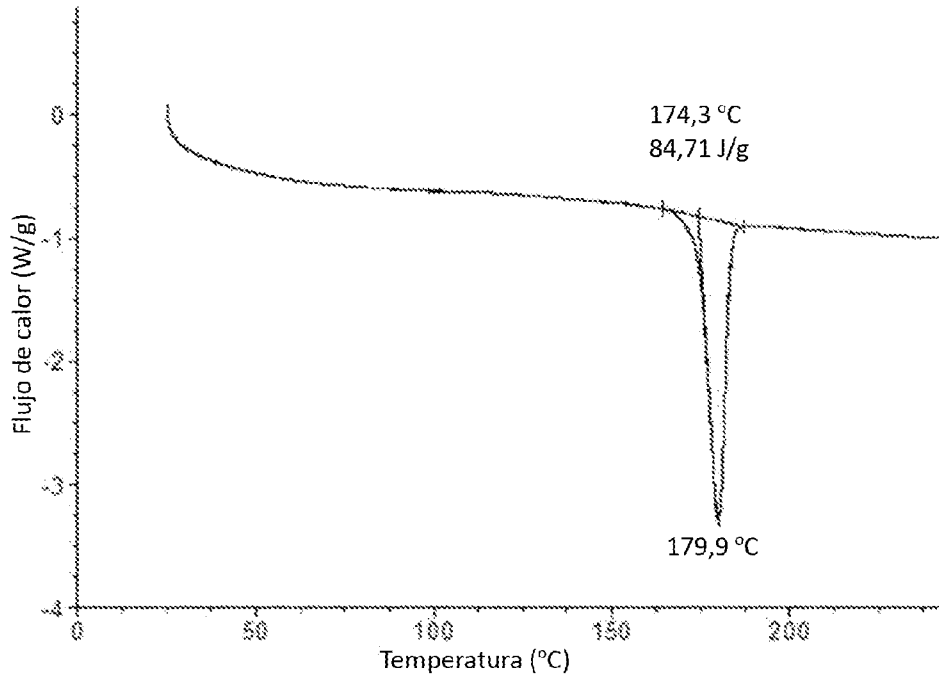


Figura 3

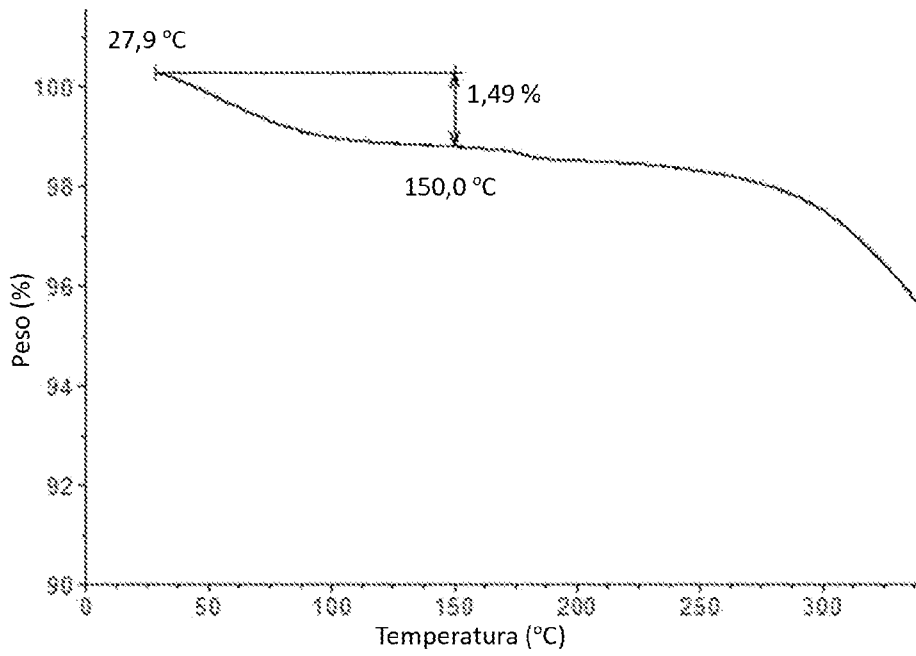


Figura 4