

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 981 584**

⑮ Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 213/74 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 17152400 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3210980**

⑭ Título: **Proceso para la fabricación de 5-[[4-[[Morfolin-2-il]metilamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo**

⑯ Prioridad:

15.05.2012 US 201261647200 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.10.2024

⑯ Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD (100.0%)
Angel Building, 407 St John Street
London, Greater London EC1V 4AD, GB**

⑯ Inventor/es:

**COLLINS, IAN;
MATTHEWS, THOMAS PETER;
FARIA DA FONSECA MCHARDY, TATIANA;
OSBORNE, JAMES;
LAINCHBURY, MICHAEL;
WALTON, MICHAEL IAN y
GARRETT, MICHELLE DAWN**

⑯ Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 981 584 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

Proceso para la fabricación de 5-[[4-[[Morfolin-2-il]metilamino]5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere generalmente al campo de compuestos terapéuticos y a compuestos de 5-[[4-[[Morfolin-2-il]metilamino]5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo (citados en el presente documento como "compuestos TFM") que, entre otras cosas, inhiben la función de cinasa de la cinasa de punto de control 1 (CHK1).

Antecedentes

- 10 En el presente documento se citan varias publicaciones para describir y divulgar más completamente la invención y el estado de la técnica al que pertenece la invención.

A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros indicados o etapas, 15 pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros.

Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "uno, una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos y similares.

- 20 Los rangos a menudo se expresan aquí como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho rango, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización.

- 25 La presente divulgación incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. No se admite que cualquier información proporcionada en el presente documento es técnica anterior relevante para la presente invención reivindicada o que cualquier publicación citada específica o implícitamente sea técnica anterior.

Cinasa de punto de control 1(CHK1)

- 30 El progreso a lo largo del ciclo de división celular es un proceso estrechamente regulado y se controla en varias posiciones conocidas como puntos de control del ciclo celular (véase, por ejemplo, Weinert y Hartwell, 1989; Bartek y Lukas, 2003). Estos puntos de control se encuentran en todas las cuatro etapas del ciclo celular; G1, S (replicación de ADN), G2 y M (Mitosis) y aseguran que los sucesos clave que controlan la fidelidad de replicación de ADN y división celular se completen de manera correcta. Los puntos de control del ciclo celular 35 se activan por varios estímulos, incluyendo daño en ADN y errores en ADN causados por una replicación defectuosa. Cuando esto se produce, se detendrá el ciclo celular, dando tiempo para que se repare el ADN o, si el daño es demasiado grave, para que se activen procesos celulares que conducen a la muerte celular controlada.

- 40 Todos los cánceres, por definición, tienen alguna forma aberrante de ciclo de división celular. Con frecuencia, las células cancerosas poseen uno o más puntos de control del ciclo celular defectuosos o portan defectos en una ruta de reparación del ADN concreta. Estas células son por tanto a menudo más dependientes de los restantes puntos de control del ciclo celular y rutas de reparación, en comparación con células no cancerosas (donde todos los puntos de control y rutas de reparación de ADN están intactas). La respuesta de las células cancerosas al daño en el ADN es con frecuencia un determinante de si continúan proliferando o activan procesos de muerte celular y mueren. Por ejemplo, las células tumorales que contienen una forma (o formas) mutante(s) del supresor tumoral p53 son defectuosas para el punto de control de daño en el ADN de G1. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de los puntos de control de la fase G2 o S impidan adicionalmente la capacidad de la célula tumoral para reparar el ADN dañado.

- 45 Muchos tratamientos para el cáncer conocidos causan daño en el ADN mediante la modificación física del ADN de la célula o interrumriendo procesos celulares vitales que puedan afectar a la fidelidad de replicación de ADN y a la división celular, tales como el metabolismo del ADN, la síntesis de ADN, la transcripción de ADN y la formación del huso de microtúbulos. Dichos tratamientos incluyen, por ejemplo, radioterapia, que produce roturas en la hebra de ADN y una serie de agentes quimioterapéuticos, incluyendo inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, agentes alquilantes de ADN y fármacos citotóxicos que contienen platino. Una limitación significativa de estos tratamientos genotóxicos es la resistencia a fármacos. Uno de los mecanismos

más importantes que conducen a esta resistencia se atribuye a la activación de puntos de control del ciclo celular, que dan tiempo al tumor para reparar ADN dañado. Al suprimir un punto de control del ciclo celular concreto o al inhibir una forma concreta de reparación del ADN, puede ser posible esquivar la resistencia de las células tumorales a los agentes genotóxicos y aumentar la muerte de células tumorales inducida por daño en el ADN, de este modo aumentando el índice terapéutico de estos tratamientos para el cáncer.

5 CHK1 es una serina/treonina cinasa involucrada en la regulación de las señales de punto de control del ciclo celular que se activa en respuesta a daño en el ADN y a errores en el ADN causados por una replicación defectuosa (véase, por ejemplo, Bartek y Lukas, 2003). CHK1 transduce estas señales mediante la fosforilación de sustancias involucradas en un número de actividades celulares, incluyendo la detención del ciclo celular y reparación del ADN. Dos sustratos clave de CHK1 son las fosfatases Cdc25A y Cdc25C que desfosforilan a CDK1 causando su activación, que es necesaria para salir de G2 a mitosis (fase M) (véase, por ejemplo, Sanchez *et al.*, 1997). La fosforilación de Cdc25C y la relacionada Cdc25A por CHK1 bloquea su capacidad para activar a CDK1, evitando de este modo que la célula salga de G2 a la fase M. El papel de CHK1 en el punto de control del ciclo celular de G2 inducido por daño en el ADN se ha demostrado en un número de estudios donde se ha inactivado génicamente la función de CHK1 (véase, por ejemplo, Liu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Zachos *et al.*, 2003).

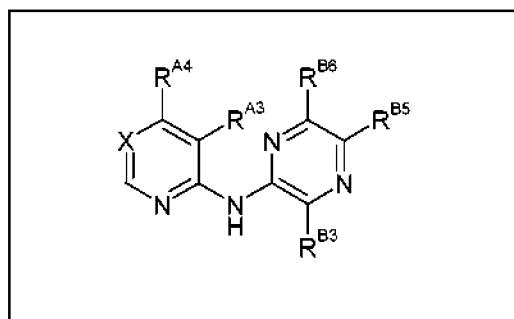
10 La dependencia del punto de control de G2 inducido por daño en el ADN de CHK1 proporciona un ejemplo de una estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer, que incluye la inhibición dirigida de CHK1. Tras el daño en el ADN, la proteína supresora tumoral p53 se establece y activa para dar una detención de G1 dependiente de p53, que conduce a apoptosis o a reparación del ADN (Balant y Vousden, 2001). Más de la mitad de los cánceres son funcionalmente defectuosos para p53, que los puede hacer resistentes a tratamientos genotóxicos para el cáncer, tales como radiaciones ionizantes (RI) y determinadas formas de quimioterapia (véase, por ejemplo, Greenblatt *et al.*, 1994; Carson y Lois, 1995). Estas células defectuosas para p53 no pueden detenerse en el punto de control de G1 o sufrir apoptosis o reparar el ADN y por consiguiente pueden ser más dependientes del punto de control de viabilidad y fidelidad de replicación de G2. Por lo tanto, la supresión del punto de control de G2 mediante la inhibición de la función de cinasa de CHK1 puede sensibilizar de manera selectiva a las células cancerosas deficientes para p53 a terapias genotóxicas para el cáncer, y esto se ha demostrado (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 1996; Dixon y Norbury, 2002).

15 Además, también se ha demostrado que CHK1 está involucrada en los puntos de control del ciclo celular de la fase S y en la reparación de ADN mediante recombinación de homólogos. De este modo, la inhibición de CHK1 cinasa en aquellos cánceres dependientes de estos procesos después del daño en el ADN, puede proporcionar estrategias terapéuticas adicionales para el tratamiento de cánceres usando inhibidores de CHK1 (véase, por ejemplo, Sorensen *et al.*, 2005). Además, determinados cánceres pueden mostrar estrés replicativo debido a los altos niveles de daño en el ADN endógeno (véase, por ejemplo, Cavalier *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2012) o 20 a través de una elevada replicación impulsada por oncogenes, por ejemplo, genes MYC amplificados o sobreexpresados (véase, por ejemplo, Di Micco *et al.* 2006; Cole *et al.*, 2011; Murga *et al.* 2011). Dichos cánceres pueden mostrar una señalización elevada a través de CHK1 cinasa (véase, por ejemplo, Höglund *et al.*, 2011). La inhibición de CHK1 cinasa en aquellos cánceres dependientes de estos procesos, puede 25 proporcionar estrategias terapéuticas adicionales para el tratamiento de cánceres usando inhibidores de CHK1 (véase, por ejemplo, Cole *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2011; Ferrao *et al.*, 2011).

30 Datos recientes usando ARNpi selectivo para CHK1 apoyan la inhibición selectiva de CHK1 como una estrategia terapéutica relevante y sugieren que la inhibición combinada con otras cinasas de punto de control determinadas no proporciona un beneficio adicional y puede ser improductivo (véase, por ejemplo, Xiao *et al.*, 2006; Guzi *et al.*, 2011). Se han descrito inhibidores selectivos de molécula pequeña de la función de cinasa de CHK1 a partir de varias clases de químicos (véase, por ejemplo, Tao *et al.*, 2006).

Compuestos conocidos

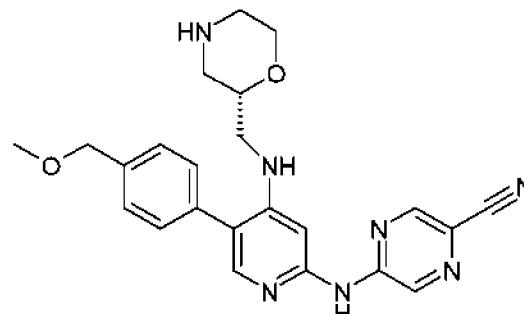
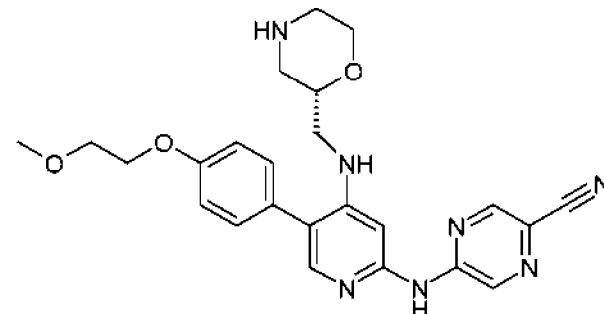
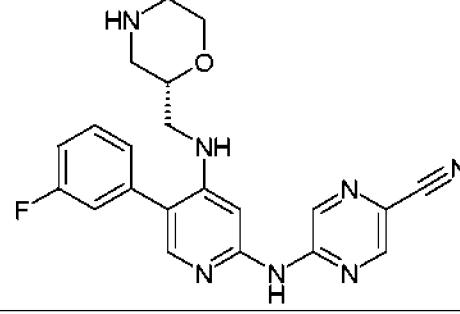
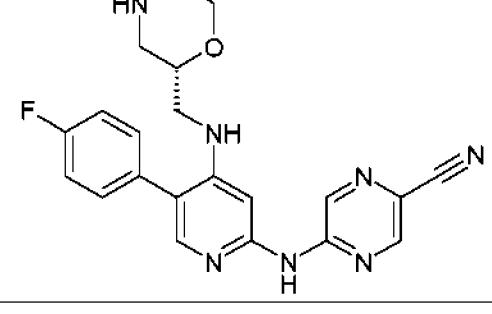
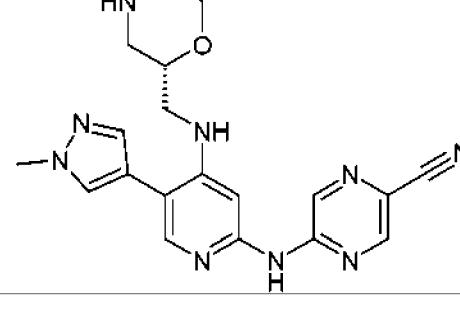
35 En Collins *et al.*, 2009a (WO 2009/044162 A1) se describen determinados compuestos de la siguiente fórmula que inhiben la función cinasa de la cinasa de punto de control 1 (CHK1), y que son útiles en el tratamiento de, por ejemplo, cáncer:



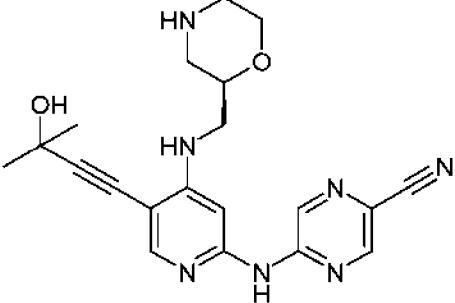
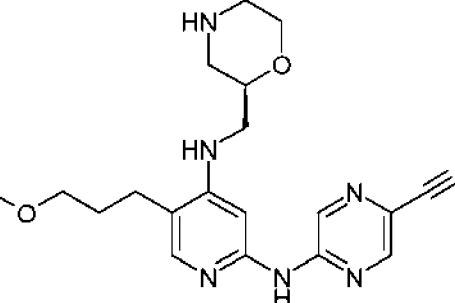
Entre los ejemplos de Collins *et al.*, 2009a están los siguientes compuestos:

Tabla 1

n.º	N.º de registro	Código	Estructura química
1	1137477-07-6	Y-081	
2	1137477-35-0	Y-102	
3	1168103-91-0	Y-146	
4	1137478-38-6	Y-147	

5	1137478-39-7	Y-148	
6	1137478-40-0	Y-149	
7	1137478-41-1	Y-150	
8	1137478-44-4	Y-151	
9	1137478-45-5	Y-152	

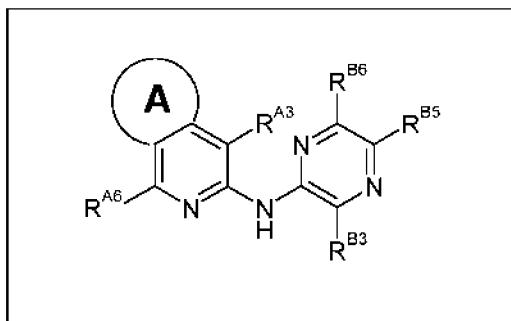
10	1137478-46-6	Y-153	
11	1137478-47-7	Y-154	
12	1137478-48-8	Y-155	
13	1137478-50-2	Y-156	
14	1137478-51-3	Y-157	

15	1137478-52-4	Y-158	
16	1137478-54-6	Y-159	

En el género definido en Collins *et al.*, 2009a, X puede ser $-CR^{A5}-$ (véase, por ejemplo, la página 8, línea 27 del mismo) y $-R^{A5}$ puede ser $-Q^{A5}$ (véase, por ejemplo, la página 9, línea 1 del mismo). El grupo $-Q^{A5}$ está ampliamente definido (véase, por ejemplo, la página 31, línea 27 a la página 38, línea 13 del mismo) y puede ser, por ejemplo, $-CF_3$ (véase, por ejemplo, la página 31, línea 32 y la página 33, línea 21).

Sin embargo, ninguno de los ejemplos de Collins *et al.*, 2009a tiene X como $-CR^{A5}-$ con $-R^{A5}$ como $-CF_3$.

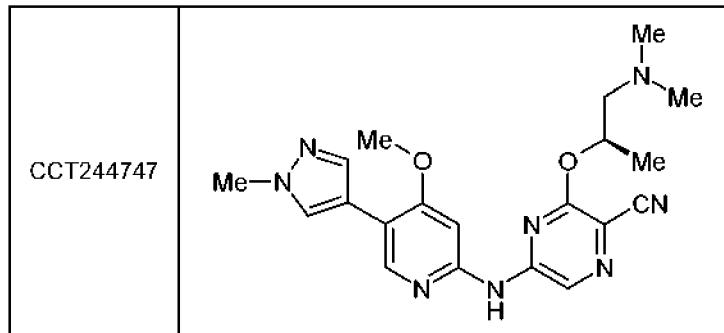
En Collins *et al.*, 2009b, se describen determinados compuestos de la siguiente fórmula que inhiben la función de cinasa de la cinasa de punto de control 1 (CHK1) y que son útiles en el tratamiento de, por ejemplo, cáncer:



- 10 Walton *et al.*, 2010, describe estudios preclínicos del inhibidor de CHK1 denominado SAR-020106.
- Almeida *et al.*, 2008, describe determinadas pirazinas sustituidas por aminopirazolilo que supuestamente son útiles en el tratamiento del cáncer.
- Ioannidis *et al.*, 2009, describe determinados compuestos que inhiben la cinasa asociada con Janus (JAK). Véase, por ejemplo, el esquema 5 de la página 6526 del mismo.
- 15 Lin *et al.*, 2005, describe determinados compuestos macrocíclicos de urea que supuestamente son útiles como inhibidores de proteína cinasa. Véase, por ejemplo, el párrafo [0004] de la página 1 del mismo.
- Tao *et al.*, 2005, describe determinados compuestos macrocíclicos de urea que supuestamente son útiles como inhibidores de proteína cinasa. Véase, por ejemplo, la página 2 del mismo.
- Li *et al.*, 2007, describe la preparación y ensayo de determinados inhibidores de CHK1 de urea macrocíclica.
- 20 Véase, por ejemplo, la tabla 1 de la página 6502 del mismo.
- Tao *et al.*, 2007a, describe la preparación y ensayo de determinados inhibidores de CHK1 de urea macrocíclica. Véase, por ejemplo, la tabla 2 de la página 6596 del mismo.

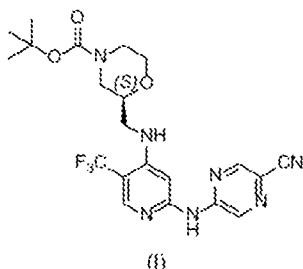
Tao *et al.*, 2007b, describe la preparación y ensayo de determinados inhibidores de CHK1 de urea macrocíclica. Véase, por ejemplo, la tabla 3 de la página 1517 del mismo.

Uno o más inventores han contribuido en las publicaciones recientes en las que se describen varios inhibidores de CHK1, incluyendo el siguiente compuesto, denominado CCT244747. Véase, Lainchbury *et al.*, 2012 (aparentemente publicado online el 19 de octubre de 2012) y Walton *et al.*, 2012 (aparentemente publicado el 15 de octubre de 2012).



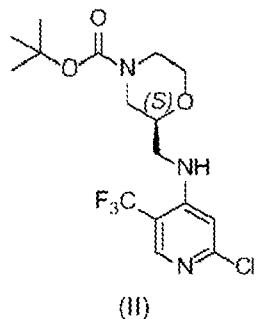
Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención es un proceso para la fabricación de un compuesto de fórmula (I):

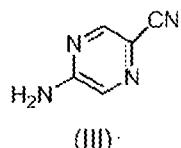


10

de un compuesto de fórmula (II):



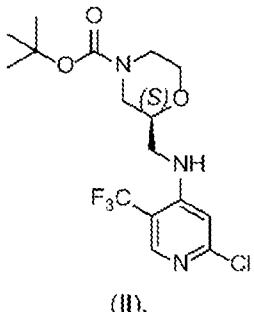
y un compuesto de fórmula (III):



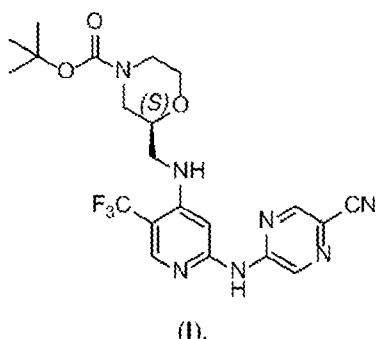
15 en el que el proceso comprende:

- (i) suspender el compuesto de fórmula (II); el compuesto de fórmula (III); rac-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo; carbonato de cesio; y tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0); en dioxano anhídrido bajo argón;
- (ii) hacer burbujeante argón a través de la suspensión durante 30 minutos; y
- (iii) calentar la suspensión hasta 100°C durante 29 horas.

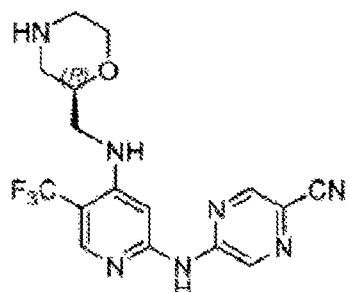
Un segundo aspecto de la invención es un compuesto de fórmula (II), o una sal, hidrato o solvato del mismo:



[0029] Un tercer aspecto de la invención es un compuesto de fórmula (I), o una sal, hidrato o solvato del mismo:



- 5 [0030] Un cuarto aspecto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (II) o un compuesto de fórmula (I) como intermedio en un método de síntesis de un compuesto TFM de la siguiente fórmula, o una sal, hidrato o solvato del mismo:



Descripción

- 10 Se describen en el presente documento compuestos de 5-[[4-[[Morfolin-2-il]metilamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo (citados en el presente documento como "compuestos TFM").

También se describe en el presente documento a una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 15 También se describe en el presente documento un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende la etapa de mezclar un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 20 También se describe en el presente documento un método para inhibir la función de la quinasa CHK1 en una célula, *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento.

También se describe en el presente documento un método para regular (por ejemplo, inhibir) la proliferación celular (por ejemplo, la proliferación de una célula), inhibir la progresión del ciclo celular, promover la apoptosis celular, o una combinación de uno o más de estos, *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de un compuesto de TFM, como se describe en el presente documento.

- 25 También se describe en el presente documento un método de tratamiento que comprende administrar a un

sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de TFM, como se describe en el presente documento, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica.

También se describe en el presente documento un compuesto TFM como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

5 También se describe en el presente documento el uso de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en tratamiento.

También se describe en el presente documento un kit que comprende (a) un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, preferentemente proporcionado en forma de una composición farmacéutica y en un contenedor adecuado y/o con un empaquetado adecuado; y (b) instrucciones para su uso, por ejemplo, 10 instrucciones escritas de cómo administrar el compuesto.

También se describe en el presente documento un compuesto TFM que puede obtenerse mediante un método de síntesis como se describe en el presente documento o un método que comprende un método de síntesis como se describe en el presente documento.

15 También se describe en el presente documento un compuesto TFM obtenido mediante un método de síntesis como se describe en el presente documento o un método que comprende un método de síntesis como se describe en el presente documento.

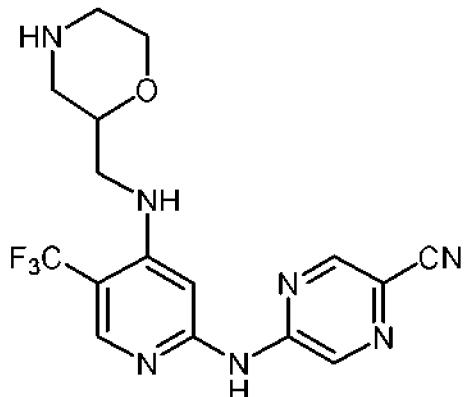
También se describen en el presente documento nuevos intermedios, como se describen en el presente documento, que son adecuados para su uso en los métodos de síntesis descritos en el presente documento.

20 También se describe en el presente documento el uso de dichos nuevos intermedios, como se describen en el presente documento, en los métodos de síntesis descritos en el presente documento.

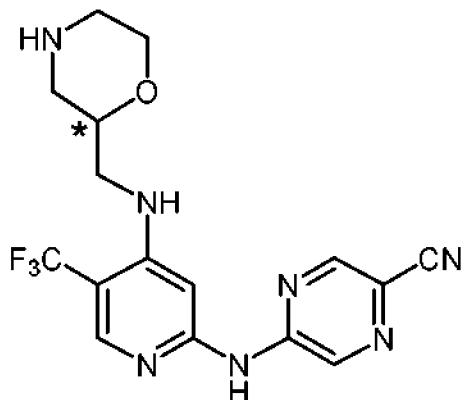
Descripción detallada

Compuestos

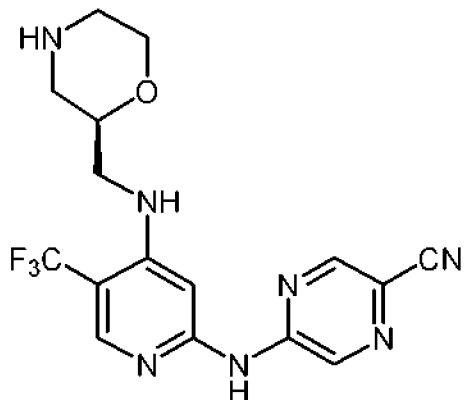
También se describen en el presente documento compuestos de la siguiente fórmula y a sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma (por conveniencia, denominados colectivamente en el 25 presente documento "compuestos de 5-[[4-[[morfolin-2-il]metilamino]5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo" o "compuestos TFM"):



El punto de unión del grupo morfolinilo es un centro quiral (marcado con un asterisco en la fórmula siguiente) que puede estar independientemente en la configuración (R) o (S). A menos que se indique de otro modo, se 30 pretende abarcar ambas configuraciones.

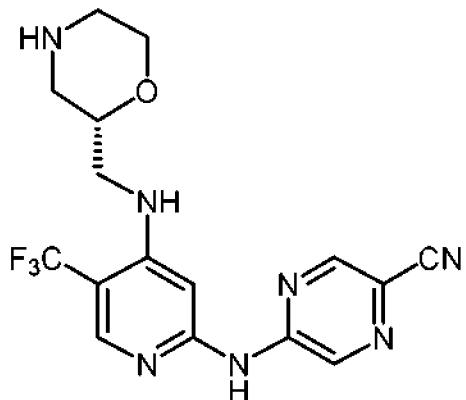


En una realización, el compuesto es un compuesto de la siguiente fórmula o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma:



- 5 El compuesto anterior se conoce también como 5-[[4-[(2R)-morfolin-2-yl]methylamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo. Los métodos e intermedios actualmente reivindicados son útiles en la síntesis de este compuesto.

Un compuesto alternativo es un compuesto de la siguiente fórmula o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma:



10

El compuesto anterior se conoce también como 5-[[4-[(2S)-morfolin-2-yl]methylamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo.

Formas sustancialmente purificadas

También se describen en el presente documento compuestos TFM, en forma purificada.

- 15 En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente purificada y/o en una forma sustancialmente libre de contaminantes.

En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente purificada con una pureza de al menos

un 50 % en peso, por ejemplo, al menos un 60 % en peso, por ejemplo, al menos un 70% en peso, por ejemplo, al menos un 80% en peso, por ejemplo, al menos un 90% en peso, por ejemplo, al menos un 95% en peso, por ejemplo, al menos un 97% en peso, por ejemplo, al menos un 98% en peso, por ejemplo, al menos un 99 % en peso.

- 5 A menos que se especifique, la forma sustancialmente purificada se refiere al compuesto en cualquier forma estereoisomérica o enantiomérica. Por ejemplo, en una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a una mezcla de enantiómeros, es decir, purificada con respecto a otros compuestos. En una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a una mezcla equimolar de enantiómeros (es decir, una mezcla racémica, un racemato). En una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a un enantiómero, 10 por ejemplo, un enantiómero ópticamente puro.

En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente libre de contaminantes en la que los contaminantes representan no más de un 50 % en peso, por ejemplo, no más de un 40 % en peso, por ejemplo, no más de un 30% en peso, por ejemplo, no más de un 20% en peso, por ejemplo, no más de un 10% en peso, por ejemplo, no más de un 5% en peso, por ejemplo, no más de un 3% en peso, por ejemplo, no más de un 2% en peso, por ejemplo, no más de un 1 % en peso. 15

A menos que se especifique, los contaminantes se refieren a otros compuestos, es decir, distintos de enantiómeros. En una realización, los contaminantes se refieren a otros compuestos y al otro enantiómero.

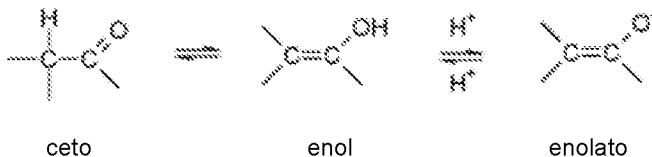
En una realización, el compuesto está en una forma sustancialmente purificada con una pureza óptica de al 20 menos el 60 % (es decir, el 60 % del compuesto, en una base molar, es el enantiómero deseado y el 40 % es un enantiómero no deseado), por ejemplo, al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, por ejemplo, al menos el 97 %, por ejemplo, al menos el 98 %, por ejemplo, al menos el 99 %.

Isómeros

Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, 25 diasetereoméricas, epiméricas, atrópicas, esterioisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas particulares, incluyendo pero sin limitación, formas *cis* y *trans*; formas *E* y *Z*; formas *c*, *t* y *r*; formas *endo* y *exo*; formas *R*, *S* y *meso*; formas *D* y *L*; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas *sin* y *anti*; formas sinclinales y antoclinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, silla, torcida, envoltura y media silla; y combinaciones de las mismas, denominadas colectivamente en lo sucesivo en el 30 presente documento como "isómeros" (o "formas isoméricas").

Obsérvese que, salvo por lo analizado a continuación para las formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros", tal como se usa en el presente documento, los isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, los isómeros que se diferencian por las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en el espacio).

35 La exclusión anterior no se refiere a las formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hidroxiazo y nitro/aci-nitro.



40 Obsérvese que están específicamente incluidos en el término "isómeros" los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

45 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluye todas esas formas isoméricas, incluyendo mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas) de las mismas.

Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccional y medios cromatográficos) de dichas formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento u otros métodos conocidos, de una

manera conocida.

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se analizan en Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, págs. 1-19.

5 Por ejemplo, si un compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser $-COO^-$), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metales alcalinos tales como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{3+} . Los ejemplos de cationes orgánicos

10 adecuados incluyen, pero sin limitación, ion amonio (es decir, NH_4^+) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son los derivados de: etilamina, dietilamina, diciclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario es $N(CH_3)_4^+$.

15 Si un compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, $-NH_2$ puede ser $-NH_3^+$), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

20 Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los derivados de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mágico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados de los 25 siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye las formas de sal del mismo.

Hidratos y solvatos

30 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente de un compuesto. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto, sal de compuesto) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente hidrato, por ejemplo, un hemihidrato, un monohidrato, un sesquihidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

35 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto en particular también incluye las formas de hidrato y solvato del mismo.

Formas químicamente protegidas

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un compuesto en una forma químicamente protegida. La expresión "forma químicamente protegida" se usa en el presente documento en el sentido químico convencional y se refiere a un compuesto en el que uno o más grupos funcionales reactivos están protegidos de reacciones químicas indeseables en condiciones específicas (por ejemplo, pH, temperatura, radiación, disolvente y similares). En la práctica, se emplean métodos químicos bien conocidos para hacer que un grupo funcional sea no reactivo de forma reversible, que de otra forma sería reactivo, en condiciones específicas. En una forma químicamente protegida, uno o más grupos funcionales reactivos están en forma de un grupo protegido o protector (también conocido como un grupo enmascarado o un grupo bloqueado o de bloqueo). Protegiendo un grupo funcional reactivo, pueden realizarse reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar al grupo protegido; el grupo protector puede retirarse, normalmente en una etapa posterior, sin afectar de manera sustancial al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Greene y P. Wuts; 4^a edición; John Wiley and Sons, 2006).

50 Una amplia variedad de dichos métodos "de protección", "de bloqueo" o "de enmascaramiento" son ampliamente utilizados y bien conocidos en la síntesis orgánica. Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, ambos de los cuales podrían ser reactivos en condiciones específicas, pueden derivatizarse para proporcionar uno de los grupos funcionales "protegidos", y por lo tanto no reactivo, en las condiciones específicas; así protegido, el compuesto puede usarse como reactivo que tiene solamente un grupo funcional reactivo eficaz. Después de que se complete la reacción deseada (que implica al otro grupo funcional), el grupo protegido puede "desprotegerse" para devolverlo a su funcionalidad original.

- Por ejemplo, un grupo amina puede protegerse, por ejemplo, en forma de una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo, como: una metil amida (-NHCO-CH₃); una benciloxi amida (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz); como una *t*-butoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), como una 9-fluorenilmetoxi amida (-NH-Fmoc), como una 6-nitroveratriloxy amida (-NH-Nvoc), como una 2-trimetilsililetiloxi amida (-NH-Teoc), como una 2,2,2-tricloroetiloxy amida (-NH-Troc), como una aliloxi amida (-NH-Alloc), como una 2-(fenilsulfonil)etiloxy amida (-NH-Psec); o, en casos adecuados (por ejemplo, aminas cílicas), como un radical nitróxido (>N-O•).

5 Composiciones

- 10 También se describe en el presente documento una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en el presente documento un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende una mezcla de un compuesto TMF, como se describe en el presente documento y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 En una realización preferida, la composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) es adecuada para administración oral a un sujeto.

En una realización preferida, la composición se encuentra en forma de un comprimido oral, gránulos orales, un polvo oral, una cápsula oral, un sello oral o una píldora oral.

Usos

- 20 Los compuestos TFM, como se describen en el presente documento, son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos (por ejemplo, enfermedades) que se mejoran mediante la inhibición de la función de cinasa de CHK1, como se describe en el presente documento.

Uso en métodos para inhibir a CHK1

- 25 También se describe en el presente documento un método para inhibir la función de cinasa de CHK1, *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto una cinasa CHK1 con una cantidad efectiva de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento.

También se describe en el presente documento un método para inhibir la función de cinasa de CHK1 en una célula, *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento.

- 30 En una realización, el método comprende además poner en contacto la célula con uno o más agentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

35 Los ensayos adecuados para determinar la inhibición de la función de cinasa de CHK1 se describen en el presente documento y/o se conocen en la técnica.

En una realización, el método se lleva a cabo *in vitro*.

En una realización, el método se realiza *in vivo*.

- 40 En una realización, el compuesto TFM se proporciona en forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

Puede tratarse cualquier tipo de célula, incluyendo, pero sin limitación, adiposa, pulmonar, gastrointestinal (incluyendo, por ejemplo, intestinal, de colon), de mama (mamaria), ovárica, de próstata, de hígado (hepática), de riñón (renal), de vejiga, de páncreas, de cerebro y de piel.

- 45 Un experto habitual en la materia es fácilmente capaz de determinar si un compuesto candidato inhibe o no la función de cinasa de CHK1. Por ejemplo, en el presente documento se describen ensayos adecuados.

Uso en métodos para inhibir proliferación celular, etc.

- 50 Los compuestos TFM descritos en el presente documento, por ejemplo, (a) regulan (por ejemplo, inhiben) la proliferación celular; (b) inhiben la progresión del ciclo celular; (c) promueven la apoptosis celular; o (d) una combinación de una o más de estas.

También se describe en el presente documento un método para regular (por ejemplo, inhibir) la proliferación celular (por ejemplo, proliferación de una célula), inhibir la progresión del ciclo celular, promover la apoptosis celular o una combinación de una o más de estas, *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento.

- 5 En una realización, el método es un método para regular (por ejemplo, inhibir) la proliferación celular (por ejemplo, proliferación de una célula), *in vitro* o *in vivo*, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento.

En una realización, el método comprende además poner en contacto la célula con uno o más agentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

En una realización, el método se lleva a cabo *in vitro*.

- 15 En una realización, el método se realiza *in vivo*.

En una realización, el compuesto TFM se proporciona en forma de una composición farmacéuticamente aceptable.

Puede tratarse cualquier tipo de célula, incluyendo, pero sin limitación, pulmonar, gastrointestinal (incluyendo, por ejemplo, intestinal, de colon), de mama (mamaria), ovárica, de próstata, de hígado (hepática), de riñón (renal), de vejiga, de páncreas, de cerebro y de piel.

Un experto habitual en la materia es fácilmente capaz de determinar si un compuesto candidato regula o no (por ejemplo, inhibe) la proliferación celular, etc. Por ejemplo, en el presente documento se describen ensayos que pueden usarse convenientemente para determinar la actividad ofrecida por un compuesto particular.

- 25 Por ejemplo, una muestra de células (por ejemplo, de un tumor) puede cultivarse *in vitro* y ponerse en contacto con dichas células un compuesto y observarse el efecto del compuesto en esas células. Como ejemplo de "efecto", puede determinarse el estado morfológico (por ejemplo, vivas o muertas, etc.) de las células. En los casos donde se observa que el compuesto ejerce una influencia sobre las células, esto puede usarse como marcador pronóstico o diagnóstico de la eficacia del compuesto en los métodos para tratar a un paciente que porte células del mismo tipo celular.

- 30 Uso en métodos de terapia

También se describe en el presente documento un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

También se describe en el presente documento un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia por administración oral.

35 En una realización, el método de tratamiento comprende tratamiento con (i) un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y (ii) uno o más agentes diferentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

40 Tambien se describe en el presente documento (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) un agente radiofarmacéutico sistémico; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN, como se describe en el presente documento, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, en el que el método de tratamiento comprende tratamiento con (i) un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y (a) el inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) el agente que daña el ADN; (c) el antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) el agente dirigido a microtúbulos; (e) el agente radiofarmacéutico sistémico; (f) el inhibidor de un regulador de la mitosis o el regulador del punto de control mitótico; (g) el inhibidor de un transductor de señal de daño en el ADN; o (h) el inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

Uso en la fabricación de medicamentos

También se describe en el presente documento el uso de un compuesto TFM, como se describe en el presente

documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en tratamiento.

También se describe en el presente documento el uso de un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en tratamiento por administración oral.

En una realización, el medicamento comprende al compuesto TFM.

- 5 En una realización, el tratamiento comprende tratamiento con (i) un medicamento que comprende un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y (ii) uno o más agentes diferentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

También se describe en el presente documento el uso de (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; o (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en un tratamiento, en el que el tratamiento comprende tratamiento con (i) un compuesto TFM, como se describe en el presente documento y (a) los inhibidores de ADN topoisomerasa I o II; (b) el agente que daña el ADN; (c) el antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) el agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) el inhibidor de un regulador de la mitosis o un regulador del punto de control mitótico; (g) el inhibidor de un transductor de señal de daño en el ADN; o (h) el inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

Métodos de tratamiento

También se describe en el presente documento un método de tratamiento que comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de TFM, como se describe en el presente documento, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento que comprende administrar por vía oral a un paciente que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de TFM, como se describe en el presente documento, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica.

En una realización, el método comprende además administrar al sujeto uno o más agentes seleccionados de: (a) un inhibidor de la ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que daña el ADN; (c) un antimetabolito o un inhibidor de la timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiaciones ionizantes; (f) un inhibidor de un regulador de mitosis o un regulador de punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño al ADN; y (h) un inhibidor de una enzima reparadora de daños en el ADN.

Afecciones tratadas - Afecciones mediadas por CHK1

35 En una realización (por ejemplo, de uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es tratamiento de una enfermedad o afección que está mediada por CHK1.

Afecciones tratadas - Afecciones mejoradas por la inhibición de la función de cinasa de CHK1

En una realización (por ejemplo, de uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es tratamiento de: una enfermedad o afección que se mejora mediante la inhibición de la función de cinasa de CHK1.

Trastornos tratados - Afecciones proliferativas

En una realización (por ejemplo, de uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es tratamiento de: una afección proliferativa.

45 La expresión "afección proliferativa", como se usa en el presente documento, se refiere a proliferación celular incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseada, tal como crecimiento neoplásico o hiperplásico.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de: una afección proliferativa caracterizada por una proliferación celular benigna, pre-maligna o maligna, incluyendo, por ejemplo: neoplasias, hiperplasias y tumores (por ejemplo, histocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (ver más adelante), psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos), fibrosis pulmonar, ateroesclerosis, proliferación de células musculares lisas en los vasos sanguíneos, tales como estenosis o restenosis después de angioplastia.

Trastornos tratados - Cáncer

En una realización (por ejemplo, de uso en métodos de terapia, de uso en la fabricación de medicamentos, de métodos de tratamiento), el tratamiento es tratamiento de cáncer.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de una afección proliferativa.

- 5 En una realización, el tratamiento es tratamiento de cáncer.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, neuroblastoma, glioma, sarcoma, osteosarcoma, cáncer óseo, cáncer nasofaríngeo (por ejemplo, cáncer de cabeza, cáncer de cuello), cáncer de piel, cáncer escamoso, sarcoma de Kaposi, melanoma, melanoma maligno, linfoma o leucemia.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de:

15 un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de vejiga, de mama, de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), de riñón, epidérmico, de hígado, de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma, cáncer microcítico de pulmón y carcinomas no microcíticos de pulmón), de esófago, de vesícula biliar, de ovario, de páncreas (por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino), de estómago, de cuello de útero, de tiroides, de próstata, de piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas);

20 un tumor hematopoyético de linaje linfoide, por ejemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas o linfoma de Burkitt; un tumor hematopoyético de linaje mieloide, por ejemplo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico o leucemia promielocítica;

un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo fibrosarcoma o rhabdomiosarcoma;

25 un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma;

melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentosum; queratoacantoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de cáncer de cabeza; cáncer de cuello; cáncer del sistema nervioso; cáncer de cerebro; neuroblastoma; cáncer de pulmón/mediastino; cáncer de mama; cáncer de esófago; cáncer de estómago; cáncer de hígado; cáncer del tracto biliar; cáncer de páncreas; cáncer de intestino delgado; cáncer de intestino grueso; cáncer colorrectal; cáncer ginecológico; cáncer genitourinario; cáncer de ovario; cáncer de la glándula tiroides; cáncer de la glándula suprarrenal; cáncer de piel; melanoma; sarcoma óseo; sarcoma de tejidos blandos; neoplasia maligna pediátrica; enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; mieloma; leucemia; o metástasis de un sitio primario desconocido.

- 35 35 En una realización, el tratamiento es tratamiento de: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, linfoma, melanoma, glioma o neuroblastoma.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, ser un cáncer deficiente para p53. En una realización, el cáncer es un cáncer deficiente para p53.

- 40 40 En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, ser un cáncer amplificado por MYC. En una realización, el cáncer es cáncer amplificado por MYC.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, ser un cáncer amplificado por c-MYC. En una realización, el cáncer es cáncer amplificado por c-MYC.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, ser un cáncer amplificado por MYCN. En una realización, el cáncer es cáncer amplificado por MYCN.

- 45 45 En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, la sobreexpresión de MYC. En una realización, el cáncer es cáncer caracterizado por la sobreexpresión de MYC.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, la sobreexpresión de MYCN. En una realización, el cáncer es cáncer caracterizado por la sobreexpresión de MYCN.

- 50 50 En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, la sobreexpresión de c-MYC. En una realización, el cáncer es cáncer caracterizado por la sobreexpresión de c-MYC.

En una realización, el cáncer es neuroblastoma amplificado por MYCN.

En una realización, el cáncer es linfoma de células B amplificado por c-MYC.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, estrés replicativo endógeno aumentado. En una realización, el cáncer es cáncer caracterizado por estrés replicativo endógeno aumentado.

En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, activación endógena aumentada de la señalización de CHK1. En una realización, el cáncer es cáncer caracterizado por la activación endógena aumentada de la señalización de CHK1.

En una realización, el tratamiento es tratamiento de metástasis del cáncer.

10 En una realización, el cáncer se caracteriza por, o se caracteriza adicionalmente por, células madre de cáncer.

El efecto anticáncer puede surgir mediante uno o más mecanismos, incluyendo, pero sin limitación, la regulación de la proliferación celular, la inhibición de la progresión del ciclo celular, la inhibición de la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos), la inhibición de la metástasis (la dispersión de un tumor a partir de su origen), la inhibición de la migración celular (la diseminación de células cancerosas a otras partes del organismo), la inhibición de la invasión (la diseminación de células tumorales a estructuras normales vecinas) o la promoción de la apoptosis celular (muerte celular programada). Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de los cánceres descritos en el presente documento, independientemente de los mecanismos discutidos en el presente documento.

Tratamiento

20 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratar un trastorno, se refiere en general al tratamiento de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en las que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso del trastorno e incluye una reducción en la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, el alivio de los síntomas del trastorno, la mejora del trastorno y la cura del trastorno. El tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis) también está incluido. Por ejemplo, el uso con pacientes que no han desarrollado aún el trastorno, pero que están en riesgo de desarrollar el trastorno, está abarcado por el término "tratamiento".

Por ejemplo, el tratamiento incluye la profilaxis del cáncer, reducir la incidencia de cáncer, aliviar los síntomas de cáncer, etc.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de un compuesto o un material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con una pauta de tratamiento deseada.

Terapias de combinación

35 El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, en las que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de manera secuencial o simultánea. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento también pueden usarse en terapias de combinación, por ejemplo, junto con otros agentes. Los ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no están limitados a, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, por ejemplo, fármacos, anticuerpos (por ejemplo, como en inmunoterapia), profármacos (por ejemplo, como en terapia fotodinámica, GDEPT, ADEPT, etc.); cirugía; radioterapia; terapia fotodinámica; terapia génica; y dietas controladas.

También se describe en el presente documento un compuesto como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes o terapias que regulan el crecimiento, supervivencia o diferenciación celular mediante un mecanismo diferente, por lo tanto tratando varias características del desarrollo del cáncer.

45 La combinación particular puede ser a discreción del médico que seleccionará las dosificaciones usando su conocimiento general común y pautas de dosificación conocidas para un médico experto.

50 Los agentes (es decir, el compuesto descrito en el presente documento, más uno o más agentes distintos) pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente y pueden administrarse en pautas de dosificación individualmente variantes y mediante vías distintas. Por ejemplo, cuando se administran secuencialmente, los agentes pueden administrarse 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 tras periodos incluso más largos cuando sea necesario), la pauta precisa de dosificación será acorde con las propiedades de el(los) agente(s) terapéutico(s).

Los agentes (es decir, el compuesto descrito en el presente documento, más otro uno o más agentes) pueden formularse juntos en una forma de dosificación unitaria o como alternativa, los agentes individuales pueden formularse por separado y presentarse juntos en forma de kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.

Agentes adicionales para terapia de combinación

- 5 Tal como se discute en el presente documento, en algunas realizaciones, el compuesto TFM se emplea en combinación con (por ejemplo, de manera conjunta con) uno o más agentes diferentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) radiación ionizante; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

Cuando se emplean tanto un compuesto TFM como uno o más agentes diferentes, pueden usarse (por ejemplo, ponerse en contacto, administrarse, etc.) en cualquier orden. Además, pueden usarse (por ejemplo, ponerse en contacto, administrarse, etc.) juntos, como parte de una sola formulación o por separado, como formulaciones separadas.

- 10 15 Por ejemplo, con respecto a los métodos de tratamiento que emplean tanto un compuesto TFM como uno o más agentes diferentes, el tratamiento con (por ejemplo, administración de) el compuesto TFM puede ser anterior a, concurrente con o ir a continuación del tratamiento con (por ejemplo, administración de) los uno o más agentes diferentes o una combinación de los mismos.

20 En una realización, el tratamiento con (por ejemplo, administración de) un compuesto TFM es concurrente con o va seguido del tratamiento con (por ejemplo, administración de) los uno o más agentes diferentes.

En una realización, los uno o más agentes diferentes son un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; por ejemplo, etopósido, topotecán, camptotecina, irinotecán, SN-38, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina y mitoxantrona.

25 En una realización, los uno o más agentes diferentes son un agente que daña el ADN; por ejemplo, un agente alquilante, por ejemplo, temozolomida, dacarbazina, mitomicina C, ciclofosfamida, ifosfamida, BCNU, CCNU, melfalano, busulfán y clorambucilo; un agente platinante, por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; o un compuesto que genera radicales libres, por ejemplo, bleomicina.

30 En una realización, los uno o más agentes diferentes son un antimetabolito o un inhibidor de timidilato sintasa (TS); por ejemplo, 5-fluorouracilo, hidroxiurea, gemicitabina, citarabina, fludarabina, capecitabina, nelarabina, raltitrexed, pemetrexed y ZD9331.

En una realización, los uno o más agentes diferentes son un agente dirigido a microtúbulos; por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel, eribulina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

35 En una realización, los uno o más agentes diferentes son radiación ionizante (por ejemplo, como parte de radioterapia), por ejemplo, suministrada mediante irradiación de haz externo o suministrada mediante la administración de agentes radiofarmacéuticos sistémicos, por ejemplo, ¹³¹I-metayodobencilguanidina, yoduro sódico (¹³¹I), tosutmab yódico (¹³¹I) e ibritumomab (⁹⁰Y) tiuxetano.

En una realización, los uno o más agentes diferentes son un inhibidor de un regulador de la mitosis o un regulador de punto de control mitótico, por ejemplo, un inhibidor de Wee1 cinasa, un inhibidor de Aurora cinasa o un inhibidor de cinasa 1 similar a polo.

40 45 En una realización, los uno o más agentes diferentes son un inhibidor de un transductor de señales de daño en el ADN, por ejemplo, un inhibidor de ATR cinasa, un inhibidor de ATM cinasa, un inhibidor de CHK2 o un inhibidor de MK2.

En una realización, los uno o más agentes diferentes son un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN, por ejemplo, un inhibidor de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), por ejemplo, olaparib.

45 Otros usos

Los compuestos TFM descritos en el presente documento también pueden usarse como aditivos para cultivos celulares para inhibir la función de cinasa de CHK1, por ejemplo, para inhibir la proliferación celular, etc.

50 Los compuestos TFM descritos en el presente documento también pueden usarse como parte de un ensayo *in vitro*, por ejemplo, para determinar si es probable que un hospedador candidato se beneficie del tratamiento con el compuesto en cuestión.

Los compuestos TFM descritos en el presente documento también pueden usarse como un patrón, por ejemplo, en un ensayo, para identificar otros compuestos, otros inhibidores de la función de cinasa de CHK1, otros

agentes antiproliferativos, otros agentes anticáncer, etc.

Kits

También se describe en el presente documento un kit que comprende (a) un compuesto TFM como se describe en el presente documento o una composición que comprende un compuesto TFM como se describe en el presente documento, por ejemplo, preferentemente proporcionado en un contenedor adecuado y/o con un empaquetado adecuado; y (b) instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones escritas de cómo administrar el compuesto o composición.

En una realización, el kit comprende además uno o uno o más agentes diferentes seleccionados entre: (a) un inhibidor de ADN topoisomerasa I o II; (b) un agente que dañe al ADN; (c) un antimetabolito o inhibidor de timidilato sintasa (TS); (d) un agente dirigido a microtúbulos; (e) un agente radiofarmacéutico sistémico; (f) un inhibidor de un regulador de la mitosis o de un regulador de un punto de control mitótico; (g) un inhibidor de un transductor de señal de daño del ADN; y (h) un inhibidor de una enzima de reparación del daño en el ADN.

Las instrucciones escritas también pueden incluir una lista de indicaciones para las que el principio activo es un tratamiento adecuado.

15 Vías de administración

El compuesto TFM o composición farmacéutica que comprende el compuesto TFM puede administrarse a un sujeto por una vía de administración conveniente, ya sea de forma sistémica/periférica o tópica (es decir, en el lugar de acción deseado).

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, oral (por ejemplo, mediante ingestión); bucal; 20 sublingual; transdérmica (incluyendo, por ejemplo, mediante un parche, emplasto, etc.); transmucosa (incluyendo, por ejemplo, mediante un parche, emplasto, etc.); intranasal (por ejemplo, mediante pulverizador nasal); ocular (por ejemplo, mediante gotas oculares); pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o nariz); rectal (por ejemplo, mediante un suppositorio o enema); vaginal (por ejemplo, mediante un pesario); parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, 25 intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; mediante implante de un depósito o reservorio, por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular.

Preferentemente, la vía de administración es oral y el compuesto TFM o la composición farmacéutica que comprende el compuesto TFM se administra a un sujeto por vía oral.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un cordado, un vertebrado, un mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, wombat), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un múrido (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), ave (por ejemplo, un pájaro), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un mono o gran simio), un mono (por ejemplo, tití común, babuino), un gran simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto.

40 En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

Formulaciones

Aunque es posible administrar un compuesto TFM solo, es preferible presentarlo en forma de una formulación farmacéutica (por ejemplo, composición, preparación, medicamento) que comprenda al menos un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes bien conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o 45 profilácticos.

De este modo, también se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas, como se han definido con anterioridad y métodos para fabricar una composición farmacéutica que comprenden mezclar al menos un compuesto TFM, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes bien conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo,

vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formula como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosis) del compuesto.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del buen

- 5 juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

10 Los vehículos, diluyentes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en los textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5^a edición, 2005.

15 Las formulaciones pueden prepararse cualquier mediante método bien conocido en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto con un vehículo que constituye uno o más ingredientes opcionales. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima el compuesto con los vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, etc.) y después se da forma al producto, si fuera necesario.

20 La formulación puede prepararse para proporcionar una liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retardada, temporizada o sostenida; o una combinación de las mismas.

25 Las formulaciones pueden estar de manera adecuada en forma de líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, enjuagues bucales, gotas, comprimidos (incluyendo, por ejemplo, comprimidos recubiertos), gránulos, polvos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas (incluyendo, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y blanda), sellos, píldoras, ampollas, bolos, supositorios, pesarios, tinturas, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, espumas, pulverizadores, nebulizadores o aerosoles.

- 30 Las formulaciones pueden proporcionarse de manera adecuada como un parche, emplasto adhesivo, vendas, vendaje o similar que se impregna con uno o más compuestos y opcionalmente con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes, incluyendo, por ejemplo, potenciadores de la penetración, permeación y absorción. Las formulaciones también pueden proporcionarse de manera adecuada en forma de un depósito o reservorio.

- 35 El compuesto puede disolverse en, suspenderse en o mezclarse con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables diferentes. El compuesto puede presentarse en un liposoma u otro micropartículado que esté diseñado para dirigir el compuesto, por ejemplo, a componentes de la sangre o a uno o más órganos.

- 40 Las formulaciones adecuadas para administración oral (por ejemplo, mediante ingestión) incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, píldoras, ampollas, bolos.

- 45 Las formulaciones adecuadas para administración bucal incluyen enjuagues bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios. Las pastillas para chupar comprenden normalmente el compuesto en una base saborizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto. Las pastillas comprenden normalmente el compuesto en una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica. Los enjuagues bucales comprenden normalmente el compuesto en un vehículo líquido adecuado.

- 50 Las formulaciones adecuadas para administración sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas y píldoras.

- 55 Las formulaciones adecuadas para administración transmucosa oral incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), enjuagues bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios.

- 50 Las formulaciones adecuadas para administración transmucosa no oral incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), supositorios, pesarios, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios.

- 55 Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendas, vendajes, depósitos y reservorios.

Los comprimidos pueden producirse por métodos convencionales, por ejemplo, compresión o moldeado, opcional con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el compuesto en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, goma arábiga, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetil celulosa); cargas o diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); desintegrantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada); agentes tensioactivos o dispersantes o humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico); conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico); saborizantes, agentes potenciadores del sabor y edulcorantes. Los comprimidos moldeados se pueden producir en una máquina adecuada moldeando una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del compuesto que se esté usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos pueden proporcionarse opcionalmente con un recubrimiento, por ejemplo, para afectar a la liberación, por ejemplo un recubrimiento entérico, para proporcionar liberación en partes del tracto gastrointestinal distintas del estómago.

Las pomadas se preparan normalmente a partir del compuesto y una base de pomada parafínica o miscible en agua.

Las cremas se preparan normalmente a partir del compuesto y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de la crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente un 30% p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma deseable un compuesto que potencie la absorción o penetración del compuesto a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración cutánea incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

Las emulsiones se preparan normalmente a partir del compuesto y una fase oleosa, que opcionalmente puede comprender simplemente un emulsionante (también conocido como emulgente) o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o tanto con una grasa como con un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulsionante o emulsionantes con o sin estabilizante o estabilizantes constituyen la denominada cera emulsionante y la cera junto con el aceite y/o la grasa constituyen la denominada base de pomada emulsionante que constituye la fase oleosa dispersa de las formulaciones en crema.

Los emulgentes y estabilizadores de la emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetoestearílico, alcohol mirístico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio. La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del compuesto en la mayor parte de los aceites usados probablemente en las formulaciones de emulsión farmacéuticas puede ser muy baja. Por lo tanto, la crema debe ser preferentemente un producto no graso, que no manche y lavable, con una consistencia adecuada para evitar la filtración desde tubos u otros contenedores. Pueden usarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, mono o dibásicos tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oelato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-ethylhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocidos como Crodamol CAP, siendo los tres últimos los ésteres preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Como alternativa, pueden usarse lípidos de elevado punto de fusión, tales como parafina blanca blanda y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, en las que el vehículo es un líquido, incluyen, por ejemplo, pulverizador nasal, gotas nasales o administración de aerosol mediante nebulizador, incluyendo soluciones acuosas u oleosas del compuesto.

Las formulaciones adecuadas para administración intranasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen, por ejemplo, aquellas presentadas como un polvo ordinario que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros que se administra del mismo modo en el que se consume el rapé, es decir, mediante una inhalación rápida a través de las fosas nasales a partir de un envase que contiene el polvo sostenido junto a la nariz.

Las formulaciones adecuadas para administración pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación) incluyen aquellas presentadas en forma de un pulverizador de aerosol a partir de un envase a presión, utilizando un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados.

Las formulaciones adecuadas para administración ocular incluyen gotas oculares en las que el compuesto se

disuelve o suspende en un vehículo adecuado, en especial un disolvente acuoso para el compuesto.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal pueden presentarse como un suppositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato; o como una solución o suspensión para

5 tratamiento mediante enema.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador que contienen además del compuesto, aquellos vehículos conocidos en la técnica como adecuados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección), incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, estériles (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el compuesto se disuelve, se suspende o se proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra forma microparticulada). Dichos líquidos pueden contener además otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes suspensores, agentes espesantes y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor pretendido. Los ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, gliceroles, aceites vegetales y similares. Los ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en dichas formulaciones incluyen cloruro de sodio inyectable, solución de Ringer o inyección de Ringer lactada. Normalmente, la concentración del compuesto en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a

20 aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores sellados unidosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales y pueden almacenarse en estado criodesecado (lioofilizado) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

25 Dosificación

El experto en la materia apreciará que las dosificaciones apropiadas de los compuestos TFM y de las composiciones que comprenden los compuestos TFM, pueden variar de un paciente a otro. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará equilibrar el nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores

30 incluyendo, pero sin limitación, la actividad del compuesto TFM particular, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto TFM, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación, la gravedad del trastorno y la especie, sexo, edad, peso, estado, salud general e historial médico anterior del paciente. La cantidad de compuesto TFM y la vía de administración serán en última instancia a discreción del médico, veterinario o profesional sanitario, aunque en general la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que logren el efecto deseado sin causar efectos secundarios dañinos o perjudiciales. La administración puede realizarse en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) a lo largo del curso de tratamiento. Los métodos para determinar los medios más efectivos y la dosis de administración son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para la terapia, el

40 propósito de la terapia, la célula o células diana a tratar y el sujeto a tratar. Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples con el nivel y ruta de dosificación seleccionados por el médico, veterinario o profesional sanitario tratante.

En general, una dosis adecuada del compuesto TFM está en el intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 250 mg (más normalmente 100 µg a aproximadamente 25 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. En los casos en los que el compuesto es una sal, un éster, una amida, un profármaco o similares, la cantidad a administrar se calcula basándose en el compuesto parental y por lo tanto el peso real a usar debe aumentarse de forma proporcional.

Ejemplos

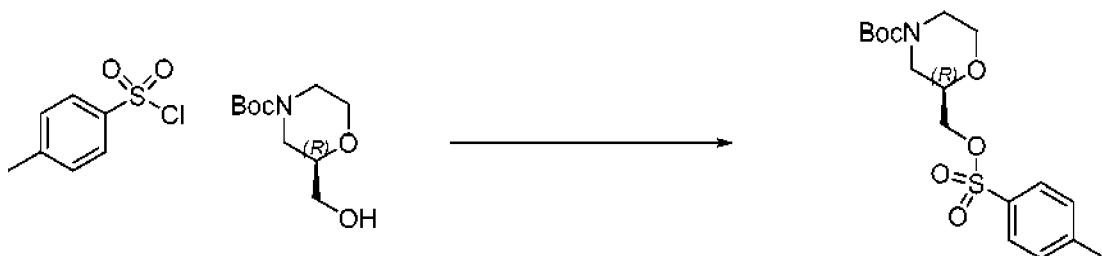
Síntesis química

50 Síntesis 1

5-[[4-[[2R]-morfolin-2-il]metilamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo (Compuesto 1)

Síntesis 1A

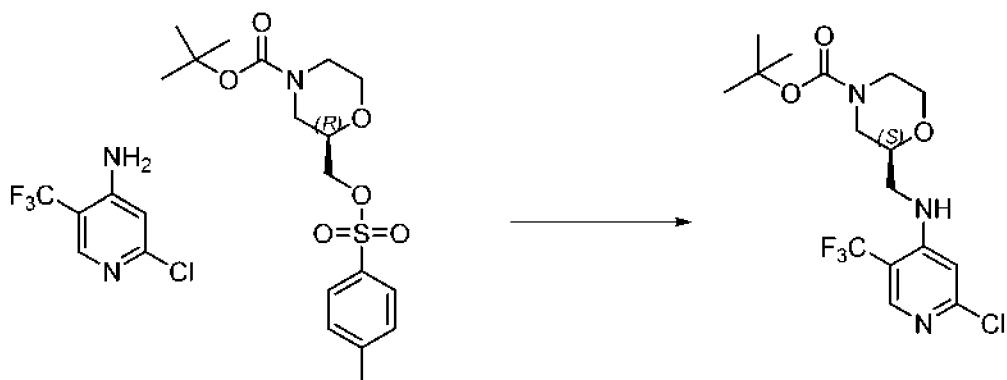
2-(tosiloximetil)morfolin-4-carboxilato de (R)-*terc*-butilo



- Se añadió trietilamina (15,46 ml, 110 mmol) a 2-(hidroximetil)-morpholin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo (21,73 g, 100 mmol) en diclorometano (50,0 ml) para proporcionar una solución incolora que se enfrió en un baño de hielo. Se añadió cloruro de 4-toluenosulfonilo (20,02 g, 105 mmol) en porciones pequeñas manteniendo la 5 temperatura interna por debajo de los 3 °C. La suspensión se agitó durante 21 horas a temperatura ambiente antes de concentrarla al vacío. El material en bruto se disolvió en acetato de etilo (750 ml), se lavó con agua (450 ml), salmuera (200 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. Despues de filtrar y retirar los volátiles al vacío, se añadió hexano (150 ml) y se filtró el precipitado resultante, se lavó con hexano (300 ml) y se secó hasta proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color blanco (35,66 g, 96 %).
- 10 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1,46 (9H, s), 2,46 (3H, s), 2,62-2,73 (1H, m), 2,85-2,94 (1H, m), 3,44-3,49 (1H, m), 3,58-3,63 (1H, m), 3,77-3,94 (3H, m), 3,99-4,06 (2H, m), 7,36 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,80 (2H, d, J = 8,5 Hz). CL-EM (Agilent 4 min) T_r 2,90 min; m/z (ESI) 372 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Síntesis 1B

2-((2-cloro-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morpholin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo

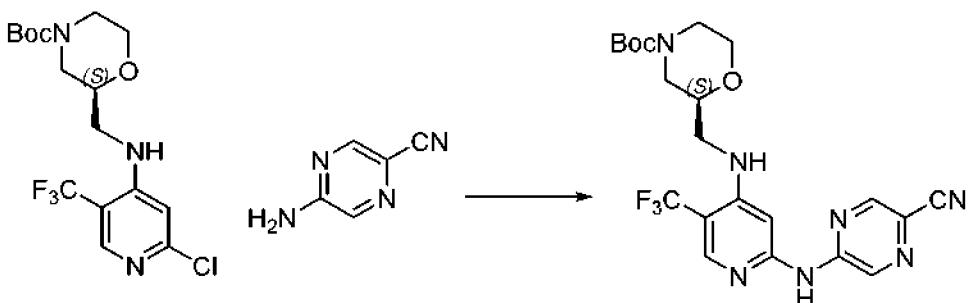


- 15 A una solución de 2-cloro-5-(trifluorometil)piridin-4-amina (2,9 g, 14,75 mmol) en dimetilformamida (95 ml) se le añadió hidruro sódico (60 % en peso en aceite; 1,180 g, 29,5 mmol) en porciones a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 10 minutos a 80 °C. Se añadió 2-(tosiloximetil)morpholin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo en porciones y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió en solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (100 ml), se diluyó con agua (250 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 ml). Despues de separar las dos fases, la fase acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (4 x 100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, se concentraron y se secaron exhaustivamente al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna, eluyendo inicialmente con éter dietílico al 2,5 %/acetato de etilo al 2,5 % en diclorometano y despues con éter dietílico al 20 % en diclorometano como el producto deseado eluido de la columna. Las fracciones adecuadas se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color blanquecino (4,51 g, 77 %).

- 20 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1,49 (9H, s), 2,70-2,84 (1H, m), 2,92-3,05 (1H, m), 3,18-3,23 (1H, m), 3,33-3,37 (1H, m), 3,55-3,61 (1H, m), 3,66-3,71 (1H, m), 3,80-4,07 (3H, m), 5,32 (1H, s ancho), 6,61 (1H, s), 8,24 (1H, s). CLEM (Agilent 4 min) T_r 3,04 min; m/z (ESI) 396 [MH^+].

Síntesis 1C

2-((2-(5-cianopirazin-2-ilamino)-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morpholin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo

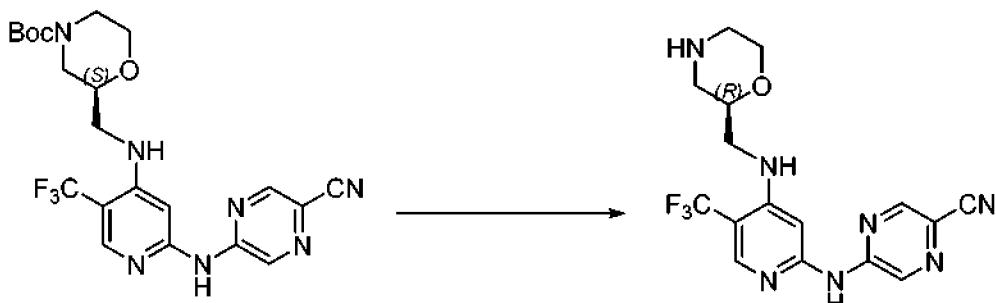


2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo (4,67 g, 11,8 mmol), 2-amino-5-cianopirazina (1,98 g, 16,5 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (0,86 g, 0,94 mmol), rac-2,2'-bis(difenilfosfin)-1,1'-binaftilo (0,54 g, 0,87 mmol) y carbonato de cesio (7,69 g, 23,6 mmol) se suspendieron en dioxano anhídrico (108 ml) en atmósfera de argón. Se burbujeó argón a través de la mezcla durante 30 minutos, después de lo cual la suspensión de calentó a 100 °C durante 29 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con diclorometano, después se absorbió sobre gel de sílice. El gel de sílice preabsorbido se añadió a una columna de KP-Sil SNAP de 340 g que se había equilibrado con acetato de etilo al 20 % en hexano. La cromatografía en columna, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-35 % en hexano, proporcionó un material parcialmente purificado en forma de una goma de color naranja. Esta se purificó adicionalmente por cromatografía en columna, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano, para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color castaño claro (3,28 g, 58%).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1,49 (9H, s), 2,73-2,86 (1H, m), 2,94-3,07 (1H, m), 3,26-3,31 (1H, m), 3,38-3,43 (1H, m), 3,57-3,61 (1H, m), 3,70-3,75 (1H, m), 3,83-4,08 (3H, m), 5,31 (1H, s ancho), 7,12 (1H, s), 8,13 (1H, s), 8,23 (1H, s), 8,57 (1H, s), 8,87 (1H, s). CL-EM (Agilent 4 min) T_r 2,90 min; m/z (ESI) 480 [MH^+].

Síntesis 1D

5-[[4-[(2R)-morfolin-2-il]metilamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo (compuesto 1)



Una solución de 2-((2-(5-cianopirazin-2-ilamino)-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo (1,09 g, 2,273 mmol) en diclorometano (8 ml) se añadió gota a gota durante 10 minutos a una solución de ácido trifluoroacético (52,7 ml, 709 mmol) y triisopropilsilano (2,61 ml, 12,73 mmol) en diclorometano seco (227 ml) a temperatura ambiente. Después de agitarla durante 30 minutos, la mezcla se concentró al vacío. El concentrado se resuspendió en diclorometano (200 ml) y se concentró al vacío, después se resuspendió en tolueno (100 ml) y se concentró.

El procedimiento anterior se realizó por triplicado (empezando cada vez con 1,09 g de 2-((2-(5-cianopirazin-2-ilamino)-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato) de (S)-tercbutilo y las tres porciones de producto en bruto producidas de este modo se combinaron mediante purificación por cromatografía de intercambio iónico en columnas Biotage NH2 Isolute 2 x 20 g, eluyendo con metanol. El eluyente se concentró y se añadió metanol al 10 % en éter de dietilo (25 ml). El sólido resultante se filtró, se lavó con éter de dietilo (30 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color pajizo claro (2,30 g, 89%).

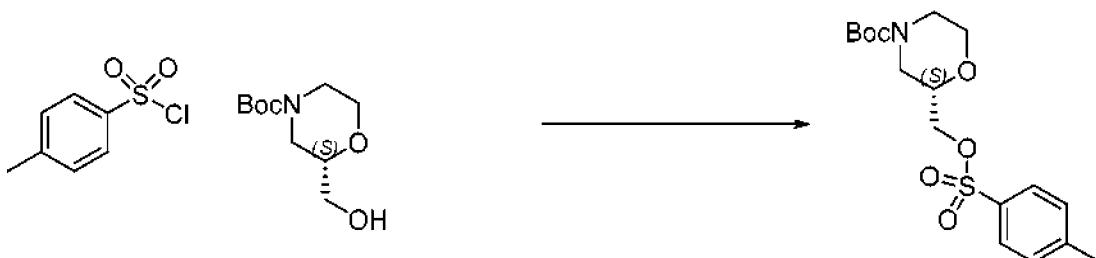
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 2,62 (1H, $J= 12, 10$ Hz), 2,78-2,84 (2H, m), 2,95 (1H, dd, $J= 12, 2$ Hz), 3,27-3,38 (2H, m), 3,63 (1H, ddd, $J= 14, 9,5, 3$ Hz), 3,73-3,78 (1H, m), 3,91 (1H, ddd, $J= 11,4, 2$ Hz), 7,26 (1H, s), 8,18 (1H, s), 8,63 (1H, s), 9,01 (1H, s). CL-EM (Agilent 4 min) T_r 1,22 min; m/z (ESI) 380 [$\text{M}+\text{H}^+$]. Rotación óptica $[\alpha]_D^{24} = +7,0$ (c 1,0, DMF).

Síntesis 2 (Referencia)

5-[[4-[(2S)-morfolin-2-il]metilamino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrilo (compuesto 2)

Síntesis 2A

2-(tosiloximetil)morfolin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo

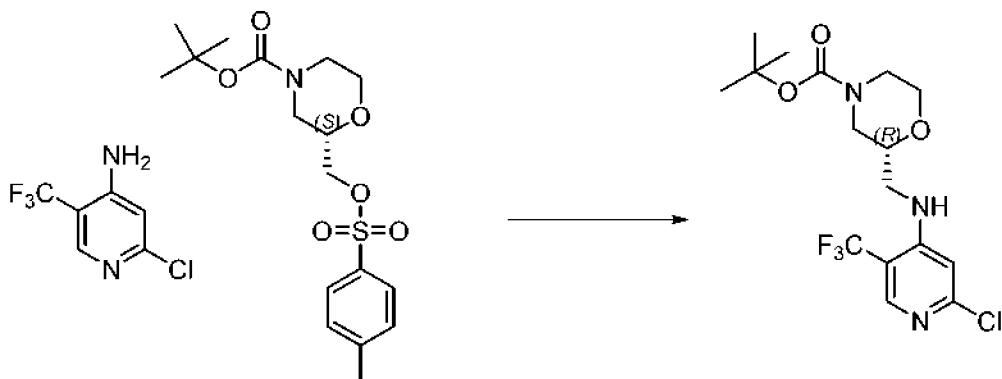


5 Se añadió trietilamina (6,05 ml, 43,0 mmol) a 2-(hidroximetil)-morfolin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo (8,5 g, 39,1 mmol) en diclorometano (19,56 ml) para proporcionar una solución incolora. Se añadió cloruro de 4-toluenosulfonilo (7,83 g, 41,1 mmol) en pequeñas porciones a 0 °C. La reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después de lo cual se concentró por evaporación a presión reducida. El concentrado se disolvió en acetato de etilo (300 ml) y la solución resultante se lavó con agua (150 ml), salmuera (150 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró por evaporación a presión reducida. Se añadió hexano 10 al concentrado y los volátiles se retiraron al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color blanco (14,46 g, 99%).

RMN 1 H (500 MHz, CDCl₃) δ 1,46 (9H, s), 2,46 (3H, s), 2,61-2,75 (1H, m), 2,85-2,94 (1H, m), 3,43-3,49 (1H, m), 3,58-3,63 (1H, m), 3,76-3,93 (3H, m), 3,99-4,06 (2H, m), 7,35 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,80 (2H, d, *J* = 8,5 Hz). CL-EM (Agilent 4 min) *T*_r 2,94 min; *m/z* (ESI) 394 [M+Na⁺].

15 Síntesis 2B

2-((2-cloro-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo

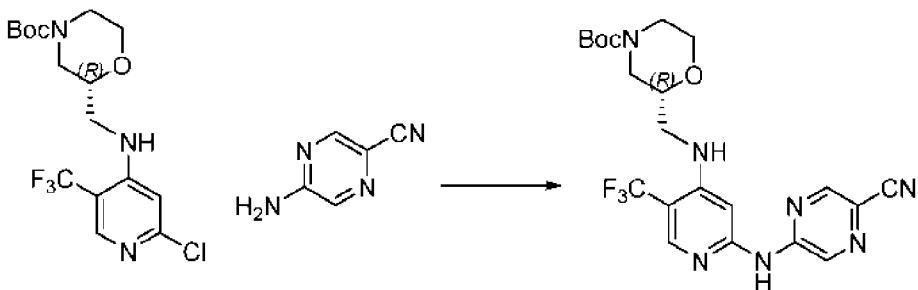


20 A una solución de 2-cloro-5-(trifluorometil)piridin-4-amina (1 g, 5,09 mmol) en dimetilformamida (32,6 ml) se le añadió hidruro sódico (60 % en peso en aceite; 0,407 g, 10,18 mmol) en porciones a temperatura ambiente seguido de agitación durante 10 minutos a 80 °C. Despues, se añadió 2-(tosiloximetil)morfolin-4-carboxilato de (S)-terc-butilo (2,268 g, 6,11 mmol) en porciones y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2,5 horas. Despues de enfriar, la mezcla se dividió en una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (30 ml), agua (100 ml) y acetato de etilo (30 ml). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa y se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 20 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, se concentraron y se secaron exhaustivamente al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna en una columna Thomson SingleStep de 90 g, eluyendo con una mezcla isocrática de éter de dietilo al 2,5 %/acetato de etilo al 2,5 % en diclorometano, para dar el compuesto del título en forma de una goma de color claro que más tarde cristalizó para proporcionar un polvo de color blanco (1,47 g, 73%).

25 30 RMN 1 H (500 MHz, CDCl₃) δ 1,48 (9H, s), 2,71-2,83 (1H, m), 2,92-3,05 (1H, m), 3,18-3,23 (1H, m), 3,33-3,37 (1H, m), 3,56-3,61 (1H, m), 3,66-3,71 (1H, m), 3,80-4,07 (3H, m), 5,32 (1H, s ancho), 6,61 (1H, s), 8,24 (1H, s). CLEM (Agilent 4 min) *T*_r 3,04 min; *m/z* (ESI) 396 [MH⁺].

Síntesis 2C

2-((2-(5-cianopirazin-2-ilamino)-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo



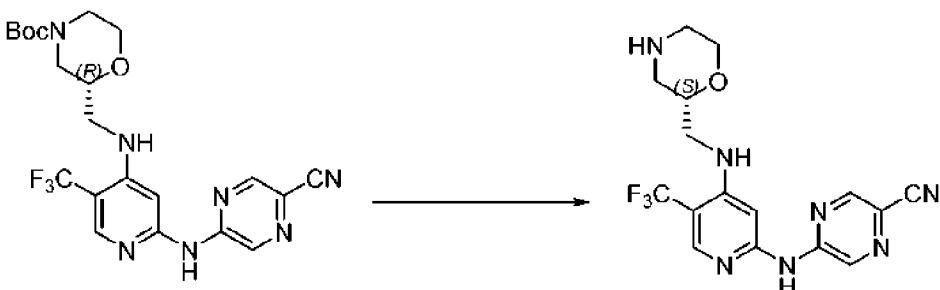
2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo (1,44 g, 3,64 mmol), 2-amino-5-cianopirazina (0,612 g, 5,09 mmol, 1,4 eq.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (0,267 g, 0,291 mmol, 0,08 eq.), rac-2,2'-bis(difenilfosfin)-1,1'-binaftilo (0,362 g, 0,582 mmol, 0,16 eq.) y carbonato de cesio

- 5 (2,37 g, 7,28 mmol) se suspendieron en dioxano anhídrico (33 ml) en atmósfera de argón. Se burbujeó argón a través de la mezcla durante 30 minutos, después de lo cual la mezcla se calentó a 100 °C durante 22 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con diclorometano, después se absorbió sobre gel de sílice. El gel de sílice preabsorbido se añadió a una columna KP-Sil SNAP de 100 g que se eluyó con acetato de etilo al 20-50 % en hexanos para proporcionar el producto parcialmente purificado en forma de una goma de color naranja.
- 10 El producto en bruto se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía en columna en una columna SingleStep Thomson de 90 g, eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano, para proporcionar el compuesto del título (1,19 g, 68%).

15 RMN 1 H (500 MHz, CDCl₃) δ 1,50 (9H, s), 2,71-2,88 (1H, m), 2,93-3,08 (1H, m), 3,27-3,32 (1H, m), 3,40-3,44 (1H, m), 3,55-3,64 (1H, m), 3,71-3,77 (1H, m), 3,82-4,11 (3H, m), 5,33 (1H, s ancho), 7,19 (1H, s), 8,23 (1H, s), 8,58 (1H, s), 8,84 (1H, s). CL-EM (Agilent 4 min) T_r 2,93 min; *m/z* (ESI) 480 [MH⁺].

Síntesis 2D

5-[[4-[(2S)-[2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-ilamino]amino]amino]-5-(trifluorometil)-2-piridil]amino]pirazin-2-carbonitrido (compuesto 2)



- 20 Una solución de 2-((2-(5-cianopirazin-2-ilamino)-5-(trifluorometil)piridin-4-ilamino)metil)morfolin-4-carboxilato de (R)-terc-butilo (1,19 g, 2,48 mmol) en diclorometano (8 ml) se añadió gota a gota durante 10 minutos a una solución de ácido trifluoroacético (57,5 ml, 774 mmol) y triisopropilsilano (2,85 ml, 13,90 mmol) en diclorometano seco (248 ml) a temperatura ambiente. Después de agitarla durante 30 minutos, la mezcla se concentró al vacío. El concentrado se resuspendió en diclorometano (200 ml) y se concentró al vacío, después se resuspendió en tolueno (100 ml) y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía de intercambio iónico en una columna Biotage NH2 Isolute de 20 g, eluyendo con metanol. El eluyente se concentró y se añadió metanol al 10 % en éter de dietilo (8 ml). El sólido se filtró, se lavó con éter de dietilo (20 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color pajizo claro (0,604 g, 64 % de rendimiento).

30 RMN 1 H (500 MHz, CD₃OD) δ 2,62 (1H, J= 12, 10 Hz), 2,78-2,84 (2H, m), 2,95 (1H, dd, J= 12, 2 Hz), 3,27-3,38 (2H, m), 3,63 (1H, ddd, J= 14, 9,5, 3 Hz), 3,73-3,78 (1H, m), 3,91 (1H, ddd, J= 11,4, 2 Hz), 7,26 (1H, s), 8,18 (1H, s), 8,63 (1H, s), 9,01 (1H, s). CL-EM (Agilent 4 min) T_r 1,26 min; *m/z* (ESI) 380 [M+H⁺]. Rotación óptica [α]_D²⁴ = -6,9 (c 1,0, DMF).

Métodos biológicos

Ensayo 1: Determinación de la potencia del inhibidor frente a CHK1 en el formato de ensayo Caliper

- 35 Se midió la actividad de cinasa de CHK1 en un ensayo de microfluidos que controla la separación de un producto fosforilado de su sustrato. El ensayo se llevó a cabo en un dispositivo EZ Reader II (Caliper Life Sciences Ltd, Runcorn, R.U.) usando tampón de separación (n.º 760367 Caliper LS) que contenía CR-8 (500 nM, n.º 760278, Caliper LS). Se usó un dispensador acústico ECHO® 550 (Labcyte Inc™) para generar curvas de dilución duplicadas de 8 pt directamente en placas de ensayo de polipropileno de 384 pocillos (Greiner Bio-

One, Gloucestershire, R.U.). Para cada compuesto de ensayo, se usó una concentración madre de 50 μ M en DMSO al 100%. La cantidad total de DMSO dispensada por pocillo fue de 250 nl para dar una concentración de ensayo final de DMSO al 2,5% y concentraciones del compuesto de ensayo en el intervalo de 0,5-1000 nM. A esta placa de ensayo, se le añadieron 6 μ l de CHK1 (concentración final 2 nM, preparación de proteína de elaboración propia), 2 μ l de péptido 10 (5-FAM-KKKVSRSGLYRSPSMPENLNRPR-COOH, concentración final 1,5 μ M, n.º 760354, Caliper LS) y 2 μ l de ATP (concentración final 90 μ M) todos diluidos en tampón de cinasa (HEPES 50 mM, NaN₃ al 0,02%, BSA al 0,01%, ortovanadato de sodio 0,1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween 20 al 0,1 %). Se selló la placa y se centrifugó (1 minuto, 1000 rpm) antes de su incubación durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de separación (90 μ l). La placa se leyó en un dispositivo EZ Reader II, usando una microplaca de 12 sorbedores (760137-0372R, Caliper LS) configurando el instrumento a 1,5 psi (10,34 kPa) y 1750 Δ V. El porcentaje de conversión de producto a partir de sustrato se generó automáticamente y el porcentaje de inhibición se calculó en relación a los pocillos de blanco (que no contenían enzima y que contenían DMSO al 2,5%) y los pocillos totales (que contenían todos los reactivos y DMSO al 2,5%). Los valores de IC_{50} de CHK1 se calcularon en GraphPad Prism5 usando un ajuste de regresión no lineal de la ecuación de log (concentración de inhibidor) frente a respuesta con pendiente variable.

Ensayo 2: Potencia celular en el ensayo de inhibición de la mitosis (MIA)

Se determinó la supresión del punto de control mediante inhibidores de la función de cinasa de CHK1 en combinación con agentes genotóxicos usando un ensayo ELISA basado en europio diseñado para cuantificar el número de células atrapadas en mitosis después del tratamiento con un agente genotóxico (para inducir el arresto de G2) seguido de un compuesto de ensayo inhibidor de CHK1 en combinación con nocodazol para suprimir esta detención. Se sembraron células HT29 a 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen de 160 μ l y se dejaron unir durante 36 horas. Se diluyó etopósido (solución madre 10 mM en DMSO) en medio hasta 250 μ M y después se añadieron 40 μ l a los pocillos adecuados para dar una concentración final de 50 μ M y se incubaron durante 1 hora. Este tratamiento se había optimizado previamente para inducir una detención en G2 en el 80 % de células 16 horas después del tratamiento. Después de la exposición al fármaco genotóxico, se retiró el medio y se sustituyó con medio reciente (160 μ l). Las células bien no se trataron (control no tratado o solo pretratamiento con etopósido), se expusieron a nocodazol después de pretratamiento con etopósido o solo nocodazol (concentración final de 100 ng/ml) o se expusieron a concentraciones crecientes de compuesto de ensayo (concentración final de 0,01 μ M a 200 nM) en combinación con nocodazol (concentración final de 100 ng/ml). Los compuestos de ensayo inhibidores de CHK1 se añadieron en 40 μ l usando pocillos cuadruplicados para cada concentración. Después de 21 horas de exposición, se retiró el medio y se fijaron las células en formaldehído al 4 % en suero salino tamponado con fosfato (PBS, pH 7,4, preenfriado a 4 °C) durante 30 minutos a 4 °C, seguido de metanol al 100 % (preenfriado a -20 °C) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con PBS y se bloquearon con leche en polvo al 5 % (Marvel) en suero salino tamponado con Tris (TBS, pH 7,4) a 37 °C durante 30 minutos. Se lavó cada pocillo tres veces con agua que contenía Tween 20 al 0,1 %. Se añadió anticuerpo primario (MPM-2; Upstate, n.º de Cat 05-368, 1 μ g/ml en leche al 5 % en TBS) a cada pocillo y se incubó durante toda la noche con agitación a 4 °C. Se retiró el anticuerpo primario y se lavaron los pocillos con agua que contenía Tween 20 al 0,1 %. El anticuerpo secundario (anti-ratón marcado con europio, Perkin-Elmer n.º de Cat AD0124, 333 ng/ml en tampón de ensayo Perkin-Elmer n.º de Cat 1244-111) se añadió a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con agua que contenía Tween 20 al 0,1 % y se trató con solución potenciadora (Perkin Elmer n.º de Cat 1244-105). Las emisiones de europio se contaron en un contador Wallac, Victor2 (Perkin-Elmer, Bucks, R.U.). Se incluyeron los controles adecuados y los resultados se expresaron como la concentración del compuesto de ensayo inhibidor de CHK1 necesaria para permitir que un 50 % de las células entrasen en mitosis (IC_{50} de MIA).

Ensayo 3: Evaluación de la selectividad en células respecto de la supresión del punto de control dependiente de CHK1 frente a citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad del compuesto usando un ensayo de sulforrodamina B de 96 horas (SRB, Sigma, número de catálogo S9012). Se sembraron células HT29 o SW620 a de 1,6 a 3,2 \times 10³ células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen de 160 μ l de medio y se dejaron unir durante 36 horas antes del tratamiento. Para los ensayos de citotoxicidad de los inhibidores de CHK1 (solución madre 10 mM en DMSO) se diluyeron en serie los compuestos en medio a partir de una concentración inicial de 250 μ M y después se añadieron 40 μ l a los pocillos adecuados por cuadruplicado para dar una concentración final en el intervalo de 50 a 0,1 μ M (10 concentraciones). Para los agentes genotóxicos, se diluyeron en serie los compuestos (SN38, LKT laboratories número de catálogo C0154 y gemicitabina, Lilly "Gemzar", solución madre 10 mM en DMSO) en medio a partir de una concentración inicial de 2 μ M y se añadieron 40 μ l a cada pocillo por cuadruplicado para dar concentraciones finales de 200 a 0,39 nM (10 concentraciones). Las células se incubaron durante 96 horas (cuatro duplicaciones) a 37°C en un ambiente humidificado con CO₂ al 5% y después se fijaron y tiñeron con SRB. Se incluyeron los controles adecuados y los resultados se expresaron como la concentración de compuesto de ensayo necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50% en relación a los controles no tratados (IC_{50} de SRB).

El índice de actividad (IA), una medida de la selectividad de los compuestos de ensayo inhibidores de CHK1 para efectuar la supresión del punto de control dependiente de CHK1 frente a la toxicidad, se calculó a partir de la proporción de la IC_{50} de la citotoxicidad del inhibidor de CHK1 frente a la IC_{50} de MIA (es decir, $IA = IC_{50}$ de SRB inhibidor de CHK1 / IC_{50} de MIA), ambas medidas en células HT29.

5 **Ensayo 4: Eficacia celular en células de carcinoma de colon HT29 o SW620 en combinación con SN38 o gemcitabina**

Se evaluó la capacidad de los compuestos inhibidores de CHK1 para potenciar la citotoxicidad de SN38 (el metabolito activo del inhibidor de topoisomerasa I, irinotecán) y gemcitabina (un antimetabolito) usando un ensayo de sulforrodamina B de 96 horas (SRB, Sigma, n.º de cat. S9012). Se sembraron células HT29 o SW620 a de 1,6 a $3,2 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen de 160 μ l de medio y se dejaron unir durante 36 horas antes del tratamiento. Los ensayos de potenciación implicaron añadir una concentración IC_{50} fija de SRB de gemcitabina o SN38 (determinada usando los métodos en el ensayo 3 anterior) en un volumen de 20 μ l de medio (concentración final 10 x), a cada pocillo por cuadruplicado y mezclando durante 1 minuto. El compuesto de ensayo inhibidor de CHK1 (solución madre 10 mM) se diluyó en serie a partir de una concentración inicial de 50 μ M en medio y se añadieron 20 μ l por pocillo por cuadruplicado para dar un intervalo final de concentración de 5 a 0,039 μ M (8 concentraciones) y se mezcló durante 1 antes de la incubación a 37°C en una atmósfera humidificada a 37°C durante 96 horas (cuatro duplicaciones) antes de la fijación y tinción con SRB. Se incluyeron controles no tratados y los tratados solo con genotóxico y los resultados se expresaron como la concentración de inhibidor de CHK1 necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50% (IC_{50} de potenciación).

Se calculó el índice de potenciación (IP) como una medida de la capacidad del inhibidor de CHK1 para potenciar la citotoxicidad de SN38 o de la gemcitabina y se definió con la relación de la IC_{50} de citotoxicidad del inhibidor de CHK1 solo frente a la IC_{50} de potenciación del inhibidor de CHK1 combinado con el genotóxico (es decir, $IP = IC_{50}$ de SRB inhibidor de CHK1 / IC_{50} de potenciación).

25 **Ensayo 5: Biodisponibilidad oral y farmacocinética en ratones**

Todo el trabajo se realizó conforme a las regulaciones del Home Office según la Ley para Animales (Procedimientos científicos) de 1986 y según las guías de la UKCCCR para experimentación animal.

Los compuestos inhibidores de CHK1 se formularon en DMSO al 10%, Tween 20 al 1% y suero salino estéril al 89%. Se administró por vía intravenosa (iv) y oral (po) 10 mg/kg de compuesto inhibidor de CHK1 a ratones Balb/c hembra (Charles River UK Ltd, Margate, R.U.). Los animales de control recibieron únicamente el vehículo. Se inyectó a grupos de 3 ratones por cada instante. A los 5, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la dosis, se recogió sangre de los ratones mediante punción cardíaca con jeringuillas heparinizadas bajo anestesia (mezcla de halotano/oxígeno). Después de la centrifugación (9000 x g, 2 minutos, 4°C) el plasma se congeló sobre hielo seco y se almacenó a -80°C. Se cortaron los tejidos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las muestras de plasma descongeladas se extrajeron mediante precipitación de proteínas usando 3 volúmenes de metanol que contenía patrón interno. Los patrones de calibración (2 a 10000 nM en plasma) y los QC se prepararon añadiendo a una matriz de plasma en blanco el compuesto inhibidor de CHK1 y extrayéndolos del mismo modo que las muestras de ensayo. Después de la centrifugación, se transfirió el sobrenadante para su análisis. Las muestras de plasma extraídas se analizaron mediante CL-EM-EM en un CL Agilent 1200 o 1290 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar Agilent 6410 para la cuantificación del compuesto inhibidor de CHK1 y el patrón interno. Los compuestos se separaron en una columna analítica C18 Phenomenex Kinetex (50 x 2,1 mm, 2,6 μ m) mantenida a 55°C. La fase móvil consistía en acetato de amonio 10 mM y metanol a un caudal de 0,4 ml/min. Se usó un gradiente de 7 minutos para separar los analitos. Se usó ionización por electropulverización en modo de ión positivo y se detectaron los compuestos mediante RMN controlándose la transición adecuada (por ejemplo, para el compuesto 1 de 380,2 a 320,3, con un voltaje de fragmentador de 154 V y una energía de colisión de 20 V).

El análisis farmacocinético no compartimental (modelos 200 y 201) se llevó a cabo con el programa informático WinNonlin de Pharsight (versión 5.2.1).

50 **Datos biológicos**

Los datos para el compuesto 1 y el compuesto 2, obtenidos usando los ensayos descritos anteriormente, se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2

Compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2
-----------	-------------	-------------

En la siguiente tabla se proporciona una comparación de los datos de IC_{50} de CHK1 (obtenidos mediante el ensayo 1 anterior) para los compuestos 1 y 2 con los datos correspondientes obtenidos para los 16 compuestos similares mostrados en Collins et al., 2009a (obtenidos usando un ensayo DELFIA como se describe en Collins et al.).

Tabla 3

n.º	Compuesto	IC ₅₀ de CHK1 (nM)
	Compuesto 1	1,4
	Compuesto 2	2,1
1	Y-154	1
2	Y-081	2
3	Y-152	2
4	Y-158	2
5	Y-147	4
6	Y-153	4
7	Y-155	5
8	Y-149	10
9	Y-156	10
10	Y-146	11
11	Y-148	13
12	Y-157	15
13	Y-150	17
14	Y-102	20
15	Y-159	23
16	Y-151	24

En la tabla siguiente se proporciona una comparación de los datos de MIA de potencia celular de CHK1 (obtenidos mediante el ensayo 2 anterior) para los compuestos 1 y 2 con los datos correspondientes obtenidos para los 16 compuestos similares mostrados en Collins et al., 2009a.

Tabla 4

n.º	Compuesto	Potencia celular de CHK1, IC_{50} de MIA (nM)	(múltiplo de mejora) Compuesto 1	(múltiplo de mejora) Compuesto 2
	Compuesto 1	30	-	-
	Compuesto 2	18	-	-
1	Y-154	90	~3	~5
2	Y-155	120	~4	~7
3	Y-153	180	~6	~10
4	Y-158	280	~9	~15
5	Y-081	310	~10	~17
6	Y-150	390	~13	~22
7	Y-152	400	~13	~22
8	Y-156	560	~19	~31
9	Y-157	600	~20	~33
10	Y-159	700	~23	~39
11	Y-151	800	~27	~44
12	Y-102	800	~27	~44
13	Y-147	900	~30	~50
14	Y-148	900	~30	~50
15	Y-149	1100	~34	~61
16	Y-146	1500	~50	~83

Es evidente que los compuestos 1 y 2 tienen una sobresaliente potencia celular de CHK1 (ensayo MIA). Es crítica una elevada potencia celular para la inhibición de CHK1 para el desarrollo de un inhibidor de CHK1. Los compuestos 1 y 2 tienen una potencia celular sustancialmente mayor para los efectos mediados por CHK1 que todos los demás 16 compuestos y son aproximadamente 3 veces y 5 veces, respectivamente, más potentes que el siguiente compuesto más potente (Y-154).

En la tabla siguiente se proporciona una comparación de los datos de selectividad celular (obtenidos mediante el ensayo 3 anterior) para los compuestos 1 y 2 con los datos correspondientes obtenidos para los 16 compuestos similares mostrados en Collins et al., 2009a.

Tabla 5

	Compuesto	Selectividad celular (múltiplo)	(múltiplo de mejora) Compuesto 1	(múltiplo de mejora) Compuesto 2
	Compuesto 1	26	-	-
	Compuesto 2	150	-	-
1	Y-155	11	~2,4	~13
2	Y-150	10	~2,6	~15
3	Y-159	9,9	~2,6	~15
4	Y-153	9,2	~2,8	~16
5	Y-154	9,0	~2,9	~17
6	Y-157	6,3	~4,1	~24
7	Y-151	6,0	~4,3	~25

8	Y-156	5,4	~4,8	~28
9	Y-102	4,6	~5,6	~33
10	Y-146	4,5	~5,8	~33
11	Y-148	4,4	~5,9	~34
12	Y-147	4,3	~6,0	~35
13	Y-158	4,3	~6,0	~35
14	Y-149	3,5	~7,4	~43
15	Y-152	3,5	~7,4	~43
16	Y-081	3,5	~7,4	~43

Es evidente que los compuestos 1 y 2 tienen una sobresaliente selectividad celular, medida como la proporción entre la potencia celular de CHK1 (ensayo MIA) y la citotoxicidad inespecífica en un ensayo de inhibición del crecimiento. La selectividad celular para el efecto mediado por CHK1 frente a la citotoxicidad inespecífica es importante para el desarrollo de un inhibidor de CHK1 para maximizar la ventana terapéutica. Los compuestos 1 y 2 tienen una selectividad de aproximadamente 26 veces y aproximadamente 150 veces, respectivamente, mientras que el siguiente compuesto más selectivo tiene una selectividad de solo aproximadamente 11 veces (Y-155).

En la tabla siguiente se proporciona una comparación de los datos de eficacia celular (obtenidos mediante el ensayo 4 anterior) para los compuestos 1 y 2 con los datos correspondientes obtenidos para los 16 compuestos similares mostrados en Collins et al., 2009a.

Tabla 6		
n.º	Compuesto	Eficacia celular + SN38 HT29 (múltiplo)
	Compuesto 1	1,8
	Compuesto 2	n/a
1	Y-157	2
2	Y-150	2
3	Y-156	1,6
4	Y-151	1,5
5	Y-159	1,3
6	Y-081	1,2
7	Y-153	1
8	Y-155	0,9
9	Y-154	0,8
10	Y-152	0,7
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

Tabla 7

n.º	Compuesto	Eficacia celular + gemcitabina SW620 (múltiplo)
	Compuesto 1	17
	Compuesto 2	8,1
1	Y-157	n/a
2	Y-150	4,8

3	Y-156	n/a
4	Y-151	n/a
5	Y-159	n/a
6	Y-081	n/a
7	Y-153	8,6
8	Y-155	n/a
9	Y-154	n/a
10	Y-152	8
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

- Es evidente que los compuestos 1 y 2 tienen una sobresaliente eficacia celular, medida como la capacidad para sensibilizar a las células frente a dos agentes terapéuticos genotóxicos representativos: SN38 y 5 gemcitabina. Es esencial un valor >1 para un compuesto desarrollable (de lo contrario, la acción del compuesto reduce el efecto de la terapia genotóxica).
- El compuesto 1 tiene la potenciación casi más alta para SN38 (aproximadamente 1,8 veces) y la potenciación máxima para gemcitabina (aproximadamente 17 veces), lo que indica una robusta eficacia. El compuesto con mayor potenciación para SN38 es Y-150 (aproximadamente 2 veces), que tiene una potenciación únicamente de aproximadamente 4,8 veces para gemcitabina. El compuesto con mayor potenciación para gemcitabina es 10 Y-153 (aproximadamente 8,6 veces), que no tiene potenciación (es decir, aproximadamente 1 vez) para SN38.
- Además, el compuesto 1 tiene una sobresaliente biodisponibilidad oral en ratones: 100% (comunicada como "105%" en la tabla anterior).

REFERENCIAS

- En el presente documento se cita una serie de publicaciones para describir y divulgar más ampliamente la invención y el estado de la técnica a la que pertenece la invención.
- 15 Almeida et al., 2008, "Pyrazolyl-amino-substituted pyrazines and their use for the treatment of cancer", Publicación Internacional de Patente (PCT) número WO 2008/117050 A1, publicada el 02 de octubre de 2008.
- Balant y Vousden, 2001, "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein", Br. J. Cancer, Volumen 85, págs. 1813-1823.
- 20 Bartek y Lukas, 2003, "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer", Cancer Cell, Volumen 3, págs. 421-429. Brooks et al., 2012, "A potent chk1 inhibitor is selectively toxic in melanomas with high levels of replicative stress", Oncogene, doi:10.1038/onc.2012.72.
- Carson y Lois, 1995, "Cancer progression and p53", Lancet, Volumen 346, págs. 1009-1011.
- 25 Cavelier et al., 2009, "Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype: Potential importance for checkpoint targeting therapy", Cancer Res., Volumen 69, págs. 8652-8661. Cole et al., 2011 "RNAi screen of the protein kinaseome identifies checkpoint kinase 1 (chk1) as a therapeutic target in neuroblastoma", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Volumen 108, págs. 3336-3341.
- Collins et al., 2009a, "Pyrazin-2-yl-2-yl-amine and pyrazin-2-yl-pyrimidin-4-yl-amine compounds and their use", Publicación Internacional de Patente (PCT) número WO 2009/044162 A1, publicada el 09 de abril de 2009.
- 30 Collins et al., 2009b, "Bicycylaryl-aryl-amine compounds and their use", Publicación Internacional de Patente (PCT) número WO 2009/103966 A1, publicada el 27 de agosto de 2009.
- Davies et al., 2011, "Single-agent inhibition of chk1 is antiproliferative in human cancer cell lines *in vitro* and inhibits tumor xenograft growth *in vivo*", Oncol. Res., Vol. 19, págs. 349-363.
- 35 Di Micco et al., 2006, "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyperreplication", Nature, Vol. 444, págs. 638-642.
- Dixon y Norbury, 2002, "Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function", Cell

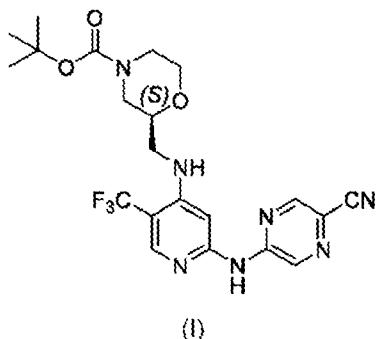
- Cycle, Vol. 1, págs. 362-368.
- Ferrao et al., 2011, "Efficacy of chk inhibitors as single agents in myc-driven lymphoma cells", *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2011.358.
- 5 Greenblatt et al., 1994, "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis", *Cancer Res.*, Vol. 54, págs. 4855-4878.
- Guzi et al., 2011, "Targeting the replication checkpoint using SCH 900776, a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening", *Mol. Cancer Ther.*, Vol. 10, págs. 591-602.
- Höglund et al., 2011, "Therapeutic Implications for the Induced Levels of Chk1 in Myc-Expressing Cancer Cells", *Clin. Cancer Res.*, Vol. 17, págs. 7067-7079.
- 10 Ioannidis et al., 2009, "Discovery of pyrazol-3-ylamino pyrazines as novel JAK2 inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 19, págs. 6524-6528.
- Lainchbury et al., 2012, "Discovery of 3-alkoxyamino-5-(pyridin-2-ylamino)pyrazine-2-carbonitriles as selective, orally bioavailable CHK1 inhibitors", *J. Med. Chem.*, Vol. 55, N.º 22, págs. 10229-10240.
- 15 Li et al., 2007, "Synthesis and in-vitro biological activity of macrocyclic urea CHK1 inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 17, págs. 6499-6504.
- Lin et al., 2005, "Macrocyclic kinase inhibitors", Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º US 2005/0215556 A1 publicada el 29 de septiembre de 2005.
- Liu et al., 2000, "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint", *Genes Dev.*, Vol. 14, págs. 1448-1459.
- 20 Murga et al., 2011, "Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Vol. 18, págs. 1331-1335.
- Sanchez et al., 1997, "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25", *Science*, Vol. 277, págs. 1497-1501.
- 25 Sorensen et al., 2005, "Cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair", *Nat. Cell Biol.*, Vol 7, págs. 195-201.
- Tao et al., 2005, "Macrocyclic kinase inhibitors", Publicación Internacional de Patente (PCT) número WO 2005/047294 A1, publicada el 26 de mayo de 2005.
- Tao et al., 2006, "Chk1 inhibitors for novel cancer treatment", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, Vol. 6, págs. 377-388.
- 30 Tao et al., 2007a, "Macrocyclic ureas as potent and selective CHK1 inhibitors: an improved synthesis, kinome profiling, structure-activity relationships, and preliminary pharmacokinetics", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 17, págs. 6593-6601.
- Tao et al., 2007b, "Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of potent and selective macrocyclic checkpoint kinase 1 inhibitors", *J. Med. Chem.*, Vol. 50, págs. 1514-1527.
- 35 Walton et al., 2010, "The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106", *Mol. Cancer Ther.*, Vol. 9, N.º 1, págs. 89-100.
- Walton et al., 2012, "CCT244747 is a novel potent and selective CHK1 inhibitor with oral efficacy alone and in combination with genotoxic anticancer drugs", *Clin. Cancer Res.*, Vol. 18, N.º 20, págs. 5650-5661.
- 40 Wang et al., 1996, "UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53", *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 8, págs. 956-965.
- Weinert y Hartwell, 1989, "Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Cell Sci. Suppl.*, Vol. 12, págs. 145-148.
- Xiao et al., 2006, "Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy", *Mol. Cancer Ther.*, Vol. 5, págs. 1935-1943.
- 45 Zachos et al., 2003, "Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects", *EMBO J.*, Vol. 22, págs. 713-723.

ES 2 981 584 T3

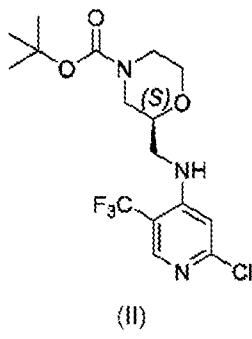
Zhao et al., 2002, "Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation- induced S and G2 checkpoints", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99, págs. 14795-14800.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para fabricar un compuesto de fórmula (I):

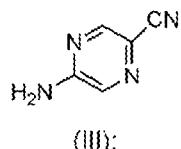


de un compuesto de fórmula (II):



5

y un compuesto de fórmula (III):



donde el proceso comprende:

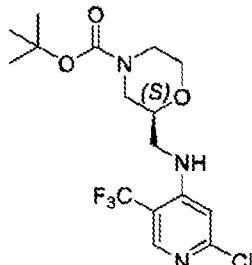
(i) suspender el compuesto de fórmula (II); el compuesto de fórmula (III); rac-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-bifluorofenilo; 10 carbonato de cesio; y tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0); en dioxano anhídrico bajo argón;

(ii) hacer burbujeante argón a través de la suspensión durante 30 minutos;

y

(iii) calentar la suspensión hasta 100°C durante 29 horas.

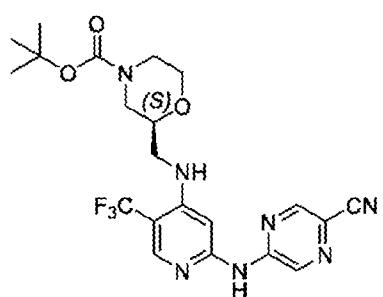
2. Un compuesto de fórmula (II), o una sal, hidrato, o solvato del mismo:



(II).

15

3. Un compuesto de fórmula (I), o una sal, hidrato, o solvato del mismo:



(I).

4. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3 como intermedio en un método de síntesis de un compuesto de la siguiente fórmula, o una sal, hidrato, o solvato del mismo:

