(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 921 008**

(51) Int. CI.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2017 PCT/US2017/012939**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17123588**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2017 E 17738831 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022 EP 3402532**

(54) Título: **Inhibición de la proteína asociada con la ataxia telangiectasia y con Rad3 (ATR)**

(30) Prioridad:

11.01.2016 US 201662277262 P
10.11.2016 US 201662420258 P
09.01.2017 US 201762444172 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2022

(73) Titular/es:

CELATOR PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
3170 Porter Drive
Palo Alto, CA 94304, US

(72) Inventor/es:

DRUMMOND, DARYL C.;
GENG, BOLIN;
KIRPOTIN, DMITRI B.;
TIPPARAJU, SURESH, K.;
KOSHKARYEV, ALEXANDER y
ALKAN, OZAN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Inhibición de la proteína asociada con la ataxia telangiectasia y con Rad3 (ATR)

Campo

Esta descripción se refiere a compuestos y métodos relacionados para inhibir la proteína relacionada con la ataxia telangiectasia y con Rad3 (ATR), incluyendo métodos y compuestos útiles para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

La cinasa asociada con la ataxia-telangiectasia y con Rad3 (ATR) es una serina/treonina proteína cinasa que se cree que está involucrada en los procesos de reparación de daños en el ADN celular y en la señalización del ciclo celular. La cinasa ATR actúa con la cinasa ATM ("ataxia telangiectasia mutada") y otras proteínas para regular la respuesta de una célula al daño del ADN, comúnmente conocida como Respuesta al Daño del ADN ("DDR"). Se cree que la DDR estimula la reparación del ADN, promueve la supervivencia, y detiene la progresión del ciclo celular al activar los puntos de control del ciclo celular, que proporcionan tiempo para la reparación. Sin la DDR, las células son mucho más sensibles al daño del ADN y mueren fácilmente a causa de las lesiones del ADN inducidas por procesos celulares endógenos, tales como la replicación del ADN, o por los agentes exógenos que dañan el ADN, comúnmente usados en la terapia del cáncer.

Se ha demostrado que la interrupción de la función ATR (por ejemplo, por eliminación de genes) promueve la muerte de células cancerosas tanto en ausencia como en presencia de agentes que dañan el ADN. Las mutaciones de ATR se han relacionado con cánceres de estómago y endometrio, y conducen a una mayor sensibilidad a la radiación ionizante y puntos de control del ciclo celular abolidos. ATR es esencial para la viabilidad de las células somáticas, y se ha demostrado que la eliminación de ATR da como resultado la pérdida de las respuestas del punto de control del daño y la muerte celular. Véase Cortez et al., Science 294: 1713-1716 (2001). ATR también es esencial para la estabilidad de los sitios frágiles, y la baja expresión de ATR en pacientes con síndrome de Seckel da como resultado una mayor rotura cromosómica después del estrés de replicación. Véase Casper y col., Am. J. Hum. Genet 75: 654-660 (2004). El complejo de la proteína de replicación A (RPA) recluta ATR, y su proteína de interacción ATRIP, a sitios de daño en el ADN, y la propia ATR media en la activación de la cascada de señalización de CHK1. Véase Zou et al., Science 300:1542-1548 (2003). ATR, al igual que su cinasa ATM de punto de control asociada, fosforila pronto RAD17 en una cascada que es fundamental para la señalización de puntos de control en células con ADN dañado. Véase Bao et al., Nature 411: 969-974 (2001). Se cree que ATR es particularmente esencial en el embrión de mamífero prematuro, para detectar la replicación incompleta del ADN y prevenir la catástrofe mitótica.

Sin embargo, mientras que los agentes de quimioterapia que dañan el ADN y la terapia de radiación ionizante (IR) han brindado beneficios terapéuticos iniciales a los pacientes con cáncer, las terapias existentes han perdido eficacia clínica (por ejemplo, debido a las respuestas de reparación del ADN de las células tumorales). Los efectos *in vivo* de un inhibidor de ATR y un agente que daña el ADN se han mostrado prometedores en el tratamiento selectivo del cáncer en comparación con las células normales, particularmente en el tratamiento de células tumorales deficientes en el control del punto de control G1 (que puede depender más de la ATR para sobrevivir).

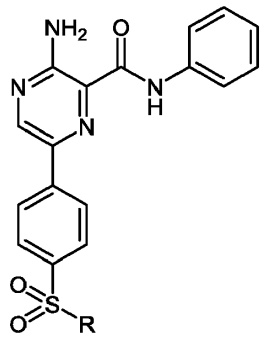
Sigue existiendo la necesidad de desarrollar terapias potentes y selectivas para administrar inhibidores de ATR para el tratamiento del cáncer, ya sea como agentes únicos o como parte de terapias de combinación (por ejemplo, en combinación con quimioterapia y/o radioterapia).

El documento US 8.841.449 B2 describe compuestos útiles como inhibidores de la cinasa ATR.

Sumario

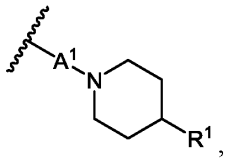
Los solicitantes han descubierto nuevos compuestos químicos útiles para inhibir la cinasa asociada con la ataxia-telangiectasia y con Rad3 (ATR) y el tratamiento del cáncer, y formulaciones de liposoma de ciertos inhibidores de la proteína cinasa ATR que tienen propiedades deseables (por ejemplo, vida media extendida en la circulación sanguínea, y eficacia en el tratamiento de tumores). Las invenciones se basan en parte en el descubrimiento de ciertos compuestos novedosos para inhibir la proteína cinasa ATR, así como en la prolongación de la vida media en plasma y la eficacia antitumoral mejorada de ciertas formulaciones liposomales de compuestos inhibidores de la proteína cinasa ATR.

Los nuevos compuestos de fórmula (I) son útiles para inhibir la cinasa asociada con la ataxia-telangiectasia y con Rad3 (ATR) y el tratamiento del cáncer:



(I),

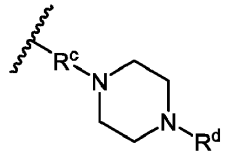
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R es un resto que comprende una amina con un pK_a mayor que 7,0 (preferiblemente mayor que 8,0, y más preferiblemente al menos alrededor de 9,5). Los compuestos de fórmula (I) incluyen preferiblemente uno o más restos de amina terciaria en R, seleccionados para proporcionar la inhibición deseada de ATR y/o las características de estabilidad y formación de liposomas. En algunos ejemplos, R es un resto heterocíclico que comprende un primer nitrógeno terciario sustituido, preferiblemente sustituido con un resto alquilamino que comprende un segundo nitrógeno terciario sustituido. En particular, los compuestos de fórmula (I) incluyen aquellos en los que R puede ser un resto de la fórmula:



en la que A^1 está ausente o es un alquilo (por ejemplo, alquilo de C_1-C_4 (preferiblemente -$(CH_2)_2$-), y R^1 es alquilamino inferior (por ejemplo, C_1-C_4). En una realización, R^1 es (alquilo de C_1-C_4)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, por ejemplo R^1 es -$(CH_2)_2$-$N(CH_3)(CH_3)$. En otra realización, R^1 es NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, por ejemplo R^1 es -$N(CH_2CH_3)(CH_2CH_3)$.

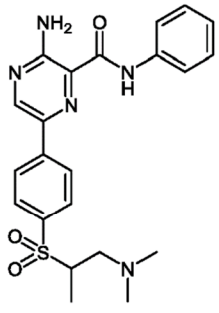
En otra realización de fórmula (I), R es -N(H)(alquilo de C_1-C_4)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, o R es -(G)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, en el que G es alquilo de C_1-C_4, y en el que G puede estar además sustituido con alquilo de C_1-C_4.

En otra realización de fórmula (I), R puede ser un resto de la fórmula:



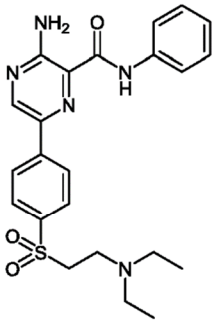
en la que R^C y R^d son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4.

Los ejemplos preferidos incluyen liposomas que comprenden compuestos seleccionados del grupo que consiste en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 o 6:



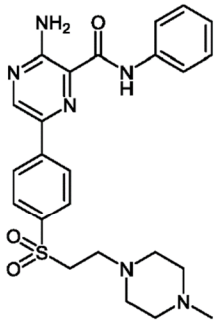
Compuesto 1

MW: 439.53



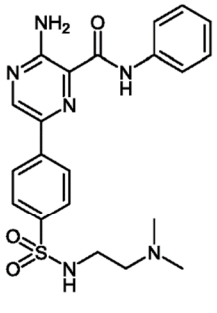
Compuesto 2

MW: 453.56



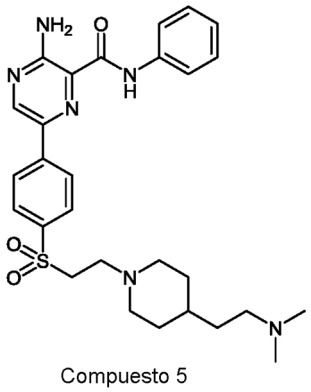
Compuesto 3

MW: 480.59



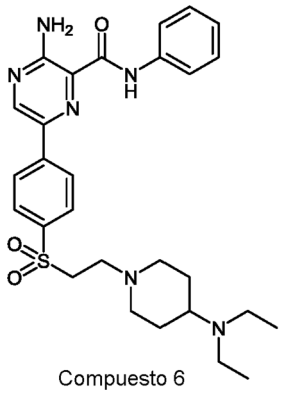
Compuesto 4

MW: 440.52



Compuesto 5

MW: 536.70



Compuesto 6

MW: 536.70

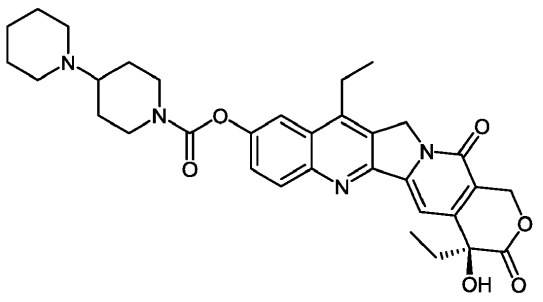
La presente invención proporciona una composición de liposoma que comprende un compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, encapsulado en un liposoma; en el que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o el Compuesto A. El liposoma se puede formar a partir de uno o más lípidos formadores de liposomas (por ejemplo, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)), colesterol y un lípido conjugado con polímero (por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol)-1,2-diestearoil-sn-glicerilo (PEG2000-DSG). El lípido formador de liposomas comprende preferiblemente uno o más fosfolípidos, con la relación de el o los fosfolípidos y el colesterol seleccionada para proporcionar una cantidad deseada de rigidez de la membrana del liposoma al tiempo que se mantiene una cantidad suficientemente reducida de fuga del compuesto de fórmula (I) del liposoma. El tipo y la cantidad de lípido conjugado con polímero se pueden seleccionar para proporcionar niveles deseables de unión a proteínas, estabilidad de liposomas, y tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. En algunos ejemplos, la vesícula liposómica comprende HSPC y colesterol en una relación molar de 3:2. En particular, el liposoma puede comprender una vesícula que consiste en HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar de 3:2:0,15. El compuesto de fórmula (I) se puede atrapar dentro del liposoma con un polianión adecuado, como tal octasulfato de sacarosa. En algunos ejemplos, el liposoma encapsula el compuesto de fórmula (I) y el octasulfato de sacarosa en una relación igual o cercana a la relación estequiométrica del compuesto de fórmula (I) y el octasulfato de sacarosa.

Un ejemplo específico proporciona un liposoma que tiene una vesícula formada por HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar de 3:2:0,15, que encapsula octasulfato de sacarosa y el Compuesto 5. Otro ejemplo proporciona un liposoma que tiene una vesícula formada por HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar 3:2:0,15, que encapsula octasulfato de sacarosa y el Compuesto 5.

Otro ejemplo específico proporciona un liposoma que tiene una vesícula formada a partir de HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar de 3:2:0,15, que encapsula octasulfato de sacarosa y el Compuesto 6.

Otro ejemplo específico proporciona un liposoma que tiene una vesícula formada por HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar de 3:2:0,15, que encapsula octasulfato de sacarosa y el Compuesto A.

Los compuestos inhibidores de ATR y/o las formulaciones de liposoma de los mismos descritos aquí pueden usarse en terapia y métodos de tratamiento. En algunas realizaciones, la terapia es el tratamiento del cáncer. Cuando se usa como terapia, la composición de liposoma se puede usar en un régimen de tratamiento con uno o más compuestos o composiciones (por ejemplo, en combinación con una formulación liposómica de irinotecán



Irinotecán

tal como MM-398). La administración de la composición de liposoma con uno o más compuestos o composiciones puede ser simultánea, separada o secuencial. El uno o más de los otros compuestos o composiciones pueden ser

otros agentes terapéuticos, por ejemplo agentes anticancerígenos adicionales, o pueden ser compuestos que están diseñados para mejorar los efectos secundarios negativos de los agentes terapéuticos.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un primer esquema de reacción química útil en la fabricación de ciertos compuestos descritos aquí.

La FIG. 2 es un segundo esquema de reacción química útil en la fabricación de ciertos compuestos descritos aquí.

La FIG. 3 es un tercer esquema de reacción química útil en la fabricación de ciertos compuestos descritos aquí.

La FIG. 4 es un cuarto esquema de reacción química útil en la fabricación de ciertos compuestos descritos aquí.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la farmacocinética en sangre de los inhibidores de ATR liposomales, como se describe en el Ejemplo 8.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en el modelo de xenoinjerto cervical MS751, como se describe en el Ejemplo 9A.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto cervical C33A, como se describe en el Ejemplo 9A.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto cervical C33A, según el Ejemplo 9A.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en MS751 cervical, según el Ejemplo 9A.

La FIG. 10A y la FIG. 10B son cada uno un gráfico que muestra la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones NCI-H2170 (FIG. 10A) o DMS-114 (FIG. 10B), como se analiza en el Ejemplo 10.

La FIG. 11A y la FIG. 11B son cada uno un gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer que representan la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en NCI-H2170 (FIG. 11A) y DMS-114 (FIG. 11B) en un modelo de xenoinjerto de ratón, como se analiza en el Ejemplo 10.

La FIG. 12A y la FIG. 12B son cada uno un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en NCI-H2170 (FIG. 12A) o DMS-114 (FIG. 12B) en un modelo de xenoinjerto de ratón.

La FIG. 13A y la FIG. 13B son gráficos que muestran la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones Calu-6 (FIG. 13A) o COLO-699 (FIG. 13B), como se describe en el Ejemplo 11.

La FIG. 14A es un gráfico que ilustra la muerte celular en monoterapia in vitro del Compuesto 6 y el Compuesto 5 en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón.

La FIG. 14B es un gráfico que ilustra el efecto del Compuesto 5 y el Compuesto 6 en combinación con tres agentes quimioterapéuticos (Carboplatino, Gemcitabina, Compuesto B).

La FIG. 15 es un gráfico que muestra los valores de desplazamiento de IC_{50} medidos en la línea celular Sum190PT (Cáncer de Mama Triple Negativo, TNBC) para el inhibidor de la proteína cinasa ATR, Compuesto 6 del Ejemplo 2, con y sin diversas concentraciones del Compuesto B.

La FIG. 16A es un gráfico que muestra los valores de desplazamiento de IC_{50} de una combinación del inhibidor de la proteína cinasa ATR, Compuesto 6 del Ejemplo 2, medidos en la línea celular de cáncer MDA-MB-453 TNBC.

La FIG. 16B es un gráfico que muestra los valores de desplazamiento de IC_{50} de una combinación del inhibidor de la proteína cinasa ATR, Compuesto A, medidos en la línea celular de cáncer MDA-MB-453 TNBC.

La FIG. 17 es un análisis de transferencia Western obtenido de células de cáncer de pulmón DMS-114 expuestas a Gemcitabina [16 nM] o a inhibidor de ATR (Compuesto A o Compuesto 5 [1 uM]), solos o en combinación in vitro.

La FIG. 18A-B es un ensayo de crecimiento y muerte celular realizado combinando el Compuesto A y Gemcitabina a diversas concentraciones en células U2OS. Los resultados se comparan con una predicción de crecimiento y muerte celulares con la combinación de los dos compuestos (Fig. 18A). El número de células vivas y apoptóticas también se determina a concentraciones establecidas de Compuesto A (1 μM) y Gemcitabina (0,04 μM) en células USO2 (Fig. 18B).

La FIG. 19 muestra el Compuesto A que se analiza solo y en combinación con SN38 a concentraciones establecidas (1 μM y 0,2 μM, respectivamente) en varias líneas celulares de cáncer de pulmón (NCI-H520 y NCI-H596) y células U2OS, con el número de células monitoreadas a lo largo del tiempo.

La FIG. 20 es un gráfico que ilustra el efecto del Compuesto A y SN38, en combinación y solos, en la línea celular de cáncer de cuello uterino MS751.

Las FIGS. 21A-C demuestran los efectos de combinar el Compuesto A o el Compuesto 5 con Gemcitabina. La Fig. 21A es un mapa de calor que ilustra el efecto de combinar el Compuesto A o el Compuesto 5 con Gemcitabina a diversas concentraciones en las líneas celulares U2OS, H358 y A549. Se muestran imágenes microscópicas de células tratadas con concentraciones establecidas de Compuesto 5 y Gemcitabina, o Compuesto A y Gemcitabina, en células (Fig. 21B). También se muestran ensayos de proliferación de células USO2 y H358 con concentraciones establecidas (Fig. 21C).

Las FIGS. 22A-B ilustran las curvas de crecimiento de las células A549 con el Compuesto A o el Compuesto 5 en combinación con SN38 (Fig. 22A) o solos (Fig. 22B).

La FIG. 23 muestra valores de IC50 (μM) en varias líneas celulares usando una concentración establecida de Gemcitabina con concentraciones variables de Compuesto A o Compuesto 5.

La FIG. 24 muestra un resumen de las líneas celulares de cáncer de pulmón que responden al Compuesto A o al Compuesto 5 en combinación con Gemcitabina o SN38.

Las FIGS. 25A-B muestran diversos inhibidores de ATR analizados por su capacidad para inhibir ATR (en la diana) y ATM (fuera de la diana). La inhibición se da a conocer como IC50 en nM (Fig. 25A). Las cinasas “fuera de la diana” adicionales se analizan también con el Compuesto A o el Compuesto 5 (Fig. 25B).

Las FIGS. 26A-F muestran resultados en la diana con el Compuesto A o el Compuesto 5 en células de cáncer de pulmón A549 (Fig. 26A-B), células de cáncer de pulmón H23 (Fig. 26C-D), y células DMS-114 (Fig. 26E-F). La fosforilación de CHK1 S345, una lectura de la inhibición de ATR, se mide mediante transferencia Western. Cada compuesto también se usa con una concentración fija de Gemcitabina.

Las FIGS. 27A-B muestran un análisis adicional en la diana en las líneas celulares HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC, y DMS-114. Se usa una concentración establecida de SN38 con un intervalo de concentraciones de Compuesto A o Compuesto 5. Se analizan diversos parámetros de actividad en la diana, y se miden mediante transferencia Western (Fig. 27A-B)

La FIG. 28 muestra los perfiles de las etapas del ciclo celular de las células SUM149 24 horas después de la adición de SN38 y el Compuesto A o el Compuesto 5.

La FIG. 29 muestra modelos de xenoinjerto de pulmón DMS-114 usados para medir los efectos de Ls-Compuesto A o Ls-Compuesto 5 en combinación con MM398. Se usa una dosis establecida de MM398 (5 mpk) con dos dosis diferentes de Compuesto A o Compuesto 5 (20 mpk u 80 mpk). Los efectos del tratamiento se evalúan midiendo los niveles de fosforilación de CHK1 S345.

Las FIGS. 30A-C ilustran los efectos de Ls-Compuesto A con MM398 en la línea celular SUM-149. Los efectos del tratamiento se evalúan midiendo los niveles fosforilados de RPA2 (Fig. 30A), DNAPK, CHK1 y γH2AX (Fig. 30B). El Ls-Compuesto 5 también se evalúa sin la combinación de MM398 (Fig. 30C).

La FIG. 31 es un gráfico que muestra la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en el modelo de xenoinjerto de ratones SUM-149.

La FIG. 32 es un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones SUM-149.

FIG. 33 Niveles basales de diversos marcadores farmacodinámicos (PD) asociados con la ruta de respuesta al daño del ADN, cuantificados mediante transferencia Western sobre un panel de líneas celulares.

FIG. 34 Un esquema que ilustra cómo se calcula la puntuación integral para cada pocillo en el ensayo dinámico de viabilidad celular.

FIG. 35 Correlación de la expresión de la proteína MRE11 basal (cuantificada por transferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, en líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

FIG. 36 Correlación de la expresión de la proteína ATM basal (cuantificada por transferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, en líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

FIG. 37 Correlación de la expresión de la proteína NBS basal (cuantificada por transferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, en líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

FIG. 38 Correlación de la expresión de la proteína NBS basal (cuantificada por transferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, en líneas celulares de cáncer de pulmón con deterioro funcional de p53 expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

FIG. 39 Correlación de la expresión de la proteína NBS basal (cuantificada por transferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, en líneas celulares de cáncer de pulmón con deterioro funcional de p53 expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

FIG. 40A-F Cambio, en número de veces, en los marcadores farmacodinámicos de la línea celular cancerosa NCIH1299 tras la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

FIG. 41A-F Cambio, en número de veces, en los marcadores farmacodinámicos de la línea celular cancerosa NCIH460 tras la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

FIG. 42A-F Cambio, en número de veces, en los marcadores farmacodinámicos de la línea celular cancerosa DMS114 tras la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

FIG. 43A-F Cambio, en número de veces, en los marcadores farmacodinámicos de la línea celular cancerosa HCC70 tras la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

FIG. 44A-F Cambio, en número de veces, en los marcadores farmacodinámicos de la línea celular cancerosa MDAMB468 tras posición a la inhibición de ATR y/o SN38.

FIG. 45 Transfererencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa A549 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 46 Transfererencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa NCIH23 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 47 Transfererencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa DMS114 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 48 Transfererencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa U20S después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 49 Transfererencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa NCIH460 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 50 Transferencias de Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular cancerosa HCC827 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

FIG. 51 Transferencias de Western de marcadores farmacodinámicos en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al Compuesto 5 y/o SN38.

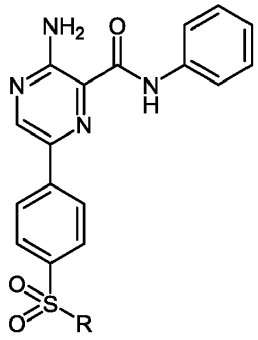
FIG. 52 Cuantificación normalizada de los niveles de Chk1 fosforilada en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al Compuesto 5 y/o SN38 (la señal para cada línea celular se normaliza a la señal en presencia de SN38 solo).

FIG. 53 Cuantificación normalizada de los niveles de RPA2 fosforilada en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al Compuesto 5 y/o SN38 (la señal para cada línea celular se normaliza a la señal en presencia de SN38 solo).

FIG. 54 Cuantificación normalizada de los niveles de γH2AX en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al Compuesto 5 y/o SN38 (la señal para cada línea celular se normaliza a la señal en presencia de SN38 solo).

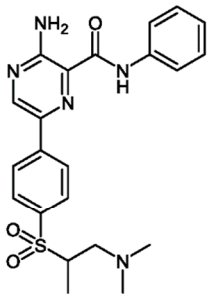
Descripción detallada

Los nuevos compuestos para inhibir la proteína cinasa ATR se describen mediante la fórmula (I):



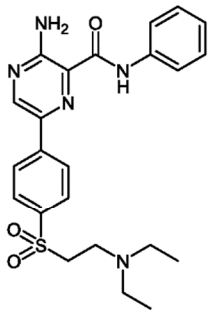
(I),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R es un resto que comprende una amina con un pK_a mayor que 7,0 (preferiblemente mayor que 8,0, y más preferiblemente al menos alrededor de 9,5), seleccionada para proporcionar una vida media en plasma de al menos alrededor de 5 horas en ratones (obtenida según el Ejemplo 7). Preferiblemente, R incluye un resto alquilo sustituido con amina con 4-12 carbonos. R se puede seleccionar para incluir solamente una combinación de amina terciaria sustituida y grupos alquilo hidrogenados. R incluye preferiblemente además una amina sustituida con alquilo terciario que tiene un pK_a de al menos 7, pero lo más lo preferible al menos alrededor de 9,5 (por ejemplo, un pK_a de alrededor de 9,5-10,5). Los ejemplos de compuestos de fórmula (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyen los Compuestos 1-6 (véanse los ejemplos 1-6):



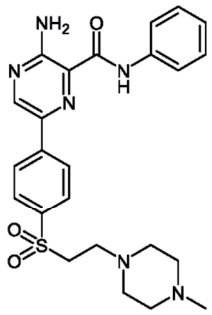
Compuesto 1

MW: 439.53



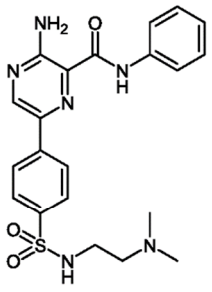
Compuesto 2

MW: 453.56



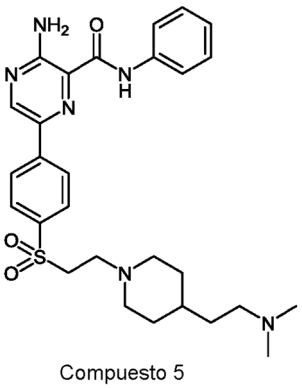
Compuesto 3

MW: 480.59



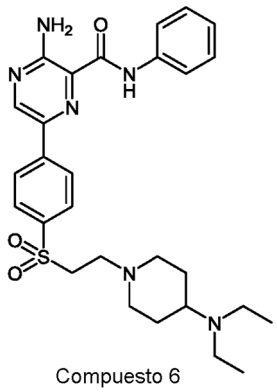
Compuesto 4

MW: 440.52



Compuesto 5

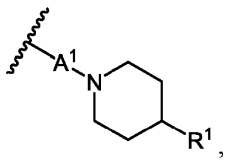
MW: 536.70



Compuesto 6

MW: 536.70

Los compuestos de fórmula (I) incluyen preferiblemente uno o más restos de amina terciaria en R, seleccionados para proporcionar la inhibición deseada de ATR y/o las características de estabilidad y formación de liposomas. En algunos ejemplos, R es un resto heterocíclico que comprende un primer nitrógeno terciario sustituido, preferiblemente sustituido con un resto alquilamino que comprende un segundo nitrógeno terciario sustituido. En particular, los compuestos de fórmula (I) incluyen aquellos en los que R puede ser un resto de la fórmula:

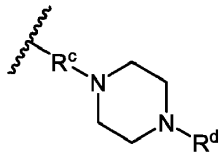


,

en la que A^1 está ausente o es un alquilo (por ejemplo, alquilo de C_1-C_4 (preferiblemente -$(CH_2)_2$-), y R^1 es alquilamino inferior (por ejemplo, C_1-C_4). En una realización, R^1 es (alquilo de C_1-C_4)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, por ejemplo R^1 es -$(CH_2)_2$-$N(CH_3)(CH_3)$. En otra realización, R^1 es NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, por ejemplo R^1 es -$N(CH_2CH_3)(CH_2CH_3)$.

En otra realización de fórmula (I), R es -N(H)(alquilo de C_1-C_4)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, o R es -(G)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4, en el que G es alquilo de C_1-C_4, y en el que G puede estar además sustituido con alquilo de C_1-C_4.

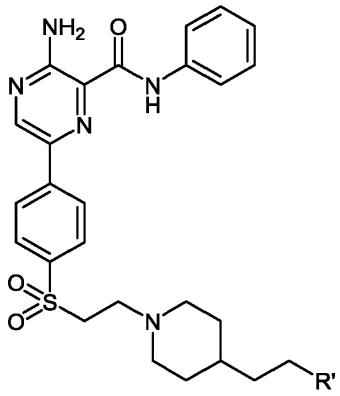
En otra realización de fórmula (I), R puede ser un resto de la fórmula:



en la que R^C y R^d son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4.

Los ejemplos preferidos incluyen liposomas que comprenden compuestos seleccionados del grupo que consiste en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 anteriores. En algunos ejemplos, el compuesto es el compuesto 5 o el compuesto 6.

El compuesto de fórmula (I) puede tener la estructura química de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que R' es una amina sustituida con alquilo terciario que tiene un pK_a de alrededor de 9,5 o mayor:



(Ia).

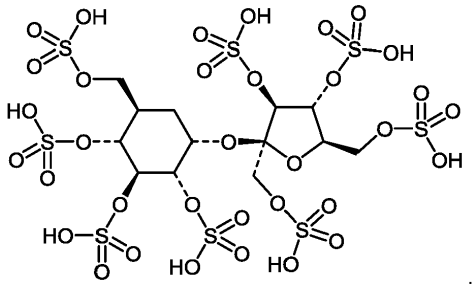
Los ejemplos de compuestos de fórmula (Ia) incluyen el compuesto 5 descrito aquí (por ejemplo, Ejemplos 1). En una realización de fórmula (Ia), R' es NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo de C_1-C_4.

Las formulaciones de liposoma de compuestos inhibidores de la proteína cinasa ATR (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 7) pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas deseables, tales como una vida media plasmática mejorada de 5 horas o más en el modelo de ratón descrito en el Ejemplo 8. Los liposomas normalmente comprenden vesículas que contienen una o más bicapas lipídicas que encierran un interior acuoso. Las composiciones de liposoma normalmente incluyen liposomas en un medio, tal como un fluido acuoso exterior al liposoma. Los lípidos de liposomas pueden incluir componentes lipídicos anfifílicos que, al entrar en contacto con un medio acuoso, forman espontáneamente membranas bicapa, tales como fosfolípidos, por ejemplo fosfatidilcolinas. Los liposomas también pueden incluir componentes que hacen más rígida a la membrana, tales como esteroles, por ejemplo colesterol. En algunos casos, los liposomas también incluyen lípidos conjugados con polímeros hidrofílicos, tales como derivados de lípidos con polietilenglicol (PEG), que pueden reducir la tendencia de los liposomas a agregarse y también tener otros efectos beneficiosos.

La formulación de liposoma puede incluir un compuesto de fórmula (I) encapsulado con un polianión (por ejemplo, un azúcar polianionizado tal como octasulfato de sacarosa, o un poliol polianionizado adecuado) en una vesícula unilaminar formada a partir de uno o más lípidos formadores de liposomas (por ejemplo, fosfatidilcolina de soja (HSPC)), colesterol y un lípido conjugado con polímero (por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol)-1,2-diestearoil-sn-glicerilo (PEG2000-DSG). El lípido formador de liposomas preferiblemente comprende uno o más fosfolípidos, con la relación del fosfolípido (o fosfolípidos) y el colesterol seleccionada para proporcionar una cantidad deseada de rigidez de la membrana del liposoma al tiempo que se mantiene una cantidad suficientemente reducida de fuga del compuesto de fórmula (I) del liposoma.

Los liposomas tienen típicamente el tamaño en un intervalo micrométrico o submicrométrico, y son bien reconocidos por su capacidad para transportar sustancias farmacéuticas, incluyendo fármacos contra el cáncer, tal como irinotecán, y para cambiar sus propiedades farmacéuticas de diversas formas beneficiosas. Los métodos para preparar y caracterizar composiciones farmacéuticas de liposoma son conocidos en el campo (véase, por ejemplo, Lasic D. Liposomes: From physics to applications, Elsevier, Amsterdam 1993; G. Grerоriadis (ed.), Liposome Technology, 3ª edición, vol. 1-3, CRC Press, Boca Ratón, 2006; Hong et al., patente US 8.147.867).

En algunos ejemplos (por ejemplo, Ejemplo 7), las composiciones inhibidoras de la proteína cinasa ATR pueden incluir un liposoma que comprende un compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR encapsulado en un liposoma con polianión, tal como un azúcar polisulfatado (por ejemplo, octasulfato de sacarosa). Sucrosofato, un éster de sulfato de sacarosa totalmente sustituido que tiene, en su forma totalmente protonada, la siguiente estructura:



El sucrosofato también se conoce como octasulfato de sacarosa o sacarooctasulfato (SOS). Los métodos para preparar sucrosofato en forma de diversas sales, por ejemplo sales de amonio, sodio o potasio, son bien conocidos en el campo (por ejemplo, patente US 4.990.610).

Los liposomas inhibidores de la proteína cinasa ATR se pueden preparar en múltiples etapas, que comprenden la formación de un liposoma que contiene TEA, seguido de la carga de un compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR (por ejemplo, el Compuesto A o un compuesto de fórmula (I)) en el liposoma a medida que la TEA sale del liposoma. Por ejemplo, los liposomas inhibidores de la proteína cinasa ATR se pueden preparar mediante un procedimiento que incluye las etapas de (a) preparar un liposoma que contiene trietilamina (TEA) como una sal de trietilamonio de sucrosofato (TEA-SOS), y (b) posteriormente poner en contacto el liposoma TEA-SOS con irinotecán en condiciones eficaces para que el irinotecán entre en el liposoma y permita que una cantidad correspondiente de TEA salga del liposoma (agotando o reduciendo así el gradiente de concentración de TEA a través del liposoma resultante).

La primera etapa puede incluir la formación del liposoma que contiene TEA-sucrosofato hidratando y dispersando los lípidos del liposoma en la disolución de TEA-sucrosofato. Esto se puede realizar, por ejemplo, disolviendo los lípidos, incluyendo HSPC y el colesterol, en etanol calentado, y dispersando la disolución lipídica disuelta y calentada en la disolución acuosa de TEA-sucrosofato a una temperatura por encima de la temperatura de transición (T_m) del lípido del liposoma, por ejemplo 60ºC o más. La dispersión de lípidos se puede formar en liposomas que tienen un tamaño promedio de 75-125 nm (tal como 80-120 nm, o en algunas realizaciones, 90-115 nm), mediante extrusión a través de membranas de policarbonato de poros grabados, con el tamaño de poro definido, por ejemplo 100 nm. El TEA-sucrosofato puede incluir al menos 8 equivalentes molares de TEA por cada equivalente molar de sucrosofato, para obtener una disolución que puede tener una concentración de alrededor de 0,40-0,50 N y un pH (por ejemplo, alrededor de 6,5) que se selecciona para evitar la degradación inaceptable del fosfolípido de liposoma durante las etapas de dispersión y extrusión (por ejemplo, un pH seleccionado para minimizar la degradación del fosfolípido de liposoma durante estas etapas). Luego, el TEA-SOS no atrapado se puede eliminar de la dispersión de liposoma, por ejemplo mediante diálisis, cromatografía en gel, intercambio iónico, o ultrafiltración, antes de la encapsulación del fármaco. Los liposomas resultantes pueden contener sucrosofato inhibidor de la proteína cinasa ATR. Estos liposomas inhibidores de ATR se pueden estabilizar cargando suficiente fármaco en los liposomas para reducir la cantidad de TEA en la composición de liposoma resultante hasta un nivel que dé como resultado menos de un nivel máximo determinado de formación de liso-PC después de 180 días a 4ºC, o menos de un nivel máximo dado de tasa de acumulación de liso-PC en la composición de liposoma durante el almacenamiento en un refrigerador a alrededor de 4ºC o, más comúnmente, a 5 ± 3ºC, medido, por ejemplo, en mg/ml/mes, o % de conversión de PC en un liso-PC durante una unidad de tiempo, tal como % mol de liso-PC/mes. A continuación, el TEA intercambiado de los liposomas al medio externo durante el procedimiento de carga, junto con cualquier inhibidor de ATR no atrapado, normalmente se elimina de los liposomas mediante cualquier procedimiento conocido adecuado (por ejemplo, cromatografía en gel, diálisis, diafiltración, intercambio iónico, o ultrafiltración). El medio externo de liposomas se puede cambiar por un fluido isotónico inyectable (por ejemplo, una disolución isotónica de cloruro de sodio), amortiguado al pH deseado.

La eficacia antitumoral de diversas formulaciones de liposomas que comprenden compuestos inhibidores de la proteína cinasa ATR encapsulados en liposomas se evaluó en líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano (por ejemplo, línea celulares MS751, C33A y SiHa, como se muestra en el Ejemplo 9), y diversas líneas celulares de cáncer de pulmón, incluyendo la línea celular de carcinoma de células escamosas del pulmón (por ejemplo, línea celular NCI-H2170 en el Ejemplo 10), línea celular de carcinoma microcítico de pulmón (por ejemplo, línea celular DMS-114 en el Ejemplo 10), y líneas celulares humanas Calu-6 y COLO-699 (Ejemplo 11).

Haciendo referencia a las FIGs. 6-9 y el Ejemplo 9, se evaluó una formulación de liposoma del inhibidor de ATR Compuesto A (Ejemplo 7) frente a tres líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano en un modelo de xenoinjerto de ratón (Ejemplo 9A), sola y en combinación con la formulación de liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B). Se observó un mayor volumen tumoral a lo largo del tiempo para la formulación del Compuesto A liposomal del Ejemplo 7 en comparación con el experimento de control para 2 de las 3 líneas celulares de cáncer de cuello uterino (MS571 y C33A). Sin embargo, la administración del liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B) en combinación con la formulación de liposoma del Compuesto A (Ejemplo 7) dio como resultado una mayor supresión del volumen tumoral en las tres líneas celulares de cáncer de cuello uterino que la administración de MM398 solo o el Compuesto A liposomal solo.

Haciendo referencia a las FIGs. 10A-10B y a las FIGs. 11A-11B, se evaluó una formulación de liposoma del inhibidor de ATR Compuesto 5 de fórmula (I) y fórmula (Ia) (el compuesto del Ejemplo 1 formulado como un liposoma como se describe en el Ejemplo 7) frente a dos líneas celulares de cáncer de pulmón en un modelo de xenoinjerto de ratón (Ejemplo 10), sola y en combinación con la formulación de liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B). Haciendo referencia a la FIG. 10A y la FIG. 10B, la administración de la formulación de liposoma del Compuesto 5 redujo el volumen del tumor en cada línea celular evaluada en comparación con el experimento de control en el Ejemplo 10, la combinación de MM398 y la composición de liposoma del Compuesto 5 del Ejemplo 7 redujo el volumen del tumor en el modelo de ratón a un grado mayor que cualquiera de los compuestos administrados independientemente del otro. De manera similar, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer presentadas en el Ejemplo 10 (FIG. 11A y FIG. 11B) demuestran una mayor supervivencia en los ensayos de xenoinjerto de cáncer de pulmón de ratón cuando se administró una combinación del liposoma MM398 de irinotecán del Ejemplo 9B en combinación con la formulación de liposoma del Compuesto 5 del Ejemplo 7 usando dos líneas celulares diferentes.

Haciendo referencia a la FIG. 12A y la FIG. 12B, en el Ejemplo 10 se evaluó la tolerabilidad de diversas formulaciones de liposoma de compuestos inhibidores de la proteína cinasa ATR. Con referencia a la FIG. 12A, la disminución del peso corporal del ratón evaluada en el modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 fue más baja a lo largo del tiempo para la formulación de liposoma del Compuesto 5 (Ejemplo 7), en comparación con el liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B), el control, o la combinación de la formulación de liposoma del Compuesto 5 en combinación con MM398. Haciendo referencia a la FIG. 12B, la disminución del peso corporal del ratón evaluada en el modelo de xenoinjerto de ratón DMS-114 fue más baja a lo largo del tiempo para la combinación de la formulación de liposoma del Compuesto 5 en combinación con MM398, en comparación con la formulación de liposoma del Compuesto 5 (Ejemplo 7), o el liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B) administrado de forma independiente.

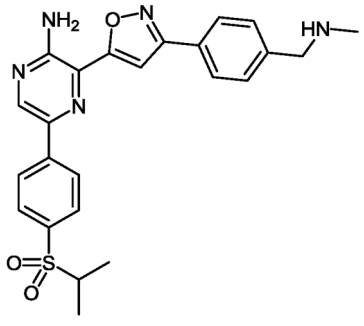
Haciendo referencia a la FIG. 13A y la FIG. 13B, la administración de una combinación del liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B) con la formulación de liposoma del inhibidor de la proteína cinasa ATR, Compuesto 5, dio como resultado la mayor reducción en el volumen del tumor en las líneas celulares Calu-6 como COLO699 en modelos de xenoinjerto de ratones, en comparación con el control, la administración del liposoma de irinotecán MM398 solo, la administración de la formulación de liposoma del Compuesto A (Ejemplo 7), o la combinación del liposoma de irinotecán MM398 (Ejemplo 9B) con la formulación de liposoma del Compuesto A (Ejemplo 7).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran algunas realizaciones de la invención. Los ejemplos y preparaciones que siguen se proporcionan para permitir que los expertos en la técnica entiendan más claramente y pongan en práctica estas y otras realizaciones de la presente invención. No deben considerarse limitativos del alcance de la invención, sino meramente ilustrativos y representativos de la misma.

El péptido ATR se puede expresar y aislar usando una variedad de métodos conocidos en la bibliografía (véase, por ejemplo, Ünsal-Kaçmaz et al, PNAS 99: 10, págs. 6673-6678, 14 de mayo de 2002; véase también Kumagai et al. Cell 124, págs. 943-955, 10 de marzo, 2006; Unsal-Kacmaz et al. Molecular and Cellular Biology, febrero de 2004, págs. 1292-1300; y Hall-Jackson et al. Oncogene 1999, 18, 6707-6713).

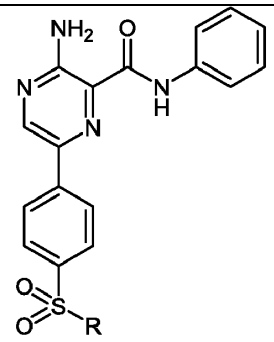
El compuesto A se puede obtener mediante métodos descritos (por ejemplo) en la publicación WO2010/071827A1 (publicada el 24 de junio de 2010). La estructura del Compuesto A es la siguiente:



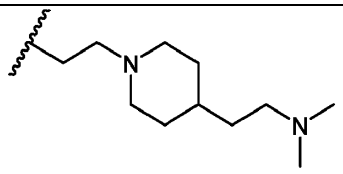
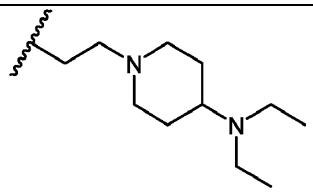
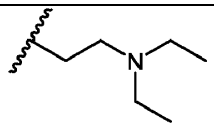
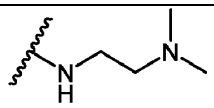
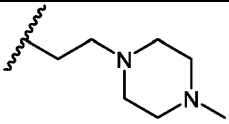
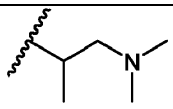
Compuesto A

Diversos compuestos de fórmula (I) se pueden preparar como se describe aquí, y se resumen en la tabla siguiente.

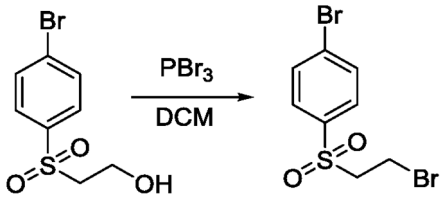
Tabla 1: Compuestos seleccionados de Fórmula (I)



(I)

Compuesto	R	Ejemplo
Compuesto 5		1
Compuesto 6		2
Compuesto 2		3
Compuesto 4		4
Compuesto 3		5
Compuesto 1		6

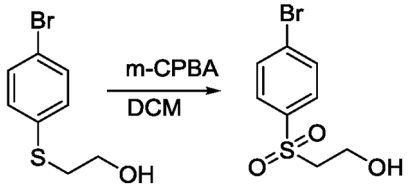
Los ejemplos 1, 2, 3 y 6 se prepararon en un acoplamiento cruzado Suzuki en un solo recipiente usando éster de boro generado in situ mostrado en el Esquema 1 de la FIG. 1. Haciendo referencia a la FIG. 1, la síntesis del Intermedio 3: 1-bromo-4-(2-bromoetilsulfonil)benceno se puede obtener como se describe a continuación.



Intermedio 2 Intermedio 3

A una disolución del Intermedio 2 (35 g, 133 mmol) en DCM (400 ml) se añadió, gota a gota, PBr_3 (40 g, 146 mmol) a 0ºC. Después, la mezcla se agitó a ta (temperatura ambiente) durante la noche. Se añadió agua (15 ml) para paralizar la reacción. Después, el resultante se lavó con agua (120 ml) y salmuera (120 ml). La fase orgánica se concentró para dar 20 g de bruto 3 como aceite amarillo, que se usó en el etapa siguiente sin más purificación.

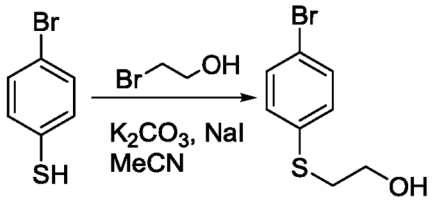
Haciendo referencia a la FIG. 1, la síntesis del intermedio 2 se puede realizar como se describe a continuación:



Intermedio 1 Intermedio 2

A una disolución del Intermedio 1 (45 g, 194 mmol) en DCM (500 ml) se añadió m-CPBA (134 g, 776 mmol) a ta en varios lotes. Después, la mezcla se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, y se añadió DCM (500 ml) para lavar el sólido. El filtrado se lavó con NaOH (1 M, 300 ml x 3) y salmuera (300 ml). La capa orgánica se concentró hasta sequedad para dar 36 g de 2 (70%) como un sólido blanco.

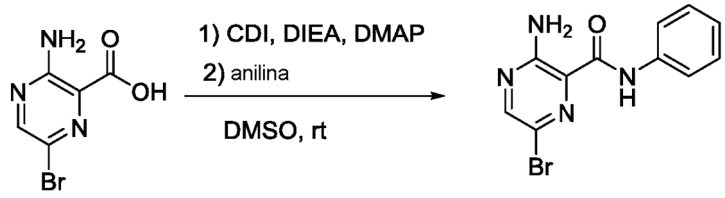
Haciendo referencia a la FIG. 1, la síntesis del intermedio 1 se puede realizar como se describe a continuación.



Intermedio 1

A una disolución de 4-bromobencenotiol (45 g, 238 mmol) en MeCN (600 ml) se añadió K_2CO_3 (60 g, 476 mmol) y NaI (36 g, 238 mmol). La mezcla se agitó a ta durante 10 minutos. Después, se añadió gota a gota 2-bromoetanol. Tras la adición, la mezcla se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 45 g de 1 (81%) como un aceite de color amarillo claro.

El Bloque B se puede preparar según el esquema 2 de la FIG. 2. Haciendo referencia a la FIG. 2, la síntesis del Bloque B se puede realizar como se describe a continuación.

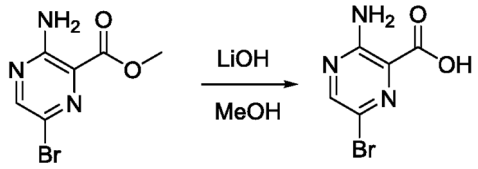


Intermedio 6 Bloque B

A una disolución del Intermedio 6 (6,0 g, 27,4 milimoles) en DMSO (30 ml) se añadió CDI (8,9 g, 54,8 mmol), DIPEA (3,8 g, 30,1 mmol) y DMAP (0,17 g, 1,37 mmol). La disolución se agitó a ta durante 4 horas. Se añadió anilina (2,5 g, 27,4 mmol), y la mezcla se agitó a ta durante la noche. Se añadió agua, y el sólido formado se recogió por filtración. El producto bruto se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 2,5 g del Bloque B (31%) como un sólido amarillo.

LC-MS (M+1): 293,2; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ10,28 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,78 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,74 (s, 2H), 7,36 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 7,13 (t, J = 7,6 Hz, 1H),

Haciendo referencia de nuevo a la FIG. 2, la síntesis del Intermedio 6 se puede realizar como se describe a continuación.

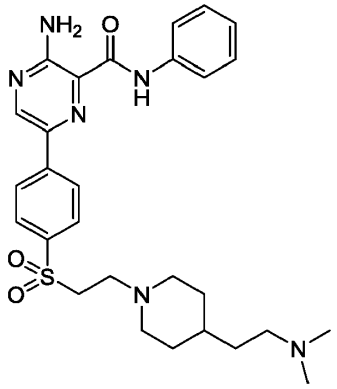


Intermedio 6

A la disolución de 3-amino-6-bromopirazina-2-carboxilato de metilo (10,0 g, 43,1 mmol) en MeOH (70 ml) se añadió una disolución de LiOH (9,0 g, 215 mmol) en agua (70 ml). La mezcla se agitó a 90ºC durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a ta y se acidificó a pH = 4~5 con HCl (2 M). La mezcla se filtró para dar 7,4 g de 6 (79%) como un sólido amarillo.

LC-MS (M+1): 218,0; 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8,39 (s, 1H), 7,59 (br, 2H),

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 5 (3-amino-6-(4-((2-(4-(2-(dimetilamino)etil)piperidin-1-il)etil)sulfonil)fenil)-N-fenilpirazina-2-carboxamida)

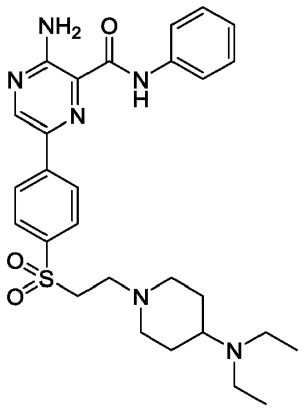


Masa exacta: 536,26; Peso molecular: 536,70; Compuesto 5; Más básico; 143 mg; Rendimiento 8,2%; pK_a 10,00.

A una disolución de 2-(1-(2-((4-bromofenil)sulfonil)etil)piperidin-4-il)-N,N-dimetiletan-1-amina (Bloque A1) (261 mg, 0,648 mmol) en dioxano anhidro (3 ml) se añadió acetato de potasio (191 mg, 1,944 mmol) y bis(pinacolato) diborano (246 mg, 0,971 mmol), el recipiente de reacción se desgasificó repitiendo el ciclo de vacío/nitrógeno, y entonces se añadió $Pd(dppf)_2Cl_2$. CH_2Cl_2 (53 mg, 0,0648 mmol), se desgasificó nuevamente, y la reacción se calentó a 90ºC durante 2 horas bajo nitrógeno. Después, la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, y se añadió 3-amino-6-bromo-N-fenilpirazina-2-carboxamida (Bloque B), K_2CO_3 2M (1 ml), y se desgasificó y se purgó con nitrógeno. Se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (75 mg, 0,0648 mmol). La reacción se calentó a 100ºC durante 4 horas. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, y se diluyó con acetato de etilo y se lavó tres veces con salmuera, y la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4. Tras eliminar el disolvente en el evaporador rotatorio, se obtuvo un producto bruto residual de aceite oscuro, y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Reveleris Flash Chromatography System) usando metanol al 0-15% en diclorometano como eluyente. El producto deseado se obtuvo como un sólido amarillo (149 mg, rendimiento 43%). MS (M+H)+ 537; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10,45 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,49 (d, 2H, 6,8Hz), 7,95 (d, 2H, 6,8Hz), 7,88 (s, br, 2H), 7,81 (d, 2H, 8,8Hz), 7,40 (t, 2H, 7,2Hz), 7,18(t, 1H, 7,2Hz), 3,53 (t, 2H, 7,2Hz), 2,64 (d, 2H, 11,6 Hz), 2,55 (t, 2H, 7,2Hz), 2,05 (m, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,17 (m, 2H), 1,42 (d, 2H, 12,0Hz), 1,18 (m, 3H), 0,78 (m, 2H),

Masa de alta resolución (espectrómetro de masas Thermo ScientificTM Q ExactiveTM hybrid quadrupole-Orbitrap): Calculado para $C_{28}H_{36}N_6O_3S$ + protón (1,00728) = 537,2642; m/z teórico de un solo ion cargado: 537,2642; Encontrado: 537.2636.

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 6 (3-amino-6-(4-((2-(4-(dietilamino)piperidin-1 il)etil)sulfonil)fenil)-N-fenilpirazin-2-carboxamida)

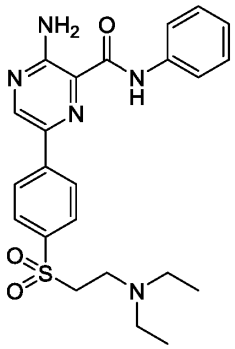


Masa exacta: 536,26; Peso molecular: 536,70; Compuesto 6; Más básico; 53 mg; Rendimiento 11,1%; pK_a 9,81.

El ejemplo 2 se preparó de manera similar usando el Bloque A2 (1-(2-((4-bromofenil)sulfonil)etil)-N,N-dietilpiperidin-4-amina); se obtuvo un sólido amarillo (52 mg, rendimiento 24%). MS (M+H)+ 537; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10,45 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,51 (d, 2H, 8,4Hz), 7,94 (d, 2H, 8,8Hz), 7,87 (s, br, 2H), 7,79 (d, 2H, 8,8Hz), 7,42 (t, 2H, 8,4Hz), 7,18(t, 1H, 7,2Hz), 3,54 (t, 2H, 6,4Hz), 2,65 (d, 2H, 11,2 Hz), 2,56 (t, 2H, 6,4Hz), 2,20 (q, 4H, 6,8 Hz), 1,71 (t, 2, 10,4 Hz), 1,33 (d, 2H, 12,4Hz), 0,85 (qd, 2H, 12,4 Hz), 0,74(t, 6H, 7,2 Hz).

1-(2-((4-bromofenil)sulfonil)etil)-N,N-dietilpiperidin-4-amina (Bloque A2) se preparó de manera similar usando la 4-dietilaminopiperidina correspondiente. Se obtuvo un aceite incoloro (661 mg, 47% de rendimiento), MS (M+H)+ 403, 405.

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 2 (3-amino-6-(4-((2-(dietilamino)etil)sulfonil)fenil)-N fenilpirazin-2-carboxamida)

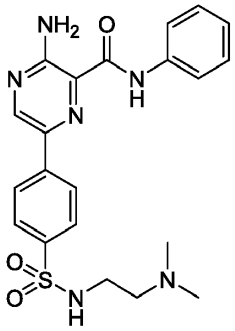


Masa exacta: 453,18; Peso molecular: 453,56; Compuesto 2; Menos básico; 98 mg; Rendimiento 7,7%; pK_a 7,46.

El compuesto del ejemplo 3 se preparó de manera similar usando el intermedio Bloque A3, 2-((4-bromofenil)sulfonil)-N,N-dietiletan-1-amina; se obtuvo un sólido amarillo (98 mg, rendimiento 11%). MS (M+H)+ 454; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10,46 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,51 (d, 2H, 6,8Hz), 7,98 (d, 2H, 6,8Hz), 7,88 (s, br, 2H), 7,81 (d, 2H, 8,8Hz), 7,41 (t, 2H, 7,2Hz), 7,17(t, 1H, 7,2Hz), 3,48 (dd, 2H, 6,8Hz), 2,73 (m, 2H), 2,33 (q, 4H, 6,8Hz), 0,81 (t, 6H, 6,8Hz).

El Bloque A3 (2-((4-bromofenil)sulfonil)-N,N-dietiletan-1-amina) se preparó de manera similar usando la 4-dietilamina correspondiente. Se obtuvo un aceite incoloro (1,42 g, 73% de rendimiento), MS (M+H)+ 320, 322

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 4 (3-amino-6-(4-(((2-(dimetilamino)etil)-λ^2-azanil)sulfonil)fenil)-N-fenilpirazin-2-carboxamida)

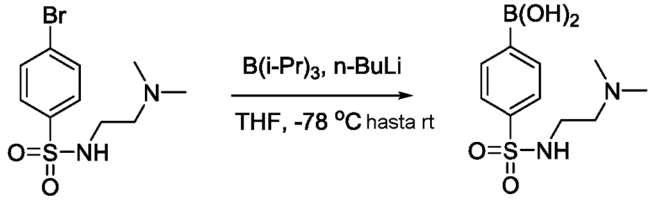


Masa exacta: 439,16; Peso molecular: 439,51; Compuesto 4; pK_a 8,36.

El compuesto 4 se puede preparar como se muestra en el esquema 3 de la FIG. 3. A una mezcla de Bloque B (150 mg, 0,51 mmol), Bloque F (153 mg, 0,56 mmol) y Na_2CO_3 (216 mg, 2,0 mmol) en tolueno/etanol/agua (2 ml/2 ml/2 ml) se añadió $Pd(dppf)Cl_2$ (30 mg). La mezcla se agitó a 75ºC en atmósfera de argón durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante prep-HPLC para proporcionar 100 mg de TM4 (45%) como un sólido blanco.

LC-MS (M+1): 441,4; ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8,88 (s, 1H), 8,33 (dd, J = 6,8 Hz, 1,6 Hz, 2H), 8,00 (dd, J = 6,8 Hz, 1,6 Hz, 2H), 7,80 (dd, J = 8,4 Hz, 1,2 Hz, 2H), 7,41 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,19 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 3,10 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,73 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,46 (s, 6H).

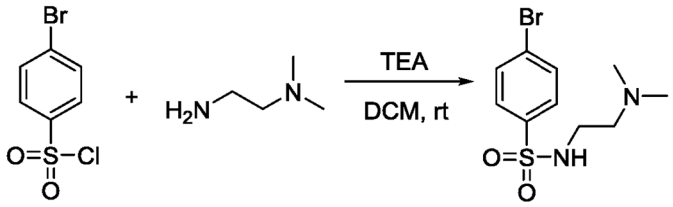
Haciendo referencia de nuevo al Esquema 3 en la FIG. 3, la síntesis del Bloque F se puede realizar como se describe a continuación.



A una disolución del Intermedio 7 (10,0 g, 32,6 mmol) en THF (200 ml) a -78ºC en atmósfera de argón se añadió B(i-Pr)$_3$ (30,6 g, 163 mmol). Después, se añadió gota a gota n-BuLi (2,5 M, 65 ml). La mezcla se agitó a -78ºC durante 2 horas, y luego a ta durante otras 16 horas. Se añadió agua para paralizar la reacción. La mezcla se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó por prep-HPLC para producir 5,2 g de Bloque F (59%) como un sólido blanco.

LC-MS (M+1): 273,4; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,90-7,45 (m, 4H), 2,91 (s, 2H), 2,69 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,18 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,03 (s, 6H).

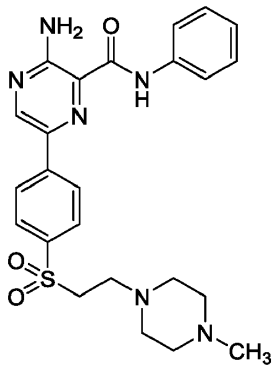
Haciendo referencia de nuevo al Esquema 3 en la FIG. 3, la síntesis del Intermedio 7 se puede realizar como se describe a continuación.



Intermedio 7

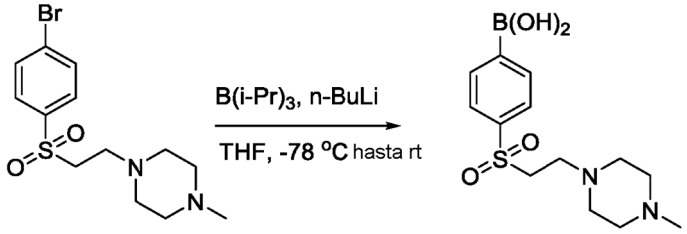
A una disolución de cloruro de 4-bromobenceno-1-sulfonilo (20 g, 78,3 mmol) en DCM (300 ml) a 0ºC se añadió TEA (22 ml, 158 mmol), seguido de N,N'-dimetiletano-1,2-diamina (8,3 g, 94,0 mmol). La disolución resultante se agitó a ta durante 1 hora, y entonces se diluyó con DCM (300 ml). La disolución se lavó con agua (200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 17,0 g de 7 (71%) como un sólido blanquecino.

Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 3 (3-amino-6-(4-((2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)sulfonil)fenil)-N-fenilpirazin-2-carboxamida)



Masa exacta: 480,19; Peso molecular: 480,59; Compuesto 3; pK_a 7,73.

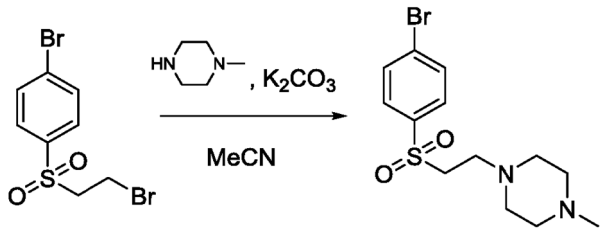
El compuesto del Ejemplo 5 se puede obtener mediante el Esquema 4 que se muestra en la FIG. 4. El Intermedio 5 en el Esquema 4 se puede obtener como se describe a continuación.



Intermedio 4 Intermedio 5

A una disolución del Intermedio 4 (1,7 g, 5,0 mmol) en THF (30 ml) a -78ºC en atmósfera de argón se añadió $B(i\text{-}Pr)_3$ (4,7 g, 25 mmol). Después, se añadió gota a gota n-BuLi (2,5 M, 10 ml). La mezcla se agitó a -78ºC durante 2 horas, y luego a ta durante otras 16 horas. Se añadió agua para paralizar la reacción. La mezcla se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante prep-HPLC para proporcionar 300 mg de 5 (19%) como un sólido blanco.

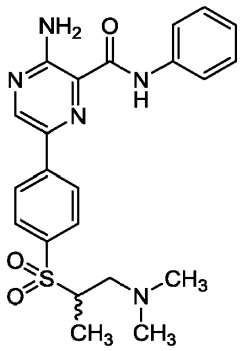
Haciendo referencia de nuevo a la FIG. 4, el Intermedio 4 en el Esquema 4 se puede obtener como se describe a continuación.



Intermedio 3 Intermedio 4

A una disolución del Intermedio 3 (20 g, 60 mmol) en MeCN (300 ml) se añadió 1-metilpiperazina (9,0 g, 90 mmol) y K_2CO_3 (16,6 g, 120 mmol). La mezcla se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 15 g de 4 (71%) como un sólido pálido.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 1 (3-amino-6-(4-((1-(dimetilamino)propan-2-il)sulfonil)fenil)-N-fenilpirazin-2-carboxamida)



Masa exacta: 439,17; Peso molecular: 439,53; Compuesto 1; Menos básico; 427 mg; Rendimiento 12,9%; pK_a 7,04.

El compuesto del Ejemplo 6 se preparó según el procedimiento para preparar el Compuesto 1 dado en J.Med. Chem. 2011, 54, 2320 (materiales complementarios), excepto por el uso de 1-bromo-4-(2-bromoetilsulfonil)benceno. Se obtuvo un sólido amarillo (427 mg, rendimiento 11%). MS (M+H)+ 440; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10,46 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,52 (d, 2H, 6,8Hz), 7,93 (d, 2H, 6,8Hz), 7,89 (s, br, 2H), 7,82 (d, 2H, 8,0Hz), 7,40 (t, 2H, 7,2Hz), 7,18(t, 1H, 7,2Hz), 3,53 (t, 2H, 7,2Hz), 2,64 (d, 2H, 11,6 Hz), 2,55 (t, 2H, 7,2Hz), 2,05 (m, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,17 (m, 2H), 1,42 (d, 2H, 12,0Hz), 1,18 (m, 3H), 0,78 (m, 2H).

Ejemplo 7: Preparación de liposomas con sales de SOS de trietilamonio atrapadas, y carga de ATRi en el liposoma.

El octasulfato de sacarosa de sodio (peso equivalente 144,8) es una sal de sodio de un derivado de sacarosa en el que todos los grupos hidroxilo han formado ésteres de ácido sulfúrico. Se disolvieron sesenta gramos de sal sódica de octasulfato de sacarosa (SOS) en 150 ml de agua di, calentada con agitación (remolino) de un baño de agua a 50ºC. La disolución se hizo pasar a través de una columna rellena con perlas de resina de intercambio catiónico de copolímero de poliestireno divinilbenceno sulfonado (Dowex 50Wx8-100-200 mesh, Dow Chemical Co.). La columna se equilibró previamente con HCl acuoso 3-3,6 M para llevar la resina a la forma de hidrógeno, y se lavó con agua desionizada hasta que el caudal de salida mostró una conductividad <1 μS/cm. El eluyente se controló usando un detector de conductividad. La fracción de SOS se recogió correspondiente al pico de conductividad, y se tituló inmediatamente con una disolución de trietilamina (TEA) pura a pH 6-6,5. La disolución se analizó para sodio residual por potenciometría usando un electrodo sensible al sodio, y para concentración de SOS usando un refractómetro. La disolución que tenía menos de 0,25% de sodio residual se diluyó con agua di hasta una concentración final de SOS de 1,1 M, y entonces se filtró en condiciones estériles usando un filtro Millipore Steri-Top de 0,22 μm.

El colesterol (Chol) se adquirió de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala, EE.UU., la fosfocolina de soja hidrogenada (HSPC) y el metoxi-poli(etilenglicol)-1,2-diestearoil-sn-glicerilo (PEG2000-DSG) se obtuvieron de Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania.

Chol, HSPC y PEG2000-DSG se disolvieron conjuntamente en etanol al 100% (prueba 200, nº de catálogo de Sigma: 459828) en una relación molar de 3:2:0,15 a 65ºC. La disolución de TEA-SOS (10 veces el volumen de etanol añadido) se mezcló con la disolución lipídica a 60-65ºC, y se agitó a esta temperatura hasta que se formó una suspensión lechosa homogénea de vesículas multilaminares. Esta suspensión se extruyó 3 veces a través de 5 filtros de poros grabados de policarbonato apilados (Corning Nuclepore), con un tamaño de poro de 100 nm, usando un extrusor de presión de argón (Lipex Biomembranes) a 60-65ºC, y los liposomas unilaminares resultantes se enfriaron rápidamente en hielo y entonces se almacenaron a 4-6ºC antes del uso. La concentración de fosfolípidos se midió mediante un ensayo de fosfato, y el diámetro de las partículas se registró en un Malvern Nanosizer.

Antes de la carga del fármaco, el gradiente de TEA-SOS se creó eliminando el exceso de TEA-SOS no atrapado usando cromatografía en gel (Sepharose CL-4B, Pharmacia). La osmolaridad de los liposomas se equilibró usando disolución de dextrosa al 50%. La concentración final de dextrosa fue 15%.

Los inhibidores de ATR se disolvieron en disoluciones de dextrosa al 15% en agua destilada mediante titulación con HCl 1 M y calentamiento a 45ºC, y entonces se filtraron con filtros de jeringa de 13 mm NALGENE de 0,2 micrómetros. La concentración de fármaco en la disolución se detectó por HPLC. Se añadió a los liposomas una disolución madre de inhibidores de ATR que contenía 9-10 mg/ml de fármacos, a una relación fármaco/lípido de 800 mg/mmol de fosfolípidos, y el pH se ajustó a pH 6,5 con amortiguador Hepes 1 M y NaOH 0,1 N.

La mezcla de liposomas y fármacos se incubó con agitación ocasional durante 30 minutos a 65ºC. La mezcla de incubación se enfrió rápidamente y se incubó durante 10 minutos a 0ºC, después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. El fármaco no encapsulado se eliminó mediante cromatografía en gel en Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia) eluida con amortiguador HBS-6.5 (ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazino)-etilsulfónico 5 mM (HEPES), NaCl 144 mM, pH 6,5). Las fracciones de liposomas eluidas en el volumen vacío se combinaron, se esterilizaron mediante filtración de 0,2 micrómetros, y se almacenaron a 4-6ºC antes del uso. Los liposomas se caracterizaron por la

concentración de lípidos, la concentración de fármaco, y el tamaño de partículas (Tabla 2). Todos los inhibidores de ATR mostraron una buena eficacia de carga, excepto el Compuesto 1, que en una relación de fármaco a lípido superior a 400 g/mol formó agregados y participó.

Tabla 2. Caracterización de liposomas cargados con inhibidores de ATR.

Ejemplo 8: Descripción general del estudio PK de ATRi liposomal				
Inhibidor de ATR	Relación fármaco/lípidos antes de la carga	Relación fármaco/lípidos después de la carga	Eficiencia de carga (%)	Tamaño del liposoma, (media ± SD) nm
Compuesto 6	743 ± 89	550 ± 64	74 ± 0.3	119 ± 28
Compuesto 2	642 ± 10	639 ± 22	100 ± 5	130 ± 34
Compuesto 5	732 ± 58	619 ± 110	84 ± 8	120 ± 29
Compuesto 3	646 ± 28	628 ± 6	97 ± 5	120 ± 27
Compuesto A	736 ± 57	716 ± 41	97 ± 2	121 ± 26
Compuesto 1	600-800	No cargable. Se formaron agregados y precipitados		
	379	369	98	122 ± 24

La FIG. 5 es un gráfico que muestra la farmacocinética en sangre de los inhibidores de ATR liposomales. Se prepararon formulaciones liposomales de inhibidores de ATR como se describe en el Ejemplo 7. Los liposomas se administraron por vía intravenosa a una dosis de 20 mg de fármaco/kg a tres ratones CD-1 hembra de 7-9 semanas (Charles River) (peso corporal de alrededor de 25 g). Las muestras de sangre se recogieron en tubos de heparina de litio mediante sangrado de la vena safena a las 0,08, 1,5, 4, 8 y 24 horas. El plasma se separó de la fracción celular por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min. Los fármacos se extrajeron mediante incubación de muestras de plasma con 200 µl de ácido acídico al 1% en metanol (Ac/MeOH al 1%) durante al menos 2 horas a -80ºC. Las proteínas plasmáticas se centrifugaron por centrifugación a 15000 rpm durante 20 min. Después, 75 µl de sobrenadante se transfirieron a viales de HPLC (Thermo Scientific, nº de cat. C4011-LV1), y se añadieron 75 µl adicionales de Ac/MeOH al 1%. El contenido de fármaco se analizó por HPLC, midiendo cada muestra por duplicado. Los datos se expresaron como el % de la dosis inyectada frente al tiempo posterior a la inyección. Como se muestra en la FIG. 5, la formulación liposomal del Compuesto 1, el Compuesto 3 y el Compuesto 2 eran inestables en la circulación, siendo el Compuesto 1 y el Compuesto 3 liposomales indetectables mediante análisis de HPLC a las 24 horas, y siendo el Compuesto 2 liposomal indetectable ya a las 8 h. Dos formulaciones liposomales, el Compuesto 6 y el Compuesto 5, tienen una buena longevidad de circulación, con más del 16% de la dosis inyectada inicial después de 24 horas. La Tabla 2 a continuación resume las curvas PK en sangre. El Compuesto 6 y el Compuesto 5 liposomales muestran las vidas medias plasmáticas más altas en comparación con otros ejemplos liposomales.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de los inhibidores de ATR liposomales

Fármaco	C_{max} (mg/ml)	AUC (mg/ml*h)	Vd (ml)	Cl (ml/h)	$T_{1/2}$ (h)	% de ID después de 24 h
Ls-Compuesto 3	0,271	1,659	2,020	0,330	4,24	0,0
Ls-Compuesto 6	0,303	3,021	1,655	0,166	6,91	16,4
Ls-Compuesto 2	0,080	0,160	5,806	2,890	1,39	0,0
Ls-Compuesto 5	0,227	2,504	2,012	0,182	7,65	17,2
Ls-Compuesto A	0,237	1,902	0,712	0,089	5,56	9,0
Ls-Compuesto 1	0,053	0,043	6,358	7,841	0,56	0,0

Ejemplo 9A: Eficacia antitumoral *in vivo* y tolerabilidad del LS-Compuesto A preparado usando TEA.SOS contra xenoinjertos de cáncer de cuello uterino en ratones

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en el modelo de xenoinjerto cervical MS571, como se describe en el Ejemplo 9A.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en el modelo de xenoinjerto cervical C33A, como se describe en el Ejemplo 9A.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en el modelo de xenoinjerto cervical C33A, según el Ejemplo 9A.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto A liposomal en combinación con MM-398 en MS751 cervical, según el Ejemplo 9A.

La eficacia antitumoral de los liposomas cargados con un inhibidor de ATR, Compuesto A (Ls-Compuesto A), en combinación con MM-398 (irinotecán liposomal) se estudió en el modelo de la línea celular MS751, C33A y SiHa de cuello uterino humano. Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se propagaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero de ternero fetal, 50 U/ml de penicilina G y 50 μg/ml de sulfato de estreptomicina a 37ºC, 5% de CO_2, según lo recomendado por el proveedor. Se obtuvieron ratones machos atímicos homocigotos NCR nu/nu (4-5 semanas, peso de al menos 16 g) de Charles River. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 0,1 ml de la suspensión que contenía 5 x 106 células suspendidas en PBS suplementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño entre 150 mm^3 y 350mm^3, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento según el siguiente método. Los animales se clasificaron según el tamaño del tumor, y se dividieron en 6 categorías de tamaño decreciente del tumor. Se formaron cuatro grupos de tratamiento de 10 animales/grupo, seleccionando aleatoriamente un animal de cada categoría de tamaño, de modo que en cada grupo de tratamiento todos los tamaños del tumor estuvieran igualmente representados.

Los animales recibieron cuatro inyecciones en la vena de la cola, a intervalos de 7 días, de las siguientes preparaciones: 1) Control (disolución salina amortiguada con HEPES pH 6,5); 2) MM-398, a dosis de 2 o 5 mg/kg por inyección; 3) Compuesto A liposomal, a 20 o 60 mg/kg por inyección; 4) MM-398, seguido de inyecciones de Compuesto A liposomal con un intervalo de 24 h. Los liposomas para inyecciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 7. El peso del animal y el tamaño del tumor se monitorizaron dos veces por semana. La progresión del tumor se monitorizó mediante palpación y medidas de vernier de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces por semana. Los tamaños de los tumores se determinaron dos veces por semana a partir de las medidas del vernier usando la fórmula (Geran, R.I., et al., 1972 Cancer Chemother. Rep. 3:1-88):

$$\text{Volumen del tumor} = [(\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2]/2$$

Para evaluar la toxicidad asociada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces por semana. Los animales se observaron durante 60 días tras la inoculación del tumor. Cuando los tumores del grupo alcanzaron el 10% del peso corporal del ratón, los animales del grupo se sacrificaron. Los volúmenes tumorales medios entre los grupos se representaron gráficamente juntos y se compararon a lo largo del tiempo. Como se muestra en las FIG. 6, 7 y 8, la combinación del inhibidor de ATR liposomal Compuesto A con MM-398 tiene un efecto antitumoral significativamente más fuerte en comparación con MM-398 y el Compuesto A liposomal solos, en los tres modelos de xenoinjerto. La toxicidad asociada con el tratamiento se evaluó mediante la dinámica del peso corporal de los animales (FIG. 9). Ninguno de los grupos reveló toxicidad significativa. El peso de los animales en todos los grupos tratados era comparable al del grupo de control, y aumentaba constantemente. Por lo tanto, la formulación de liposoma del inhibidor de ATR, Compuesto A, mostró una mayor actividad antitumoral en los modelos tumorales estudiados, sin un aumento apreciable de la toxicidad.

Ejemplo 9B: fabricación de liposomas de irinotecán MM-398

El MM398 usado en el Ejemplo 9A y en otros lugares del presente documento es un liposoma de irinotecán que se puede preparar en un procedimiento de múltiples etapas. En primer lugar, los lípidos se disuelven en etanol calentado. Los lípidos pueden incluir DSPC, colesterol y MPEG-2000-DSPE, combinados en una relación molar de 3:2:0,015. Preferiblemente, los liposomas pueden encapsular octasulfato de sacarosa de irinotecán (SOS) encapsulado en una vesícula que consiste en DSPC, colesterol y MPEG-2000-DSPE, combinados en una relación molar de 3:2:0,015. La disolución resultante de etanol-lípido se dispersa en un medio acuoso que contiene amina sustituida y polianión en condiciones eficaces para formar un liposoma esencialmente unilaminar de tamaño adecuado (por ejemplo, 80-120 nm) que contiene la amina sustituida (en forma de amonio) y el polianión encapsulados dentro de un vesícula formada a partir de los lípidos disueltos. La dispersión se puede realizar, por ejemplo, mezclando la disolución lipídica etanólica con la disolución acuosa que contiene una amina sustituida y un polianión a una temperatura por encima de la temperatura de transición lipídica, por ejemplo 60-70ºC, y extruyendo a presión la suspensión lipídica hidratada resultante (liposomas multilaminares) a través de uno o más filtros de membrana de poros grabados, por ejemplo policarbonato, con tamaño de poro definido, por ejemplo 50 nm, 80 nm, 100 nm, o 200 nm. La amina sustituida puede ser trietilamina (TEA), y el polianión puede ser octasulfato de sacarosa (SOS), combinados en una relación estequiométrica (por ejemplo, TEA_8SOS) a una concentración de alrededor de 0,4-0,5N. A continuación, se elimina todo o prácticamente todo la TEA o el SOS no atrapados (por ejemplo, mediante filtración en gel, diálisis o ultrafiltración) antes de poner en contacto el liposoma con irinotecán en condiciones eficaces para permitir que el

irinotecán entre en el liposoma a cambio de que TEA abandone el liposoma. Las condiciones pueden incluir una o más condiciones seleccionadas del grupo que consiste en: adición del agente osmótico (por ejemplo, dextrosa al 5%) al medio externo del liposoma para equilibrar la osmolalidad de la disolución de TEA-SOS atrapada y/o prevenir la ruptura osmótica de los liposomas durante la carga, el ajuste y/o la selección del pH (por ejemplo, a 6,5) para reducir la degradación del fármaco y/o de los lípidos durante el etapa de carga, y el aumento de la temperatura por encima de la temperatura de transición de los lípidos del liposoma (por ejemplo, a 60-70ºC) para acelerar el intercambio transmembránico de TEA e irinotecán. La carga de irinotecán por intercambio con TEA a través del liposoma preferiblemente continúa hasta que todo o sustancialmente toda la TEA se elimine del liposoma, agotando así su gradiente de concentración a través del liposoma. Preferiblemente, el procedimiento de carga de liposomas de irinotecán continúa hasta que la relación de equivalentes-gramo de irinotecán a sucrooctasulfato sea al menos 0,9, al menos 0,95, 0,98, 0,99 o 1,0 (u oscila de alrededor de 0,9-1,0, 0,95-1,0, 0,98-1,0, o 0,99-1,0). Preferiblemente, el procedimiento de carga de liposomas de irinotecán continúa hasta que la TEA es al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o más de la TEA se elimina del interior del liposoma. El irinotecán puede formar sucrosofato de irinotecán dentro del liposoma, tal como irinotecán y octasulfato de sacarosa en una relación molar de alrededor de 8:1. A continuación, se elimina cualquier resto de irinotecán extraliposomal y TEA para obtener el liposoma de irinotecán, usando, por ejemplo, métodos de cromatografía en gel (exclusión por tamaños), diálisis, intercambio iónico, o ultrafiltración. El medio externo de los liposomas se reemplaza por fluido inyectable farmacológicamente aceptable, por ejemplo disolución salina isotónica amortiguada. Finalmente, la composición de liposoma se esteriliza, por ejemplo mediante filtración de 0,2 micrómetros, se dispensa en viales de dosis, se etiqueta, y se almacena, por ejemplo en refrigeración a 2-8ºC, hasta el uso. El medio externo de los liposomas se puede reemplazar por un fluido farmacológicamente aceptable al mismo tiempo que se eliminan el irinotecán extraliposomal y la TEA restantes. El pH extraliposomal de la composición se puede ajustar o seleccionar de otro modo para proporcionar una propiedad de estabilidad de almacenamiento deseada (por ejemplo, para reducir la formación de liso-PC dentro del liposoma durante el almacenamiento a 4ºC durante 180 días), por ejemplo preparando la composición a un pH de alrededor de 6,5-8,0, o cualquier valor de pH adecuado entre ellos (incluyendo, por ejemplo, 7,0-8,0, y 7,25).

Se pesaron DSPC, colesterol (Chol) y PEG-DSPE en cantidades que correspondían a una relación molar de 3:2:0,015, respectivamente (por ejemplo, 1264 mg/412,5 mg/22,44 mg). Los lípidos se disolvieron en cloroformo/metanol (4/1 v/v), se mezclaron completamente, y se dividieron en 4 alícuotas (A-D). Cada muestra se evaporó hasta sequedad usando un evaporador rotatorio a 60ºC. El cloroformo residual se eliminó de los lípidos colocándolos al vacío (180 µtorr) a temperatura ambiente durante 12 h. Los lípidos secos se disolvieron en etanol a 60ºC, y se añadió TEA_8SOS precalentado de concentración apropiada para que el contenido final de alcohol fuera 10% (v/v). La concentración de lípidos fue 75 mM. La dispersión de lípidos se extruyó a alrededor de 65ºC a través de 2 membranas de policarbonato de 0,1 µm apiladas (Nucleopore) 10 veces usando un extrusor de cilindro termocilíndrico Lipex (Northern Lipids, Canadá), para producir liposomas con un diámetro promedio típico de 95-115 nm (determinado por dispersión de luz cuasielástica). El pH de los liposomas extruidos se ajustó con NaOH 1 N a pH 6,5 según fuera necesario. Los liposomas se purificaron mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños. En primer lugar, la resina DOWEX IRA 910 se trató con NaOH 1 N, seguido de 3 lavados con agua desionizada, y seguido después por 3 lavados con HCl 3 N, y posteriormente por múltiples lavados con agua. Los liposomas se hicieron pasar a través de la resina preparada, y se midió la conductividad de las fracciones eluidas usando un conductímetro de celda de flujo (Pharmacia, Upsalla, Suecia). Las fracciones se consideraron aceptables para una purificación adicional si la conductividad era menor que 15 µS/cm. El eluato de liposomas se aplicó entonces a una columna Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrada con agua desionizada, y se midió la conductividad de la fracción de liposomas recolectada (típicamente menor que 1 µS/cm). La isotonicidad a través de la membrana se logró mediante adición de una disolución de dextrosa al 40% hasta una concentración final de 5% (p/p), y el amortiguador (Hepes) se añadió a partir de una disolución madre (0,5 M, pH 6,5) hasta una concentración final de 10 mM.

Se preparó una disolución madre de irinotecán disolviendo polvo de trihidrato de irinotecán•HCl en agua desionizada a 15 mg/ml de irinotecán-HCl anhidro, teniendo en cuenta el contenido de agua y los niveles de impurezas obtenidos del certificado de análisis de cada lote. La carga de fármaco se inició añadiendo irinotecán a 500 g/mol de fosfolípido liposómico, y calentando hasta 60 ± 0,1ºC durante 30 min en un baño de agua caliente. Las disoluciones se enfriaron rápidamente al retirarlas del baño de agua sumergiéndolas en agua enfriada con hielo. El fármaco extraliposomal se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaños, usando columnas Sephadex G75 equilibradas y eluidas con disolución salina amortiguada con Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,5). Las muestras se analizaron para irinotecán por HPLC, y para fosfato por el método de Bartlett (véase Determinación de fosfato).

Un ejemplo preferido de un liposoma de irinotecán estable al almacenamiento descrito aquí es el producto que se comercializará como ONIVYDE (inyección de liposomas de irinotecán). ONIVYDE es un inhibidor de la topoisomerasa, formulado con trihidrato de hidrocloruro de irinotecán en una dispersión liposomal, para uso intravenoso. ONIVYDE está indicado para el tratamiento del adenocarcinoma metastásico del páncreas después de la progresión de la enfermedad tras una terapia basada en gemcitabina.

ONIVYDE es un liposoma estabilizado para almacenamiento que tiene un pH de alrededor de 7,25. El producto ONIVYDE contiene sucrosofato de irinotecán encapsulado en un liposoma, obtenido a partir de un material de partida, trihidrato de hidrocloruro de irinotecán. El nombre químico del irinotecán es [1,4'bipiperidin]-1'-carboxilato de (S)-4,11-

dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-9-ilo. La dosis de ONIVYDE puede calcularse en función de la cantidad equivalente de material de partida de hidrocloruro de trihidrato de irinotecán usada para preparar los liposomas de irinotecán, o en función de la cantidad de irinotecán en el liposoma. Hay alrededor de 866 mg de irinotecán por gramo de hidrocloruro de trihidrato de irinotecán. Por ejemplo, una dosis de ONIVYDE de 80 mg, basada en la cantidad de material de partida de trihidrato de hidrocloruro de irinotecán, en realidad contiene alrededor de 0,866x(80 mg) de irinotecán en el producto final (es decir, una dosis de 80 mg/m^2 de ONIVYDE basado en el peso del material de partida de hidrocloruro de irinotecán es equivalente a alrededor de 70 mg/m^2 de irinotecán en el producto final). ONIVYDE es una dispersión liposomal isotónica estéril opaca, de color blanco a ligeramente amarillo. Cada vial de dosis única de 10 ml contiene 43 mg de base libre de irinotecán a una concentración de 4,3 mg/ml. El liposoma es una vesícula de bicapa lipídica unilaminar, de aproximadamente 110 nm de diámetro, que encapsula un espacio acuoso que contiene irinotecán en estado gelificado o precipitado como la sal de octasulfato de sacarosa. La vesícula está compuesta de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) 6,81 mg/ml, colesterol 2,22 mg/ml, y polietilenglicol terminado en metoxi (MW 2000)-diestearoilfosfatidiletanolamina (MPEG-2000-DSPE) 0,12 mg/ml. Cada ml también contiene ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES) como amortiguador 4,05 mg/ml, y cloruro de sodio como reactivo de isotonicidad 8,42 mg/ml. Cada vial de ONIVYDE contiene 43 mg/10 ml de base libre de irinotecán como una dispersión liposomal opaca, de color blanco a ligeramente amarillo, en un vial de dosis única.

En un ejemplo de la invención, una forma de dosificación unitaria de ONIVYDE es una composición farmacéutica que comprende una cantidad de irinotecán encapsulado en un liposoma que proporciona una cantidad total de alrededor de 70 mg/m^2 de irinotecán, proporcionando una cantidad de irinotecán equivalente a 80 mg/m^2 de trihidrato de hidrocloruro de irinotecán, y menos de alrededor de 20% de liso-PC. La forma de dosificación unitaria puede ser una formulación intravenosa que tenga un volumen total de alrededor de 500 ml. ONIVYDE se prepara para administración diluyendo la dispersión liposomal isotónica del vial de la siguiente manera: extraiga el volumen calculado de ONIVYDE del vial. ONIVYDE se diluye en 500 ml de dextrosa al 5% inyectable, USP, o cloruro de sodio al 0,9% inyectable, USP, y mezcle la disolución diluida por inversión suave; proteja la disolución diluida de la luz, y administre la disolución diluida dentro de las 4 horas posteriores a la preparación cuando se almacena a temperatura ambiente, o dentro de las 24 horas posteriores a la preparación cuando se almacena en condiciones refrigeradas [2ºC a 8ºC (36ºF a 46ºF)].

ONIVYDE (inyección de liposomas de irinotecán) está indicado, en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina, para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma metastásico de páncreas que ha progresado tras una terapia basada en gemcitabina. Administre ONIVYDE antes de la leucovorina y el fluorouracilo. La dosis recomendada de ONIVYDE es 70 mg/m2 de irinotecán, administrados mediante infusión intravenosa durante 90 minutos cada 2 semanas. La dosis inicial recomendada de ONIVYDE en pacientes que se sabe que son homocigotos para el alelo UGT1A1*28 es 50 mg/m^2 de irinotecan, administrada por infusión intravenosa durante 90 minutos. La dosis de ONIVYDE se puede aumentar a 70 mg/m^2 según se tolere en ciclos posteriores. No existe una dosis recomendada de ONIVYDE para pacientes con bilirrubina sérica por encima del límite superior normal. ONIVYDE se infunde como una disolución diluida por vía intravenosa durante 90 minutos.

Los regímenes de tratamiento adecuados incluyen ONIVYDE 70 mg/m^2 con leucovorina (forma racémica l+d) 400 mg/m^2 (o 200 mg/m^2 de la forma activa l de leucovorina) y fluorouracilo 2.400 mg/m^2 durante 46 horas cada 2 semanas (ONIVYDE/5-FU/LV; n=117), ONIVYDE 100 mg/m^2 cada 3 semanas (n=147), o leucovorina 200 mg/m^2 y fluorouracilo 2000 mg/m^2 durante 24 horas a la semana durante 4 semanas, seguido de 2 semanas de descanso (5-FU/LV; n=134).

Ejemplo 10: Eficacia antitumoral in vivo y tolerabilidad del Ls-Compuesto 5 preparado usando TEA.SOS contra xenoinjertos de cáncer de pulmón en ratones

La FIG. 10A y la FIG. 10B son, cada uno, un gráfico que muestra la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones NCI-H2170 (FIG. 10A) o DMS-114 (FIG. 10B), como se explica en el Ejemplo 10.

La FIG. 11A y la FIG. 11B son, cada uno, un gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer que representan la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 (FIG. 11A) y DMS-114 (FIG. 11B), como se explica en Ejemplo 10.

La FIG. 12A y la FIG. 12B son, cada uno, un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 (FIG. 12A) o DMS-114 (FIG. 12B).

Se estudió la eficacia antitumoral de los liposomas cargados con un inhibidor de ATR, Compuesto 5, en combinación con MM-398 (irinotecán liposomal) en el modelo de líneas celulares pulmonares NCI-H2170 (carcinoma de células escamosas de pulmón) y DMS-114 (carcinoma de pulmón microcítico) humanas.

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se propagaron en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G, y 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina, a 37ºC, 5% de CO_2, según lo recomendado por el proveedor. Se obtuvieron ratones machos atímicos homocigotos NCR nu/nu (4-5 semanas, peso de al menos 16 g) de Charles River. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 0,1 ml de la suspensión que contenía 5 x 10^6 células suspendidas en PBS suplementado con

Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño entre 150 mm^3 y 350 mm^3, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento según el siguiente método. Los animales se clasificaron según el tamaño del tumor, y se dividieron en 6 categorías de tamaño decreciente del tumor. Se formaron cuatro grupos de tratamiento de 10 animales/grupo, seleccionando aleatoriamente un animal de cada categoría de tamaño, de modo que en cada grupo de tratamiento todos los tamaños del tumor estuvieran igualmente representados. Los animales recibieron cuatro inyecciones en la vena de la cola, a intervalos de 7 días, de las siguientes preparaciones: 1) Control (disolución salina amortiguada con HEPES pH 6,5); 2) MM-398, a una dosis de 5 mg/kg por inyección; 3) Compuesto 5 liposomal, a 80 mg/kg por inyección; 4) MM-398, seguido de inyecciones del Compuesto 5 liposomal con un intervalo de 24 h. Los liposomas para inyecciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 7. MM-398 se describe en el Ejemplo 9B.

El peso del animal y el tamaño del tumor se monitorizaron dos veces por semana. La progresión del tumor se monitorizó mediante palpación y medidas de vernier de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces por semana. Los tamaños de los tumores se determinaron dos veces por semana a partir de las medidas del vernier usando la fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = [(\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2]/2$$

Para evaluar la toxicidad asociada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces por semana. Cuando los tumores del grupo alcanzaron el 10% del peso corporal del ratón, los animales del grupo se sacrificaron. Los volúmenes tumorales medios entre los grupos se representaron gráficamente juntos y se compararon a lo largo del tiempo.

Como se demuestra en las FIGs. 10A y 10B y las FIGs. 11A y 11B, el inhibidor de ATR liposomal, Compuesto 5, mejoró significativamente la eficacia antitumoral de MM-398 en ambos modelos de xenoinjerto de pulmón. El tratamiento combinado de inhibidor de ATR liposomal y MM-398 no afectó al peso corporal de los animales (FIGs. 12A y 12B).

Ejemplo 11: Comparación de la eficacia antitumoral in vivo de los inhibidores liposomales Ls-Compuesto 5 y LS-Compuesto A en combinación con MM-398 contra xenoinjertos de cáncer de pulmón en ratones

Las FIGs. 13A y 13B son gráficos que muestran la eficacia del Compuesto 5 liposomal en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones Calu-6 (FIG. 13A) o COLO-699 (FIG. 13B). Por ejemplo, los datos en las FIGs. 13A y 13B muestran que mientras que el inhibidor de ATR liposomal, Compuesto 5, mejoró significativamente la eficacia antitumoral de MM-398 en ambos modelos, el Compuesto A, formulado en liposomas, fue activo solo en el modelo de xenoinjerto COLO-699.

La eficacia antitumoral de los liposomas cargados con un inhibidor de ATR, Compuesto 5, en combinación con MM-398 (irinotecán liposomal) se comparó con la formulación liposomal del Compuesto A en el modelo de xenoinjerto de las líneas de células de pulmón humanas Calu-6 y COLO-699.

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se propagaron en medio RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G y 50 μg/ml de sulfato de estreptomicina, a 37ºC, 5% de CO2, según lo recomendado por el proveedor. Se obtuvieron ratones machos atímicos homocigotos NCR nu/nu (4-5 semanas, peso de al menos 16 g) de Charles River. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 0,1 ml de la suspensión que contenía 5 x 106 células suspendidas en PBS suplementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño entre 150 mm^3 y 350mm^3, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento según el siguiente método. Los animales se clasificaron según el tamaño del tumor, y se dividieron en 6 categorías de tamaño decreciente del tumor. Se formaron cuatro grupos de tratamiento de 10 animales/grupo, seleccionando al azar un animal de cada categoría de tamaño, de modo que en cada grupo de tratamiento todos los tamaños del tumor estuvieran igualmente representados. Los animales recibieron cuatro inyecciones en la vena de la cola, a intervalos de 7 días, de las siguientes preparaciones: 1) Control (disolución salina amortiguada con HEPES pH 6,5); 2) MM-398, a dosis de 10 o 20 mg/kg por inyección; 3) Compuesto 5 liposomal, a 80 mg/kg por inyección; 4) Compuesto A liposomal, a 80 mg/kg por inyección; 5) MM-398, seguido de inyecciones del Compuesto 5 liposomal con un intervalo de 24 h, 6) MM-398, seguido de inyecciones del Compuesto A liposomal con un intervalo de 24 h. Se prepararon liposomas para inyecciones como se describe en el Ejemplo 7.

El peso del animal y el tamaño del tumor se monitorizaron dos veces por semana. La progresión del tumor se monitorizó mediante palpación y medidas de vernier de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces por semana. Los tamaños de los tumores se determinaron dos veces por semana a partir de las medidas del vernier usando la fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = [(\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2]/2$$

Para evaluar la toxicidad asociada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces por semana. Cuando los tumores del grupo alcanzaron el 10% del peso corporal del ratón, los animales del grupo se sacrificaron. Los volúmenes tumorales medios entre los grupos se representaron gráficamente juntos y se compararon a lo largo del tiempo.

Ejemplo 12: Estudio de selección de combinación de medicamentos libres

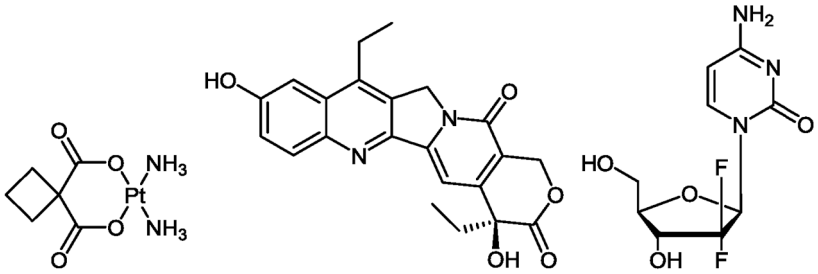
La FIG. 14A es un gráfico que muestra la muerte de células en monoterapia in vitro por el Compuesto 6 y el Compuesto 5 en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón. El Compuesto 5 es más eficaz, con IC_{50} ~3 (=100,5) veces menor que el Compuesto 6. La FIG. 14B es un gráfico que muestra el efecto del Compuesto 5 frente al Compuesto 6 en combinación con tres agentes quimioterapéuticos (Carboplatino, Gemcitabina, Compuesto B). La figura compara la IC_{50} en log (μM) de la combinación de los agentes quimioterapéuticos con 1 μg/ml del Compuesto 6 o el Compuesto 5. La adición del Compuesto 5 a los agentes quimioterapéuticos fue más potente (menor IC_{50}) que el Compuesto 6 en todos los agentes citotóxicos evaluados y en todas las líneas celulares, excepto una.

La FIG. 15 es un gráfico que muestra el cambio de IC_{50} de la combinación (Ejemplo 2 + Compuesto B) en la línea celular Sum190PT (TNBC).

La FIG. 16A y la FIG. 16B son gráficos que muestran una comparación de los cambios de IC50 del compuesto del Ejemplo 2 con el Compuesto B frente a la combinación del Compuesto A con el Compuesto B en la línea celular MDA-MB-453 (TNBC).

Condición de cultivo/tratamiento

El estudio de eficacia in vitro se realizó usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO (Promega) con placas blancas de fondo transparente de 384 pocillos, nº de cat. de Corning: 3707. Las células se colocaron en placas (1000 células/pocillo) en un formato de 384 pocillos, y se dejaron incubar a 37ºC durante 24 horas. Los fármacos de monoterapia se añadieron en el punto temporal de 24 horas, y entonces se dejaron incubar a 37ºC durante 24 horas. En el punto temporal de 48 h, los fármacos del medio se retiraron, se lavaron con PBS, y se añadió medio nuevo. A continuación, se permitió que las células se incubaran a 37ºC durante 72 horas. Para los estudios de combinación, las células se expusieron a Carboplatino, Compuesto B o Gemcitabina durante 24 horas, después se eliminó el agente quimioterapéutico, y las células se expusieron al compuesto secundario (inhibidor de ATR) durante 24 horas. Las células se cultivaron en medios nuevos durante 48 horas más.



Carboplatino Compuesto B Gemcitabina

En el punto temporal de 120 horas, el medio se eliminó, y se añadió el reactivo CELLTITER-GLO (CTG) (relación 1:1 con PBS). Las placas se leyeron usando un luminómetro (lector Envision Multilabel).

Análisis de los datos:

Los datos se analizaron usando un algoritmo interno desarrollado con Matlab (Mathworks, Natick MA). En resumen, se calcularon los valores luminiscentes medios de CTG promedios para 4 pocillos repetidos. La detección de valores atípicos se realizó calculando el coeficiente de variación (CV>20%), y los valores atípicos se eliminaron del promedio. Los valores de CTG se normalizaron sobre la base de un pocillo de control no tratado. La concentración de fármaco en microMolar (μM) se transformó logarítmicamente antes del ajuste a una curva logística de 4 parámetros.

$$y = b + \frac{(a-b)}{(1+10^{(IC50-C)*pendiente})}$$

en la que C: concentración de fármaco, y: valor de CTG normalizado, a: asíntota superior (representa la muerte celular máxima), b: asíntota inferior (restringida 0,8-1,2), IC50, pendiente: pendiente de la curva logística.

Se realizó un control de calidad de los datos para garantizar que el intervalo de concentración sea óptimo de acuerdo con estas reglas: (1) si la concentración más baja mata a más del 70% de las células, el intervalo de concentración se considera demasiado potente, (2) si la concentración más alta mata a menos del 30% de las células, el intervalo de concentración se considera bajo o la línea celular es demasiado resistente. Además, la bondad del ajuste se evaluó mediante R^2, y R^2<0,9 está catalogado como un mal ajuste.

El análisis estadístico se realizó usando JMP (SAS Institute Inc., NC), y p<0,05 se consideró significativo.

Ejemplo 13: Determinación de la actividad de ATR

Se llevó a cabo una determinación de EC_{50} para el conjunto suministrado de compuestos contra la cinasa ATR/ATRIP(h), usando una concentración de enzima lineal en el ensayo Eurofins ATR/ATRIP HTRF, usando como sustrato p53 de longitud completa etiquetado con GST.

La actividad de ATR/ATRIP(h) a una concentración de ATP dentro de 15 μM de la Km se determinó a 9 concentraciones de compuesto con diluciones semilogarítmicas desde 10 μM. La fosforilación ATR/ATRIP de p53 en Ser15 se midió mediante la formación de un complejo de transferencia de energía que consiste en un anticuerpo anti-fosfo Ser15 p53 marcado con europio y un anticuerpo anti-GST-d2. Todos los puntos de datos se realizaron por duplicado, con controles de DMSO y blancos de EDTA.

ATR/ATRIP(h) se diluyó previamente en HEPES 25 mM pH 8,0, Brij-35 al 0,01%, glicerol al 1%, DTT 5 mM, BSA 1 mg/ml, y se analizó en HEPES 25 mM pH 8,0, Brij-35 al 0,01%, glicerol al 1%, $MnCl_2$ 10 mM, usando como sustrato 30 nM de GST,cMyc p53-(hu,FL). La reacción se inició con la adición de ATP hasta una concentración final de 10 μM.

Las réplicas individuales se expresaron en términos del % de la actividad del control positivo de DMSO. La actividad media (% de control) de cada concentración de inhibidor se representó frente a la concentración de inhibidor, y los valores de EC_{50} se determinaron usando GRAPHPAD PRISM.

Los datos expresados como % de actividad del control se representaron frente a la concentración de inhibidor, y se ajustaron a una logística de cuatro parámetros usando GRAPHPAD PRISM. Los gráficos para cada compuesto se muestran junto con los datos en el informe de Excel adjunto. A continuación se muestra un resumen de las potencias de los compuestos.

Tabla 4

ID del compuesto	Cinasa	ATP μM	EC_{50}* nM	Parte superior	Parte inferior	Hill	r^2
Compuesto 6	ATR ATRIP(h)	10	470,8	101	-2	-0,768	0,998
Compuesto 2	ATR ATRIP(h)	10	139,8	94	1	-0,911	0,998
Compuesto 5	ATR ATRIP(h)	10	233,9	95	1	-0,819	0,996
Compuesto 1	ATR ATRIP(h)	10	49,6	95	-1	-0,772	0,994
Compuesto 4	ATR ATRIP(h)	10	353,4	97	1	-0,860	0,997
Compuesto 3	ATR ATRIP(h)	10	196,1	98	-3	-0,776	0,999
Compuesto A	ATR ATRIP(h)	10	<1	ND	ND	ND	ND

Ejemplo 14: Determinación de la actividad de ATM

Los valores de IC_{50} estimados son los siguientes (obtenidos usando STANDARD KINASEPROFILER):

Tabla 5

Compuesto	Cinasa	IC_{50} (nM)
Compuesto 6	ATM(h)	>10.000
Compuesto 2	ATM(h)	4817
Compuesto 5	ATM(h)	>10.000
Compuesto 1	ATM(h)	3864
Compuesto 4	ATM(h)	6869
Compuesto 3	ATM(h)	>10.000
Compuesto A	ATM(h)	42

Ejemplo 15: Detección de fosfo-ATR total y con análisis de transferencia Western

Haciendo referencia a la FIG. 17: células de cáncer de pulmón DMS-114 se expusieron a Gemcitabina [16 nM] o a inhibidor de ATR (Compuesto A o Compuesto 5 [1 μM]), solos o en combinación *in vitro*. Los lisados de proteínas de células enteras se generaron después de 1, 3, 6 y 24 horas usando un amortiguador de lisis celular que contenía SDS al 2%, y se almacenaron a -80ºC hasta que todas las muestras se recolectaron y analizaron juntas al mismo tiempo para el análisis de transferencia Western. Las siguientes proteínas y fosfoproteínas de interés se detectaron por anticuerpos adquiridos de Cell Signaling Technology (véase la parte de métodos y materiales a continuación): ATR total y fosfo-ATR (S428), fosfo-CHK1 (S317 y S345), yH2AX, beta-actina.

Resultados en la FIG. 17: La señal de ATR total y de fosfo-ATR se reduce fuertemente con el tiempo con la adición de cualquiera de los dos inhibidores de ATR (Compuesto A y Compuesto 5), y no en el tratamiento de control o con Gemcitabina sola (compárense, por ejemplo, las líneas 1, 2 con 3, 4 o 5, 6 a las 24 hs). En respuesta a la Gemcitabina, la señalización de fosfo-CHK1 (S317 y S345) aumenta significativamente durante el período de 24 horas. La adición de cualquiera de los inhibidores de ATR usados (Compuesto A o Compuesto 5) anula la señal de fosforilación de CHK1. La reducción de la proteína ATR y la señalización de CHK1 aguas abajo por parte de ambos inhibidores confirma los efectos específicos en la diana de ambas moléculas. Más importante aún, nuestra hipótesis es que la pérdida del punto de control del ciclo celular, impulsada por la señalización de fosforilación de CHK1 que supuestamente conduce a la detención del ciclo celular y a la reparación del daño en el ADN, induce la muerte celular por acumulación de daño en el ADN. El aumento de la señal de yH2AX puede verse como un sustituto para la medida del aumento de la toxicidad y la acumulación de daño en el ADN.

Cultivo celular

U2OS y todas las demás células se cultivaron en (RPMI) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos. Se generaron imágenes y líneas de glóbulos rojos NucLight compatibles con lapso de tiempo según lo recomendado por Essen Bioscience Inc. usando partículas lentivirales, infección y protocolos de selección con puromicina.

Anticuerpos y transferencias Western

Todos los anticuerpos diana y fosfoespecíficos se adquirieron de Cell Signaling y/o Epitomics, y se usaron en diluciones 1:1000. Una lista de todos los anticuerpos está disponible en la Tabla 6. Se usaron protocolos de inmunohistoquímica y transferencia Western basados en anticuerpos estándar. Brevemente, se usó amortiguador de lisis celular a base de SDS al 2% para recoger el lisado de células enteras para la transferencia Western. Los anticuerpos secundarios y los protocolos de tinción se adquirieron y se siguieron con respecto a LiCor Biosciences y/o BD Bioscience.

Tabla 6

Diana	Compañía	Nº de catálogo
ATR	Cell Signaling Technology	2790
ATR fosfo (S428)	Cell Signaling Technology	2853
CHK1 fosfo (S317)	Cell Signaling Technology	12302
CHK1 fosfo (S345)	Cell Signaling Technology	2348
H2AX fosfo (S139)	Cell Signaling Technology	9718
beta-actina	Cell Signaling Technology	4970

Protocolo de lisis de células enteras

Las células se cultivaron y trataron en una báscula de plato de 6 cm. Para recolectar las células, el medio se retiró y se reemplazó rápidamente por PBS enfriado con hielo. A continuación, el PBS se reemplazó por 250 μl de amortiguador de lisis SDS al 2%. Después de cinco minutos de incubación, las células lisadas se rasparon y se cargaron en una columna giratoria de microcentrífuga homogeneizadora de lisado celular (QIAshredder, Qiagen, nº de cat. 79656). A continuación, el filtrado se cargó en una columna de filtro centrífugo de 0,2 μm (Nanosep MF 0,2_m, Pall, nº de cat. ODM02C34). A continuación, los lisados se almacenaron a -80ºC.

El amortiguador de lisis que contiene SDS al 2% (Tabla 7) se modificó de acuerdo con Steven et al., “Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways”, Nat Med 10, no. 12 (diciembre de 2004): 1390-1396.

Tabla 7

pH valorado = 6,8	Conc. final
Trizma-Base	50 mM
SDS	2%
Glicerol	5%
EDTA	5 mM
NaF	1 mM

Ejemplo 16: Identificación de panel amplio de cinasas (359)

Los resultados principales de 359 fueron: ALK, ARK, c-MER, CLK1, DYRK, GSK3a, GSK3b, FLT2, FLT3, MLK1, SIK2, TNIK, y YSK4.

Tabla 8

Cinasa:	Compuesto 5 (M)	Log IC_{50}	Cinasa:	nM
ALK1/ACVRL1	3,57E-08	-7,45	ALK1/ACVRL1	35,7
ALK2/ACVR1	1,66E-08	-7,78	ALK2/ACVR1	16,6
ARK5/NUAK1	1,68E-08	-7,78	ARK5/NUAK1	16,8
CLK1	1,34E-07	-6,87	CLK1	134
CLK4	8,86E-08	-7,05	CLK4	88,6
DDR1	1,91E-07	-6,72	DDR1	191
DYRK2	7,18E-08	-7,14	DYRK2	71,8
FLT4/VEGFR3	6,34E-08	-7,20	FLT4/VEGFR3	63,4
GSK3a	5,73E-09	-8,24	GSK3a	5,73
GSK3b	6,30E-08	-7,20	GSK3b	63
MLK1/MAP3K9	1,13E-08	-7,95	MLK1/MAP3K9	11,3
MLK2/MAP3K10	9,58E-09	-8,02	MLK2/MAP3K10	9,58
MLK3/MAP3K11	5,90E-09	-8,23	MLK3/MAP3K11	5,9
PIM1	7,26E-08	-7,14	PIM1	72,6
PKCmu/PRKD1	1,34E-07	-6,87	PKCmu/PRKD1	134
PKD2/PRKD2	1,57E-07	-6,80	PKD2/PRKD2	157
RET	7,74E-08	-7,11	RET	77,4
SIK2	1,49E-07	-6,83	SIK2	149
TNIK	1,10E-07	-6,96	TNIK	110
YSK4/MAP3K19	2,92E-08	-7,53	YSK4/MAP3K19	29,2

Si bien la invención se ha descrito con respecto a realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es susceptible de modificaciones adicionales, y esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente

descripción que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y puedan aplicarse a las características esenciales expuestas aquí.

Ejemplo 17: Datos usando el Compuesto A como comparador.

Se realizó un ensayo de crecimiento y muerte celulares combinando el Compuesto A y Gemcitabina a diversas concentraciones en células U2OS. Los resultados se compararon con una predicción de crecimiento y muerte celulares con la combinación de los dos compuestos (Fig. 18A). También se determinó el número de células vivas y apoptóticas a concentraciones establecidas de Compuesto A (1 μM) y Gemcitabina (0,04 μM) en células USO2 (Fig. 18B). Los resultados muestran que la combinación de Compuesto A y Gemcitabina es mejor para promover la muerte celular que cualquier compuesto solo.

El Compuesto A también se evaluó solo y en combinación con SN38 a concentraciones establecidas (1 μM y 0,2 μM, respectivamente) en varias líneas celulares de cáncer de pulmón (NCI-H520 y NCI-H596) y células U2OS, monitorizándose el número de células a lo largo del tiempo. Los resultados indican que la combinación es más eficaz para mantener o reducir el número de células a lo largo del tiempo que el Compuesto A o el SN38 de forma aislada (Fig. 19).

También se realizaron ensayos de crecimiento *in vitro* con el Compuesto A y SN38, en combinación y solos, en la línea celular de cáncer de cuello uterino MS-751. Los ensayos *in vitro* muestran una reducción en el número de células a lo largo del tiempo con la combinación, en comparación con cualquier compuesto solo (Fig. 20).

Ejemplo 18: Comparación del Compuesto A y el Compuesto 5 en combinación con Gemcitabina o SN38.

Se realizaron ensayos *in vitro* de crecimiento y muerte celulares combinando el Compuesto A o el Compuesto 5 con Gemcitabina a diversas concentraciones en las líneas celulares U2OS, H358 y A549. Los resultados indican las concentraciones de cada compuesto y Gemcitabina que se requieren para desencadenar la muerte celular (Fig. 21A). También se evaluaron concentraciones establecidas de Compuesto 5 y Gemcitabina, o Compuesto A y Gemcitabina, en células USO2 y H358. En todos los casos, la proliferación celular relativa se reduce con las combinaciones, en comparación con los fármacos solos (Fig. 21B-C).

El Compuesto A o el Compuesto 5 se usó en combinación con SN38 en células A549. El crecimiento celular se midió a lo largo del tiempo y en un intervalo de concentraciones. La curva de crecimiento a la concentración óptima de Compuesto/SN38 está resaltada (Fig. 22A). La proliferación relativa de células A549 se midió con el Compuesto A o el Compuesto 5 solo, en un intervalo de concentraciones (Fig. 22B).

Los valores de IC50 se determinaron en varias líneas celulares usando una concentración establecida de Gemcitabina con concentraciones variables de Compuesto A o Compuesto 5 (Fig. 23).

En la Fig. 24 se proporciona un resumen de las líneas celulares de cáncer de pulmón que responden al Compuesto A o al Compuesto 5 en combinación con Gemcitabina o SN38.

Ejemplo 19: Comparaciones en la diana y fuera de la diana del Compuesto A y el Compuesto 5.

Se evaluaron diversos inhibidores de ATR para determinar su capacidad para inhibir ATR (en la diana) y ATM (fuera de la diana). La inhibición se da a conocer como IC50 en nM (Fig. 25A). Igualmente, las cinasas “fuera de la diana” adicionales se evaluaron con el Compuesto A o el Compuesto 5 (Fig. 25B).

El ensayo en la diana se realizó con el Compuesto A o el Compuesto 5 en células de cáncer de pulmón A549 (Fig. 26A-B), células de cáncer de pulmón H23 (Fig. 26C-D) y células DMS-114 (Fig. 26E-F). La fosforilación de CHK1 S345, una lectura de la inhibición de ATR, se midió mediante transferencia Western. Cada compuesto se usó también con una concentración fija de Gemcitabina.

Se realizaron estudios en la diana adicionales en la línea celular HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC, y DMS-114. Se usó una concentración establecida de SN38 con un intervalo de concentraciones de Compuesto A o Compuesto 5. Se evaluaron y midieron varios parámetros de actividad en la diana mediante transferencia Western (Fig. 27A-B)

Los perfiles de las etapas del ciclo celular de las células SUM149 se determinaron 24 horas después de la adición de SN38 y el Compuesto A o el Compuesto 5 (Fig. 28). Un mayor porcentaje de células se detiene en la fase G2 cuando recibe la combinación de fármacos en comparación con los controles.

Ejemplo 20: Comparación de formulaciones liposomales del Compuesto A y Compuesto 5 combinados con MM398.

Se usaron modelos de xenoinjerto de pulmón DMS-114 para medir los efectos del Ls-Compuesto A o Ls-Compuesto 5 en combinación con MM398. Se usó una dosis establecida de MM398 (5 mpk) con dos dosis diferentes de Compuesto A o Compuesto 5 (20 mpk u 80 mpk). Los efectos del tratamiento se evaluaron midiendo los niveles de fosforilación de CHK1 S345 (Fig. 29).

Los efectos del Ls-Compuesto A con MM398 también se evaluaron en la línea celular SUM-149. Los efectos del tratamiento se evaluaron midiendo los niveles fosforilados de RPA2, DNAPK, CHK1 y γH2AX. El Ls-Compuesto 5 también se evaluó sin la combinación de MM398 (Fig. 30A-C).

Ejemplo 21: Eficacia antitumoral in vivo y tolerabilidad del Ls-Compuesto 5 preparado usando TEA.SOS contra xenoinjertos de cáncer de mama triple negativo en ratones

La eficacia antitumoral de los liposomas cargados con un inhibidor de ATR, Compuesto 5, en combinación con MM-398 (irinotecán liposomal), y se estudió en el modelo de línea celular SUM-149 (cáncer de mama triple negativo) humana.

Las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD), y se propagaron en medio RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G, y 50 μg/ml de sulfato de estreptomicina, a 37ºC, 5% de CO2, según lo recomendado por el proveedor. Se obtuvieron ratones machos atímicos homocigotos NCR nu/nu (4-5 semanas, peso de al menos 16 g) de Charles River. Los ratones se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho con 0,1 ml de la suspensión que contenía 107 células suspendidas en PBS suplementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño entre 150 mm3 y 350 mm3, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento según el siguiente método. Los animales se clasificaron según el tamaño del tumor, y se dividieron en 6 categorías de tamaño decreciente del tumor. Se formaron cuatro grupos de tratamiento de 10 animales/grupo, seleccionando aleatoriamente un animal de cada categoría de tamaño, de modo que en cada grupo de tratamiento todos los tamaños del tumor estuvieran igualmente representados. Los animales recibieron cinco inyecciones en la vena de la cola, a intervalos de 7 días, de las siguientes preparaciones: 1) Control (disolución salina amortiguada con HEPES pH 6,5); 2) MM-398, a una dosis de 5 mg/kg por inyección; 3) Compuesto 5 liposomal, a 80 mg/kg por inyección; 4) MM-398, seguido de inyecciones del Compuesto 5 liposomal con un intervalo de 24 h; 5) MM-398, seguido de inyecciones del inhibidor de ATR Compuesto A libre sin encapsular. Los liposomas para inyecciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 10.

El peso del animal y el tamaño del tumor se monitorizaron dos veces por semana. La progresión del tumor se monitorizó mediante palpación y medidas de vernier de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces por semana. Los tamaños de los tumores se determinaron dos veces por semana a partir de las medidas del vernier usando la fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = [(\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2]/2$$

Para evaluar la toxicidad asociada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces por semana. Cuando los tumores del grupo alcanzaron el 10% del peso corporal del ratón, los animales del grupo se sacrificaron. Los volúmenes tumorales medios entre los grupos se representaron gráficamente juntos y se compararon a lo largo del tiempo.

Como se demuestra en la Figura 31, el inhibidor de ATR liposomal, Compuesto 5, mejoró significativamente la eficacia antitumoral de MM-398 en el modelo de xenoinjerto. El tratamiento combinado de inhibidor de ATR liposomal y MM-398 no afectó el peso corporal de los animales (Figura 32).

Ejemplo 22: perfilado de líneas celulares, y comparación con datos de Incucyte

Un panel de líneas celulares marcadas fluorescentemente se perfiló para diversas proteínas involucradas en la ruta del daño al ADN. Las líneas celulares de cáncer parentales se transdujeron con un lentivirus NucLight Red y se seleccionaron con puromicina. Los niveles de proteína basal se midieron y cuantificaron mediante análisis de transferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal de los marcadores PD se normalizó a la señal de beta actina. Los niveles de proteína se correlacionaron con la “puntuación integral” de la línea celular, una medida de la respuesta celular in vitro al tratamiento combinado con Compuesto 5 y quimioterapia. La puntuación integral se puede calcular de la siguiente manera:

Haciendo referencia a las Figuras 33 y 34, las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos, y cada pocillo se expuso a una matriz de dosis del Compuesto 5 y quimioterapia durante 4 días. La viabilidad celular dinámica se midió usando un ensayo Incucyte. Para cada combinación de fármacos en la matriz de dosis, se calculó una puntuación integral específica de la combinación de dosis sumando el área bajo la curva de proliferación celular normalizada. Se calculó una puntuación integral específica de línea celular promediando las cuatro puntuaciones más altas a lo largo de la matriz de dosis.

Haciendo referencia a las Figuras 35 y 36, se observó que, en las líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al Compuesto 5 y SN38, los niveles de proteína MRE11 basal y los niveles de ATM basal se correlacionaron significativamente con las puntuaciones integrales de la línea celular. En las células de cáncer de pulmón que tienen un antecedente comprometido de p53 y que se expusieron al Compuesto 5 y SN38, la puntuación integral se correlaciona con los niveles de proteína NBS, MRE11 y RAD50. Las células con “p53 comprometida” son aquellas que tienen niveles basales de proteína p53 distintos de cero (en la mayoría de las células, los niveles de p53 solo son visibles en transferencias Western después del tratamiento). (véanse la Figura 37, Figura 38 y Figura 39).

Ejemplo 23: Experimento de señalización: Compuesto 5 frente a Compuesto A en combinación con SN38: 6 marcadores PD diferentes

Haciendo referencia a las Figuras 40-44: Los marcadores farmacodinámicos pChk1, pRPA2, pATR, pDNAPK, pChk2 y γH2AX se cuantificaron mediante transferencia Western después de que las líneas de células cancerosas se expusieran a diversas dosis del Compuesto 5 o el Compuesto A en combinación con SN38. Se sembraron células HCC70, DMS114, MDAMB468, NCIH1299 y NCIH460 en placas de 12 pocillos, se dejaron incubar durante la noche, y después se expusieron a SN38 y/o al inhibidor de ATR. Después de 24 horas de exposición al fármaco, las células se lisaron para transferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal de los marcadores PD se normalizó a la señal de beta actina.

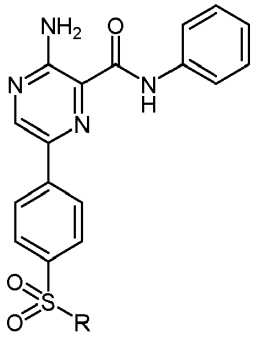
Ejemplo 24: Experimento de señalización: Compuesto 5 frente a Compuesto A en combinación con gemcitabina: 3 marcadores PD diferentes

Haciendo referencia a las Figuras 45-50: Se perfilaron seis líneas celulares marcadas fluorescentemente para diversas proteínas implicadas en la ruta del daño al ADN tras la exposición a un inhibidor de ATR y/o gemcitabina. Las líneas celulares de cáncer parentales se transdujeron con un lentivirus NucLight Red y se seleccionaron con puromicina. Los marcadores farmacodinámicos pChk1, pATR y γH2AX se cuantificaron mediante transferencia de Western después de que las líneas de células cancerosas se expusieran a diversas dosis del Compuesto 5 o el Compuesto A en combinación con gemcitabina 16 nM. Se sembraron células A549, NCIH23, DMS114, U20S, HCC827 y NCIH460 en placas de 12 pocillos, se dejaron incubar durante la noche, y después se expusieron a SN38 y/o al inhibidor de ATR. Después de 6 o 18 horas de exposición al fármaco, las células se lisaron para transferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal de los marcadores PD se normalizó a la señal de beta actina.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de liposoma que comprende un compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, encapsulado en un liposoma; en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es:

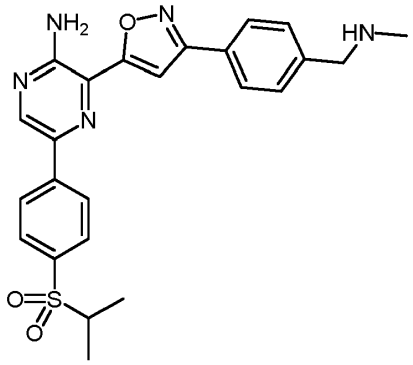
(a) un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I),

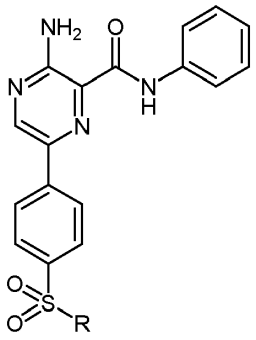
en la que R es un resto que comprende una amina con un pK_a mayor que 7,0; o

(b) Compuesto A:



(Compuesto A).

2. La composición de liposoma de la reivindicación 1, en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



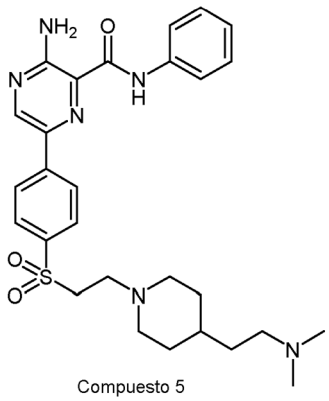
(I),

en la que R es un resto que comprende una amina con un pK_a mayor que 7,0.

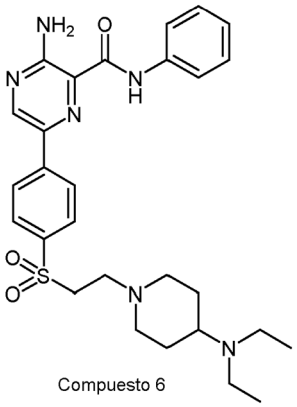
3. La composición de liposoma de la reivindicación 1 o 2, en la que R en la fórmula (I) es un resto que comprende una amina con un pK_a mayor que 8,0.

4. La composición de liposoma de la reivindicación 1 o 2, en la que R en la fórmula (I) es un resto que comprende una amina con un pK_a de al menos alrededor de 9,5.

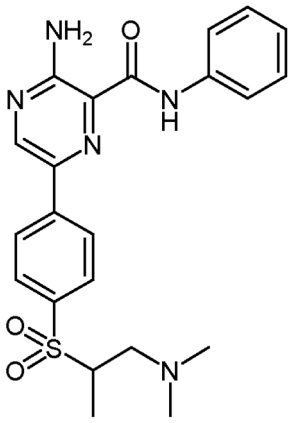
5. La composición de liposoma de la reivindicación 1, en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



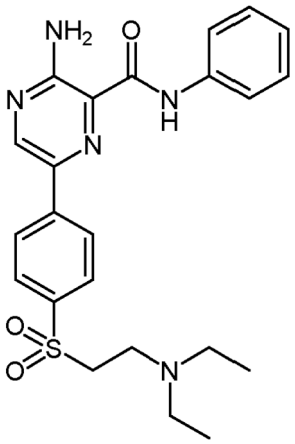
Compuesto 5 ,



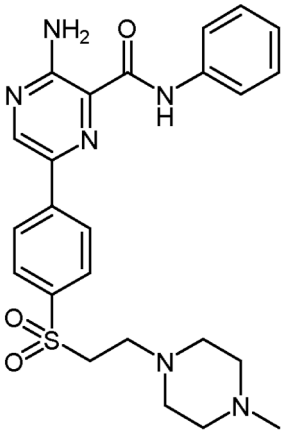
Compuesto 6 ,



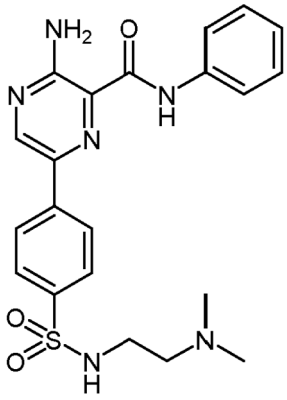
Compuesto 1 ,



Compuesto 2 ,

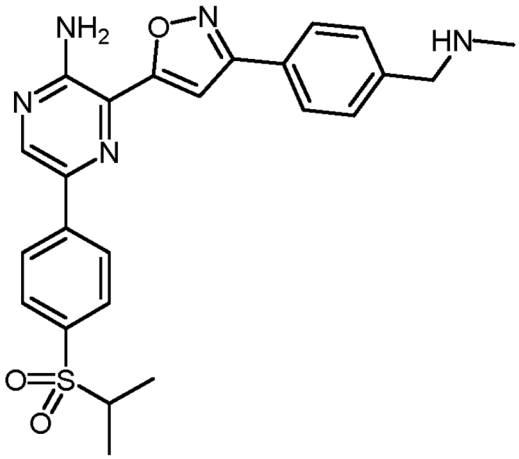


Compuesto 3 , y



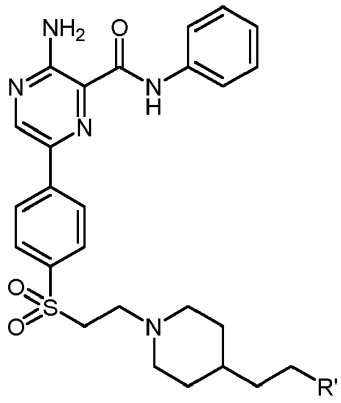
Compuesto 4 .

6. La composición de liposoma de la reivindicación 1, en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es el Compuesto A:



(Compuesto A).

7. La composición de liposoma de la reivindicación 1, en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR es un compuesto de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(Ia),

en la que R' es un resto alquil-amino que comprende una amina sustituida con alquilo terciario que tiene un pKa de 9,5 o mayor.

8. La composición de liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el liposoma comprende un fosfolípido y colesterol.

9. La composición de liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el liposoma comprende fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y colesterol.

10. La composición de liposoma de la reivindicación 9, en la que el liposoma comprende además PEG(2000)-diestearoilglicerol (PEG-DSG).

11. La composición de liposoma de la reivindicación 10, en la que el liposoma comprende HSPC, colesterol y PEG-DSG en una relación molar de alrededor de 3:2:0,15.

12. La composición de liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el compuesto inhibidor de la proteína cinasa ATR está en combinación con la formulación de liposoma de irinotecán MM-398.

13. La composición de liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11,

para uso en terapia, en la que la composición de liposoma es para uso en combinación con la formulación de liposoma de irinotecán MM-398.

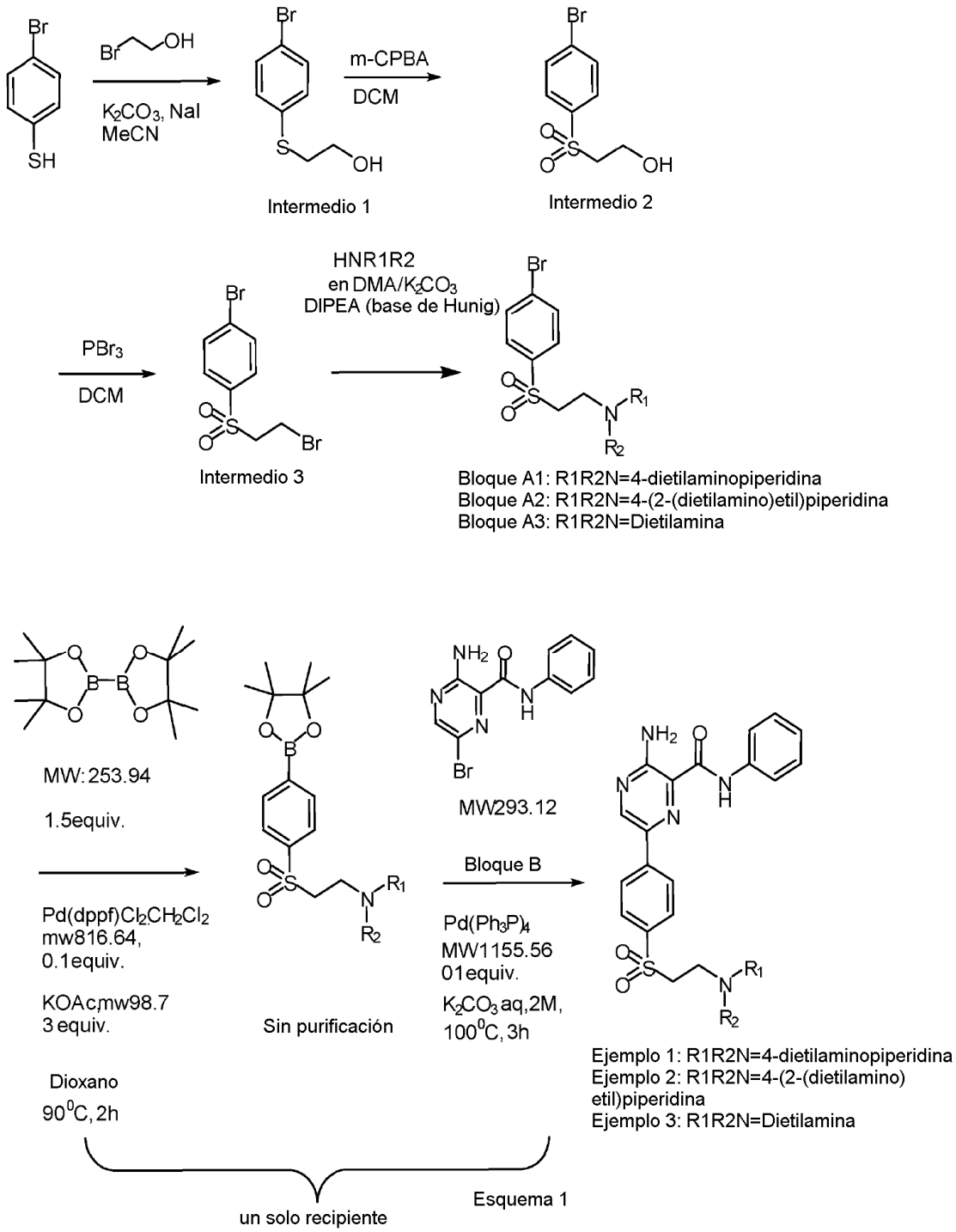

Br
SH
Br
OH
K2CO3, NaI
MeCN
Br
S
OH
Intermedio 1
m-CPBA
DCM
Br
O
S
O
OH
Intermedio 2
PBr3
DCM
Br
O
S
O
Br
Intermedio 3
HNR1R2
en DMA/K2CO3
DIPEA (base de Hunig)
Br
O
S
O
N
R1
R2
Bloque A1: R1R2N=4-dietilaminopiperidina
Bloque A2: R1R2N=4-(2-(dietilamino)etil)piperidina
Bloque A3: R1R2N=Dietilamina
MW: 253.94
1.5equiv.
Pd(dppf)Cl2.CH2Cl2
mw816.64,
0.1equiv.
KOAc;mw98.7
3 equiv.
Dioxano
90 0C, 2h
Sin purificación
NH2
O
N
N
H
N
Br
MW293.12
Bloque B
Pd(Ph3P)4
MW1155.56
01equiv.
K2CO3 aq,2M,
100 0C, 3h
Ejemplo 1: R1R2N=4-dietilaminopiperidina
Ejemplo 2: R1R2N=4-(2-(dietilamino)
etil)piperidina
Ejemplo 3: R1R2N=Dietilamina
un solo recipiente
Esquema 1

Fig. 1

Esquema 2

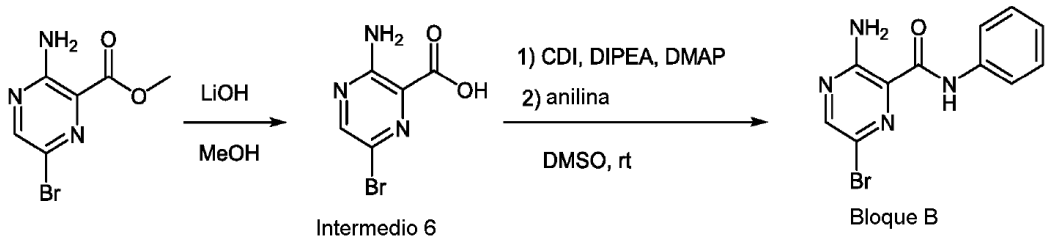


Fig. 2

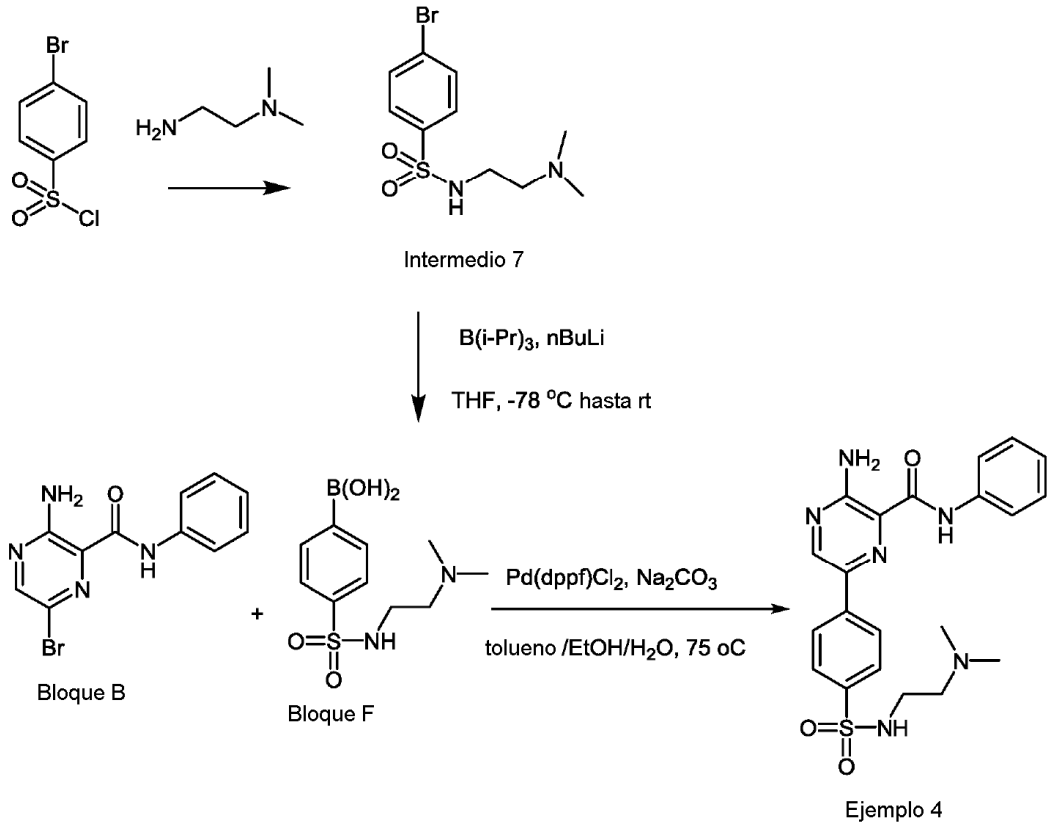


Fig. 3

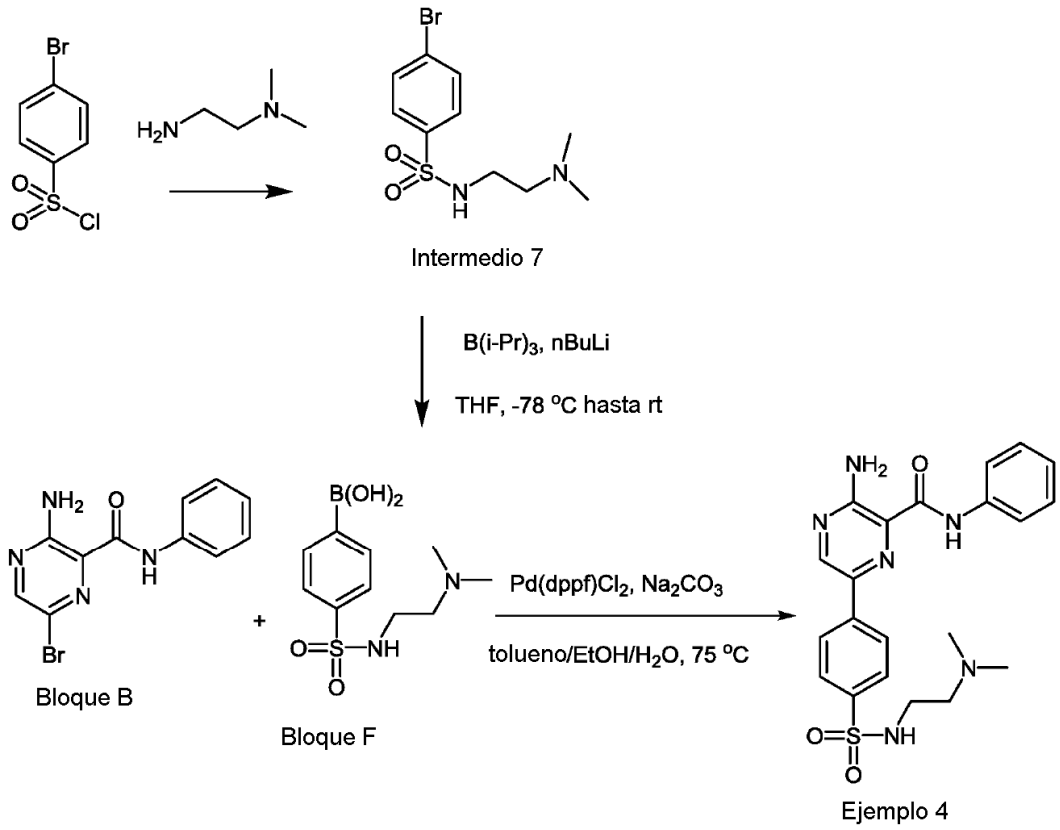

Br
H2N
N
O
S
O
Cl
Intermedio 7
B(i-Pr)3, nBuLi
THF, -78 ºC hasta rt
NH2
O
N
N
N
H
Br
Bloque B
+
B(OH)2
N
O=S–NH
O
Bloque F
Pd(dppf)Cl2, Na2CO3
tolueno/EtOH/H2O, 75 ºC
Ejemplo 4

Fig. 4

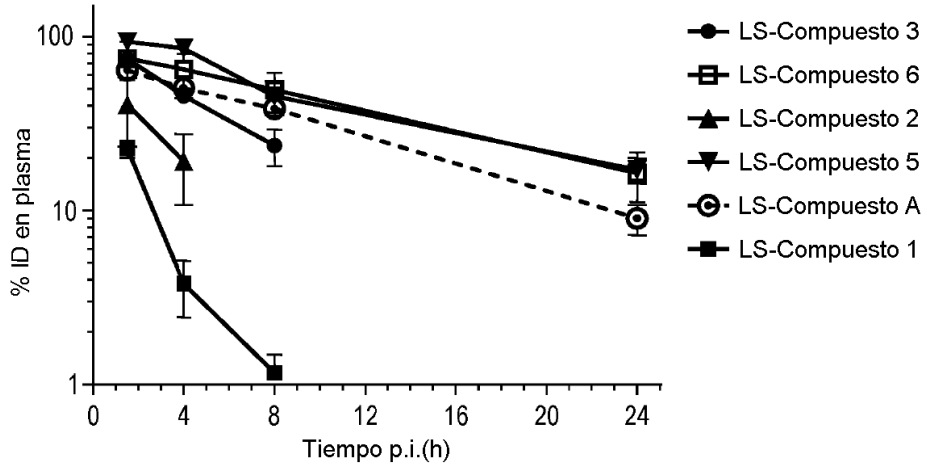

100
10
1
% ID en plasma
0
4
8
12
16
20
24
Tiempo p.i.(h)
LS-Compuesto 3
LS-Compuesto 6
LS-Compuesto 2
LS-Compuesto 5
LS-Compuesto A
LS-Compuesto 1

Fig. 5

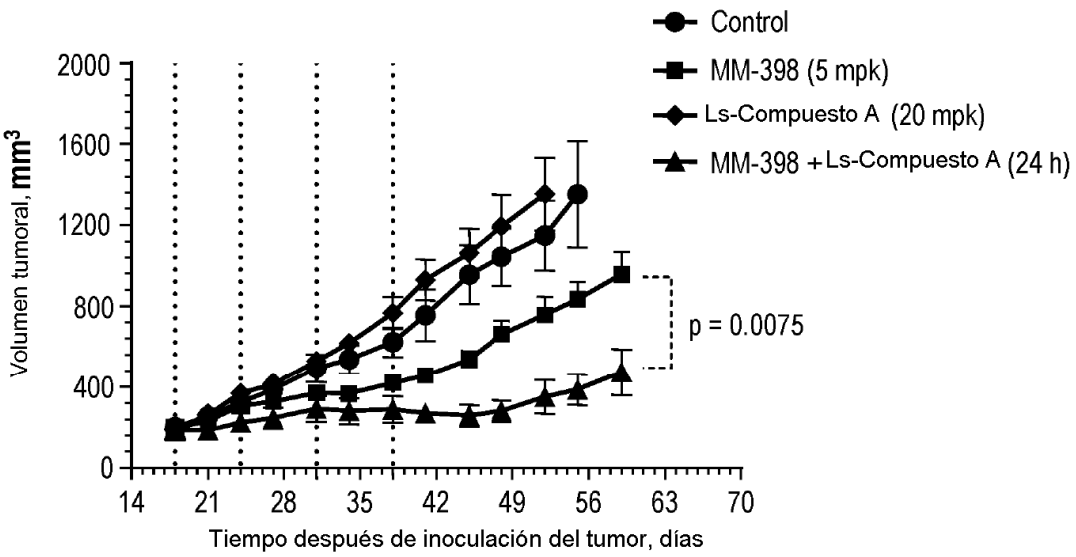

Control
MM-398 (5 mpk)
Ls-Compuesto A (20 mpk)
MM-398 + Ls-Compuesto A (24 h)
Volumen tumoral, mm3
2000
1600
1200
800
400
0
14
21
28
35
42
49
56
63
70
p = 0.0075
Tiempo después de inoculación del tumor, días

Fig. 6

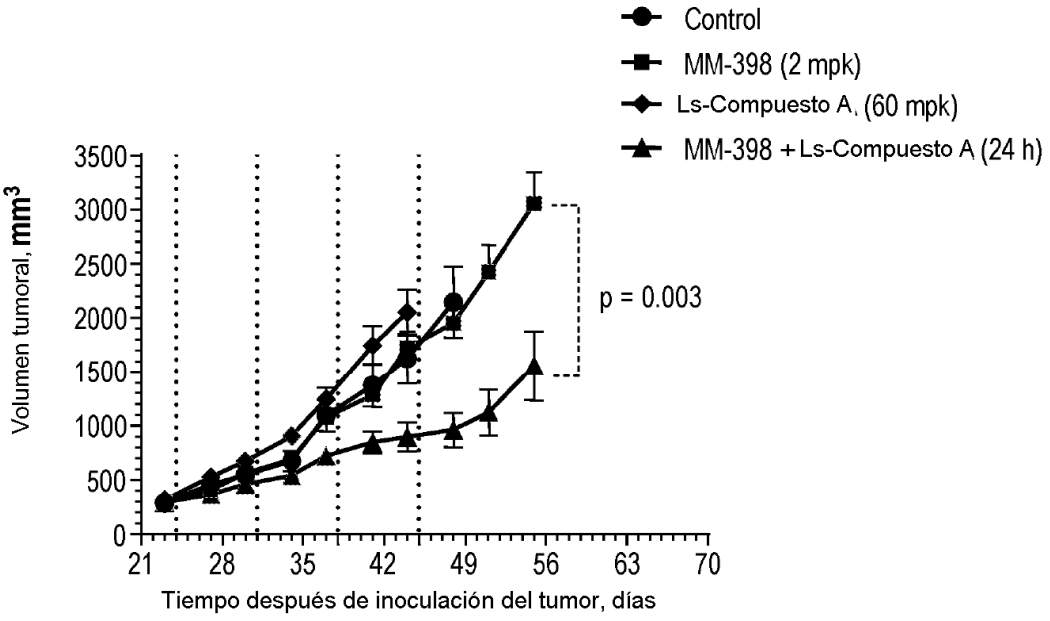

Control
MM-398 (2 mpk)
Ls-Compuesto A, (60 mpk)
MM-398 + Ls-Compuesto A (24 h)
Volumen tumoral, mm3
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
21
28
35
42
49
56
63
70
p = 0.003
Tiempo después de inoculación del tumor, días

Fig. 7

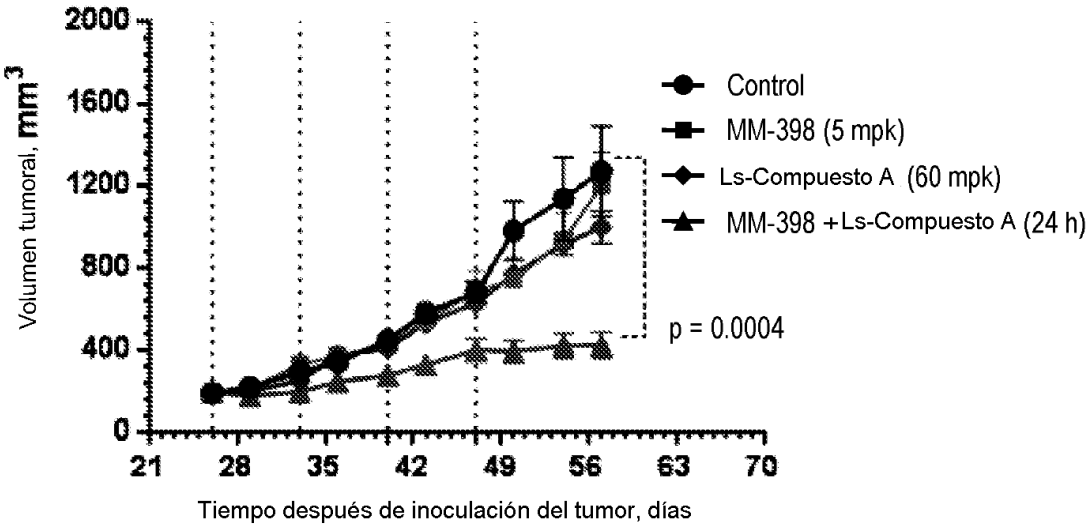

2000
1600
1200
800
400
0
Volumen tumoral, mm3
21
28
35
42
49
56
63
70
Tiempo después de inoculación del tumor, días
Control
MM-398 (5 mpk)
Ls-Compuesto A (60 mpk)
MM-398 +Ls-Compuesto A (24 h)
p = 0.0004

Fig. 8

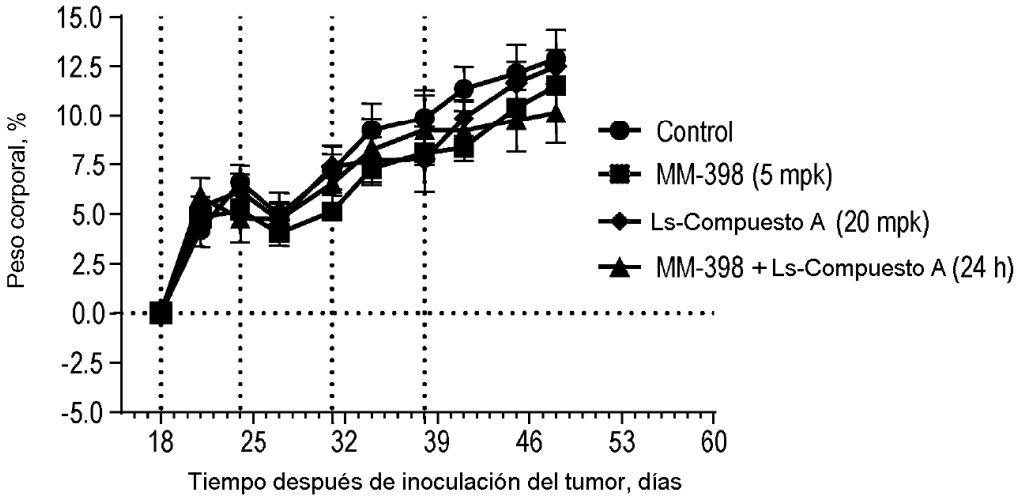

15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
-2.5
-5.0
Peso corporal, %
18
25
32
39
46
53
60
Tiempo después de inoculación del tumor, días
Control
MM-398 (5 mpk)
Ls-Compuesto A (20 mpk)
MM-398 + Ls-Compuesto A (24 h)

Fig. 9

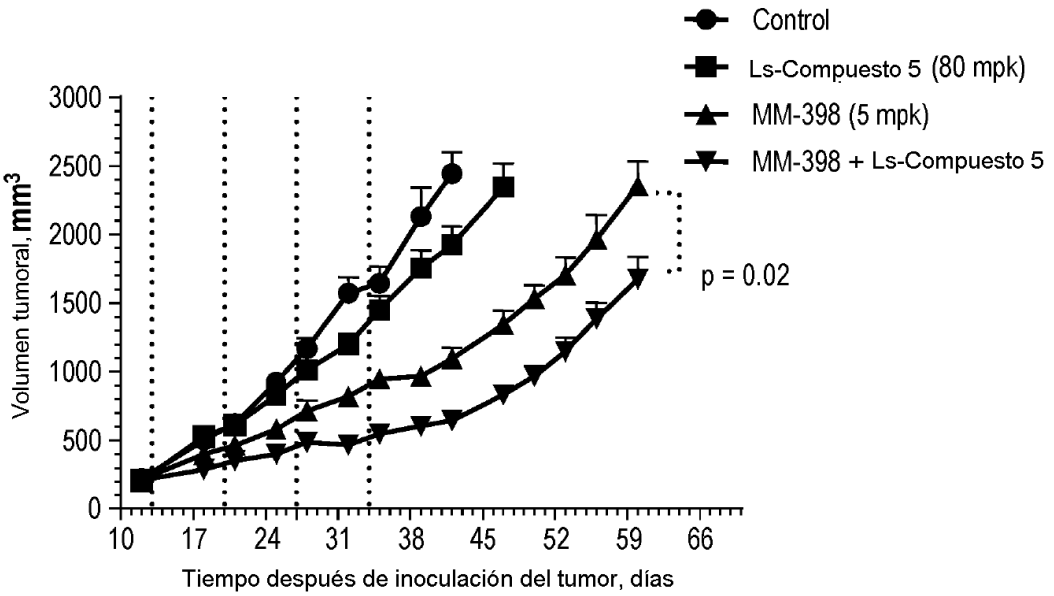


Fig. 10A

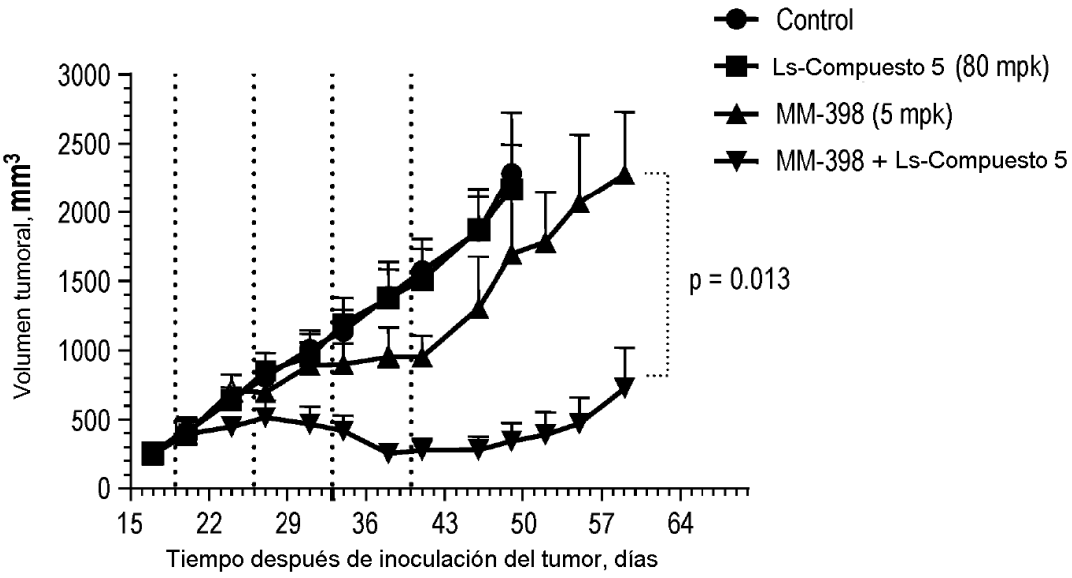


Fig. 10B

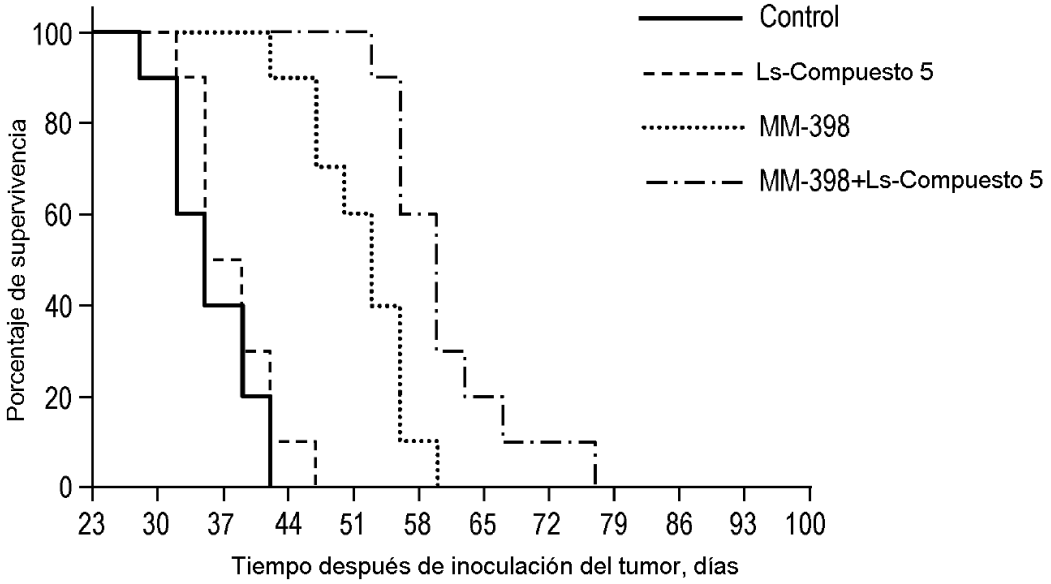


Fig. 11A

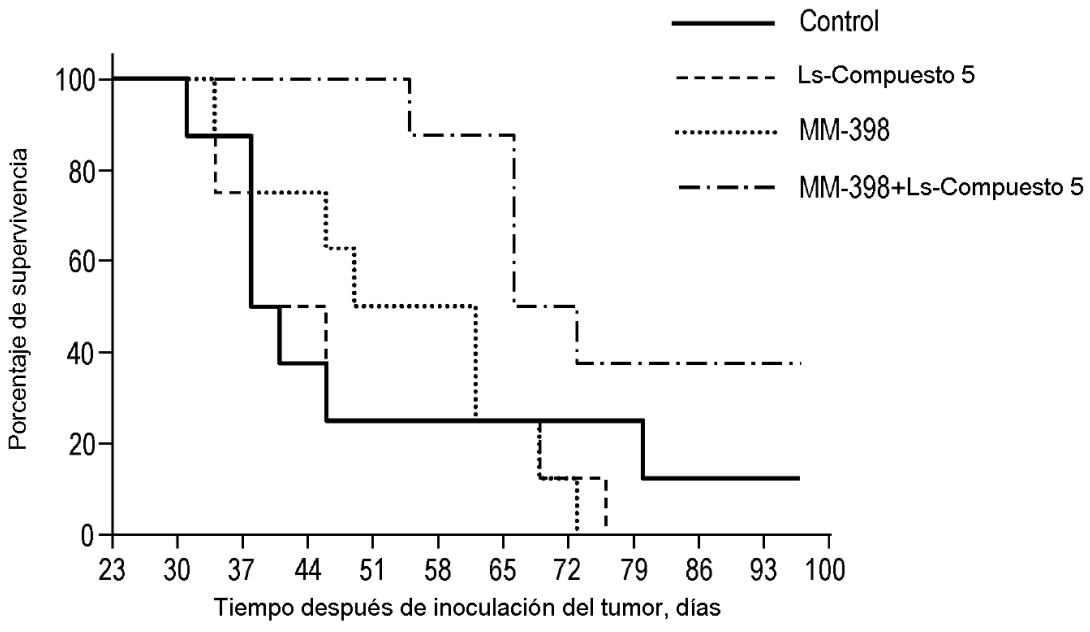


Fig. 11B

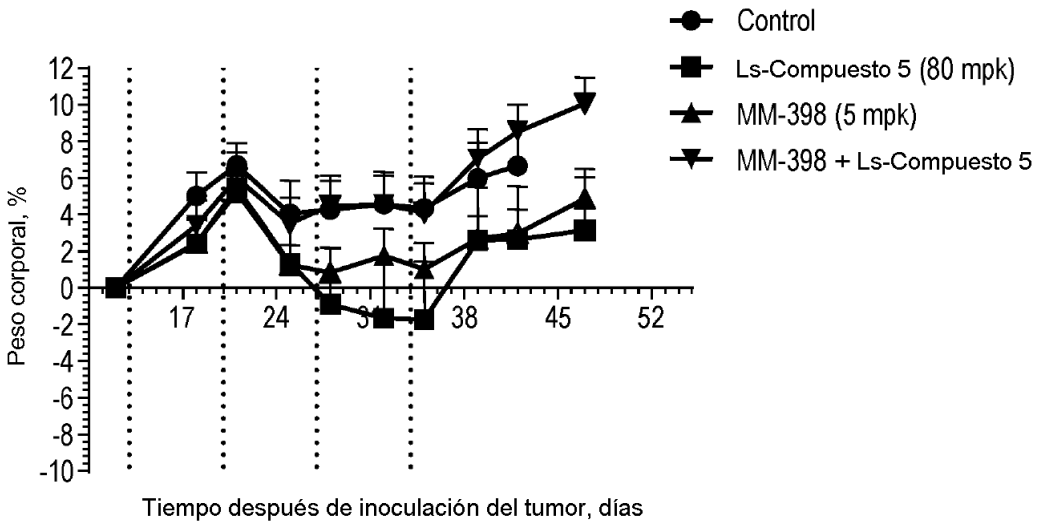


Fig. 12A

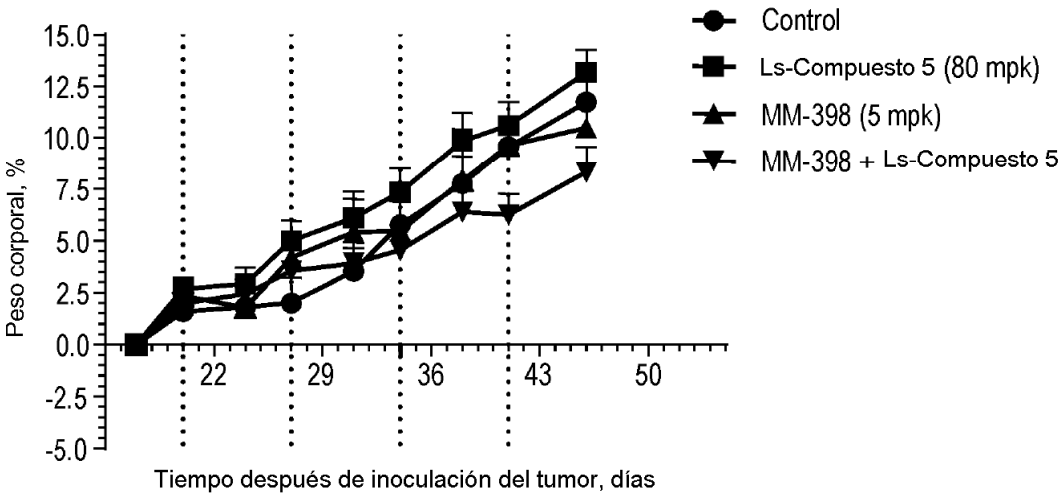


Fig. 12B

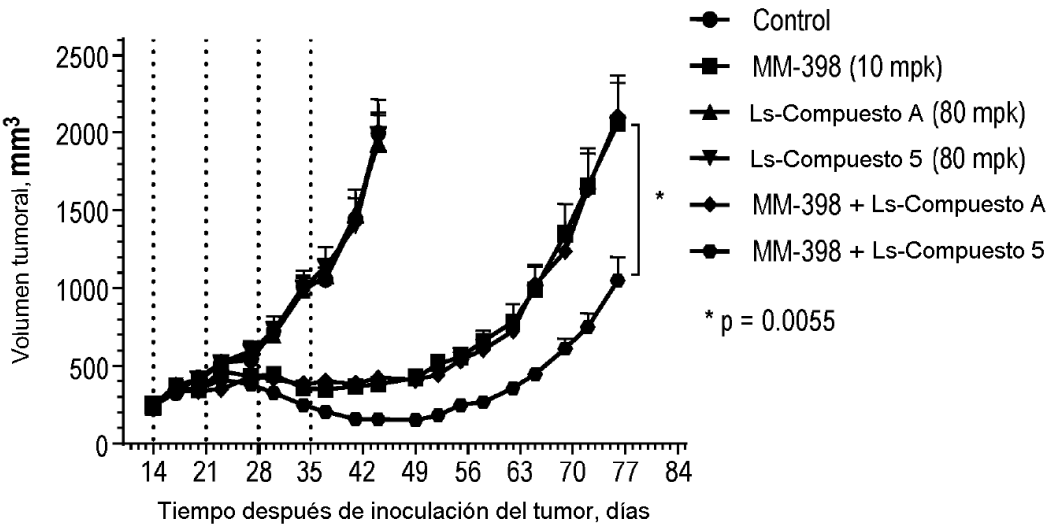


Fig. 13A

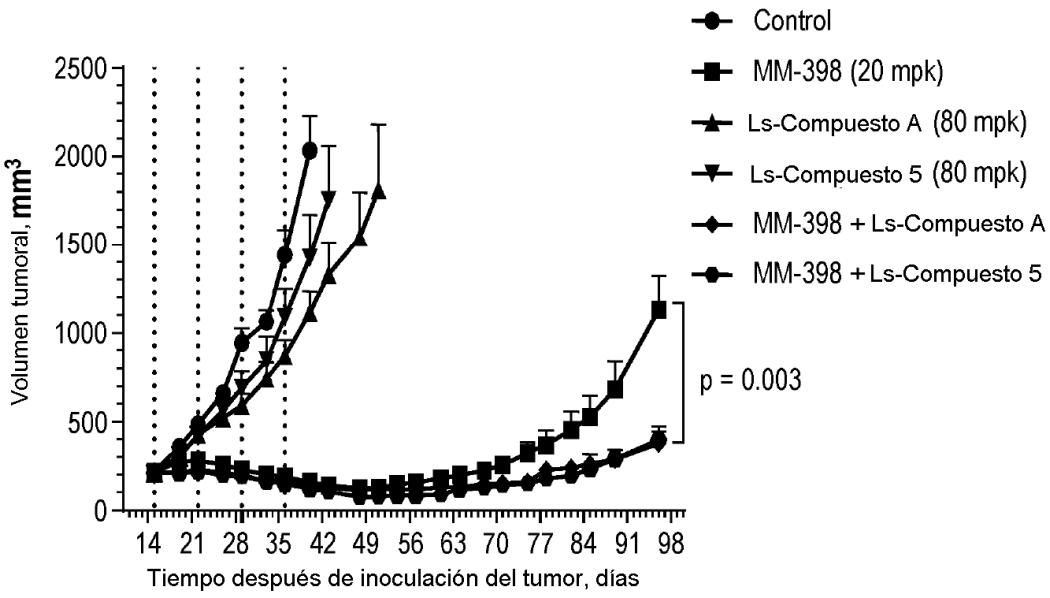


Fig. 13B

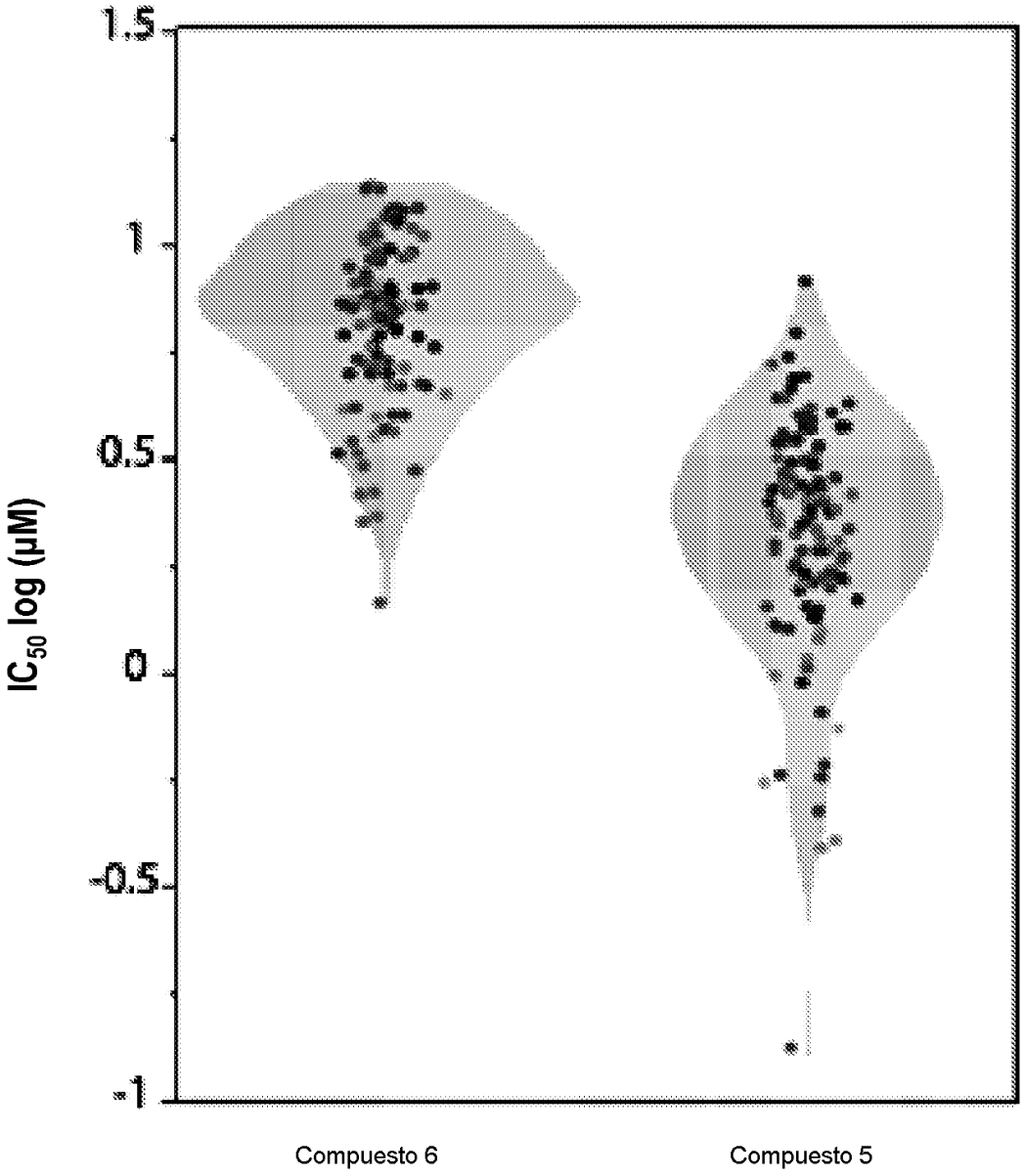


Fig. 14A

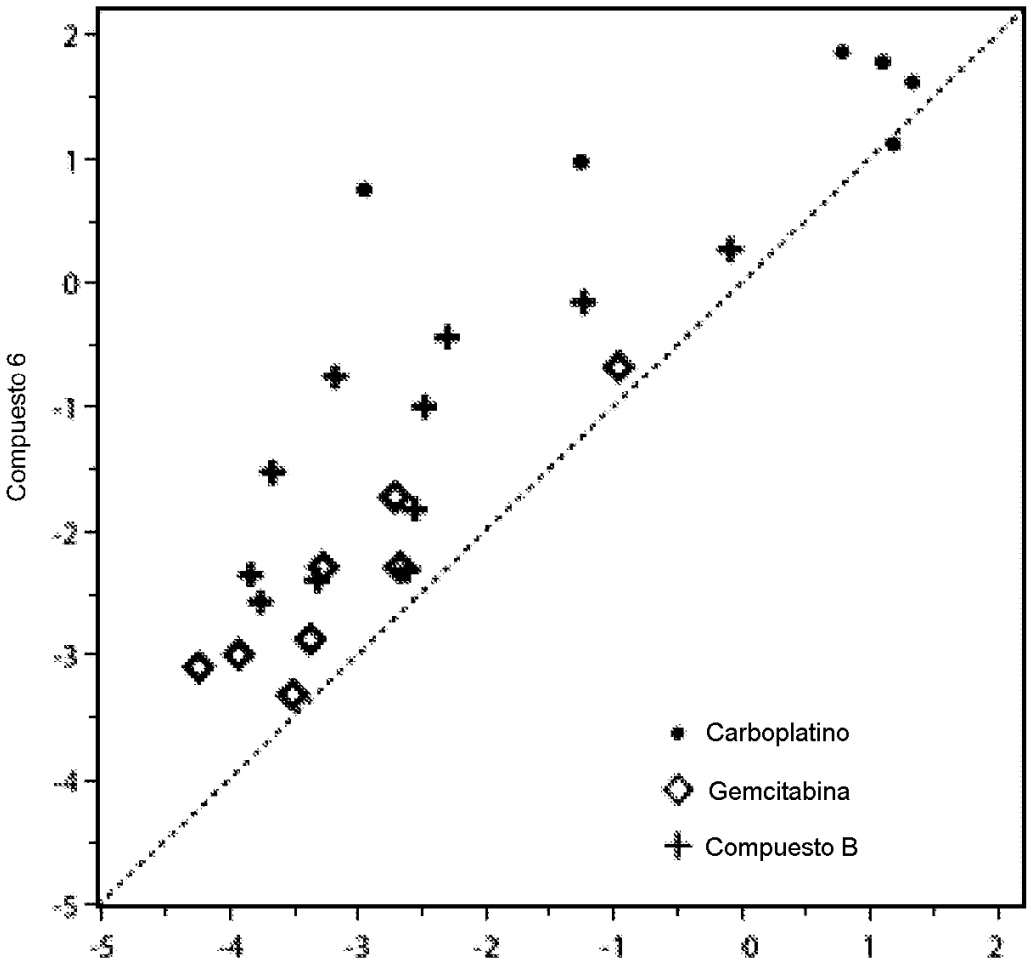

Compuesto 6
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Carboplatino
Gemcitabina
Compuesto B

Fig. 14B

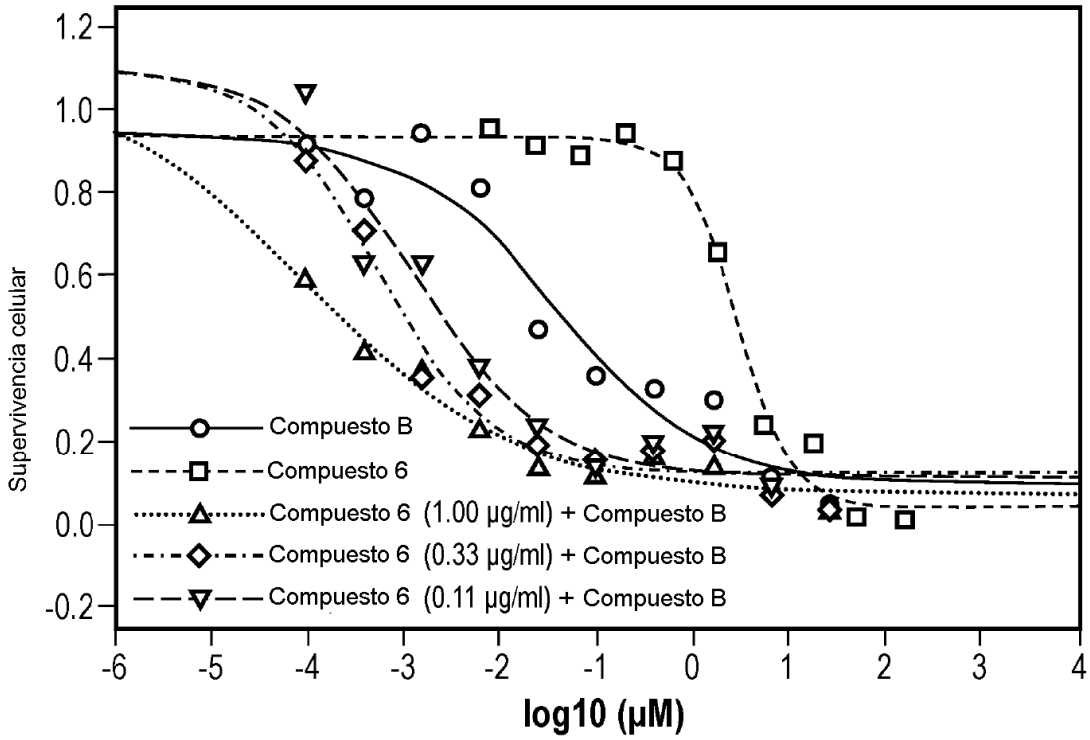

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Supervivencia celular
Compuesto B
Compuesto 6
Compuesto 6 (1.00 µg/ml) + Compuesto B
Compuesto 6 (0.33 µg/ml) + Compuesto B
Compuesto 6 (0.11 µg/ml) + Compuesto B
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log10 (µM)

Fig. 15

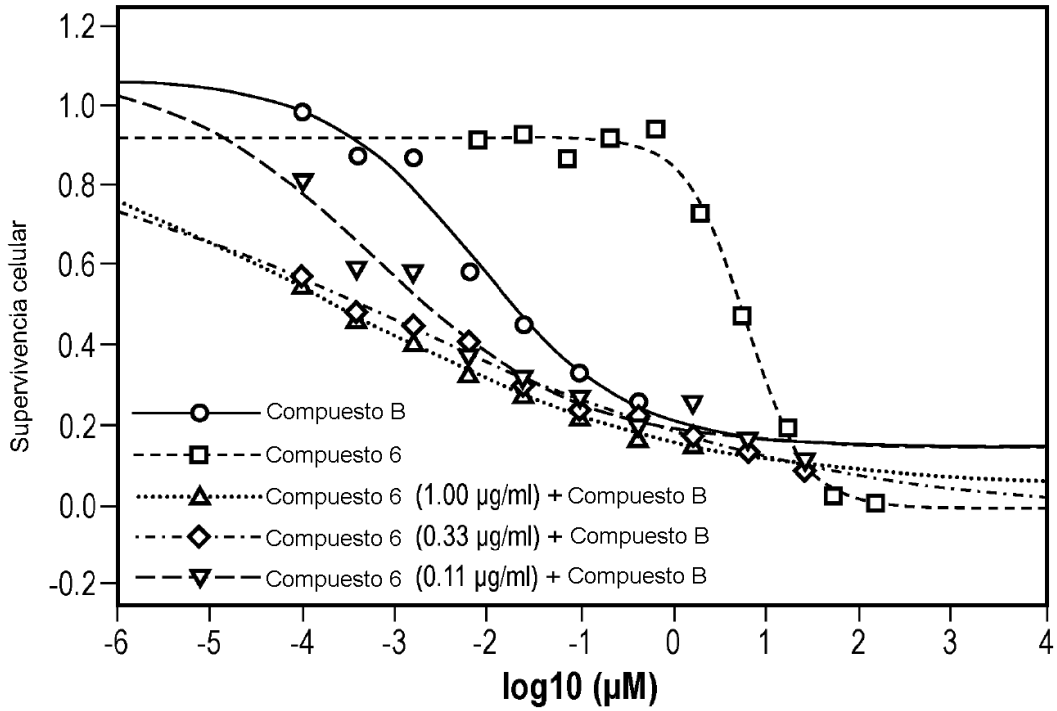


Fig. 16A

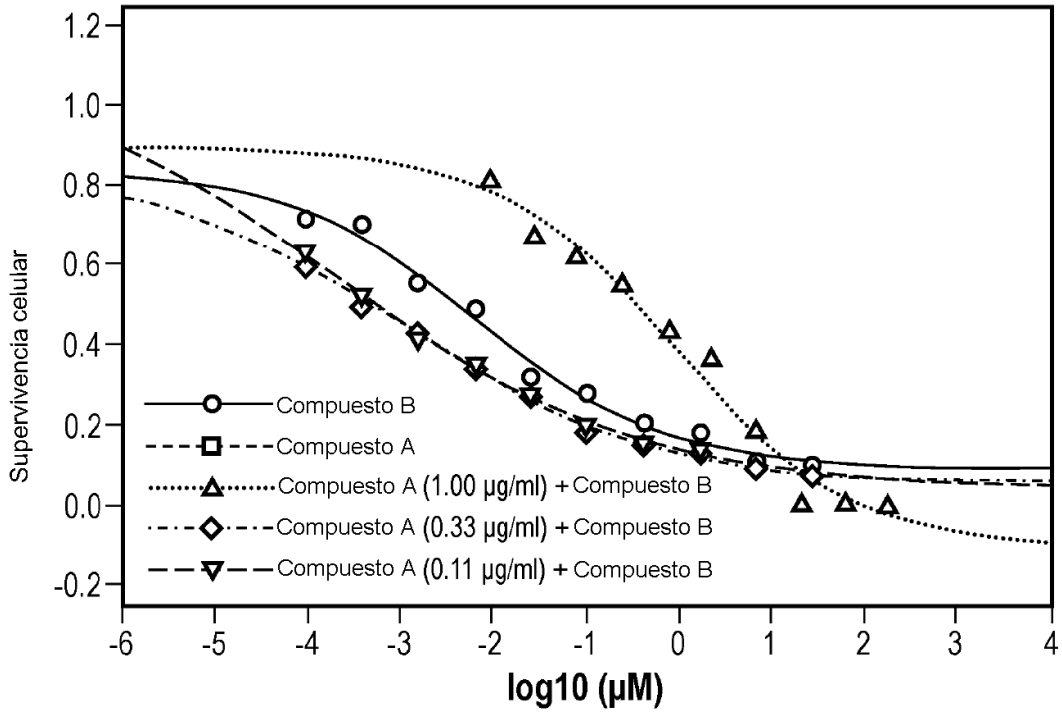


Fig. 16B

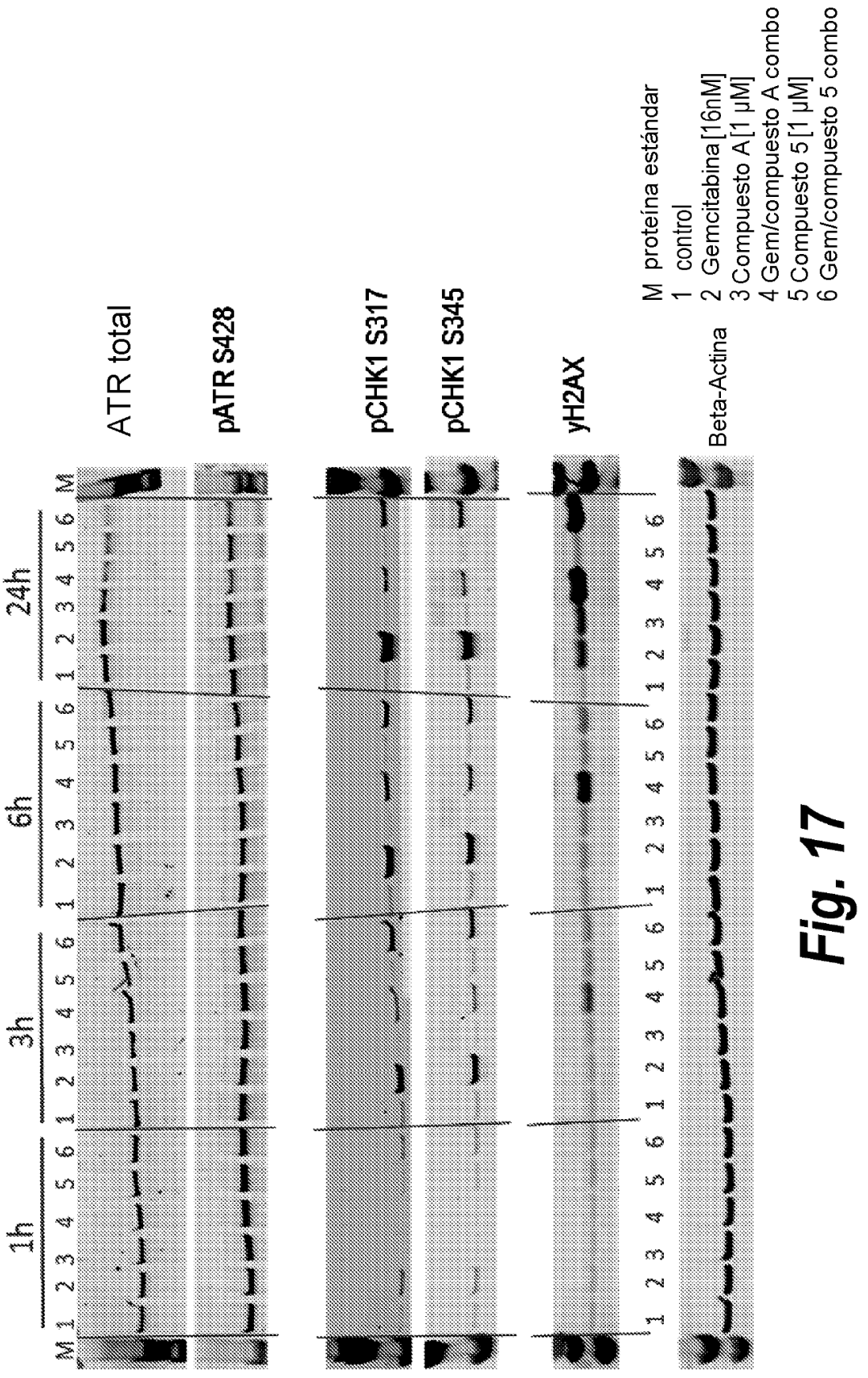

ATR total
pATR S428
pCHK1 S317
pCHK1 S345
γH2AX
Beta-Actina
1h
3h
6h
24h
M 1 2 3 4 5 6
M proteína estándar
1 control
2 Gemcitabina [16nM]
3 Compuesto A [1 µM]
4 Gem/compuesto A combo
5 Compuesto 5 [1 µM]
6 Gem/compuesto 5 combo

Fig. 17

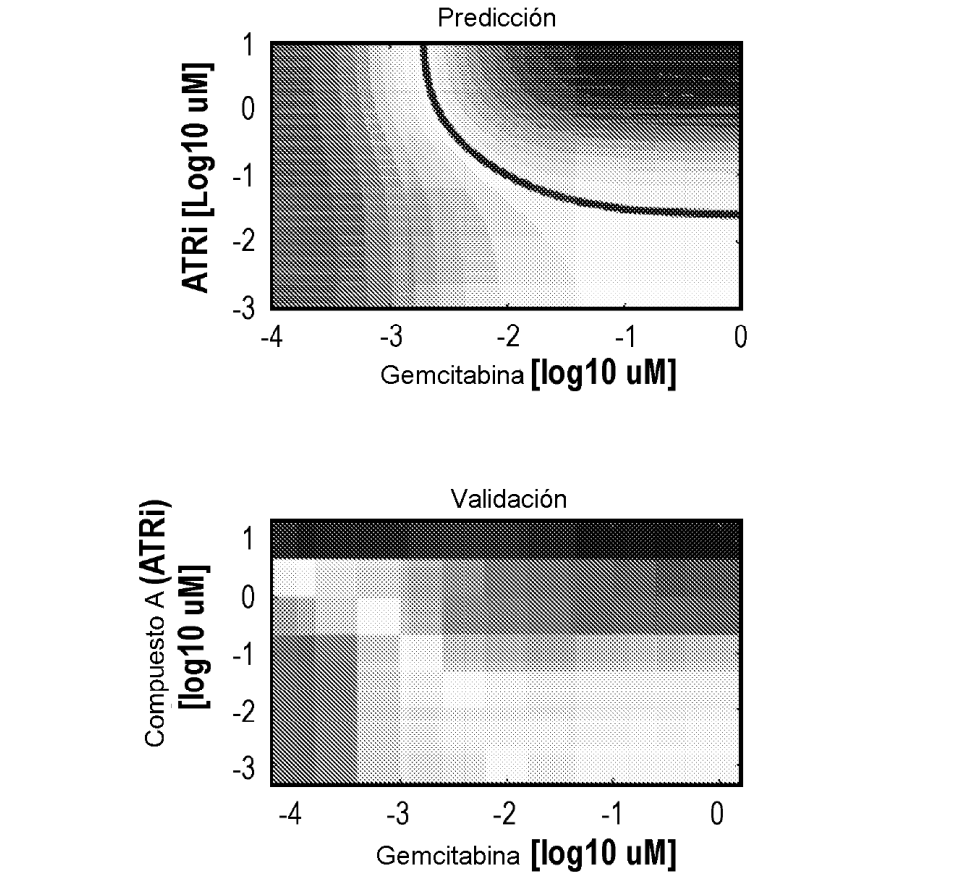
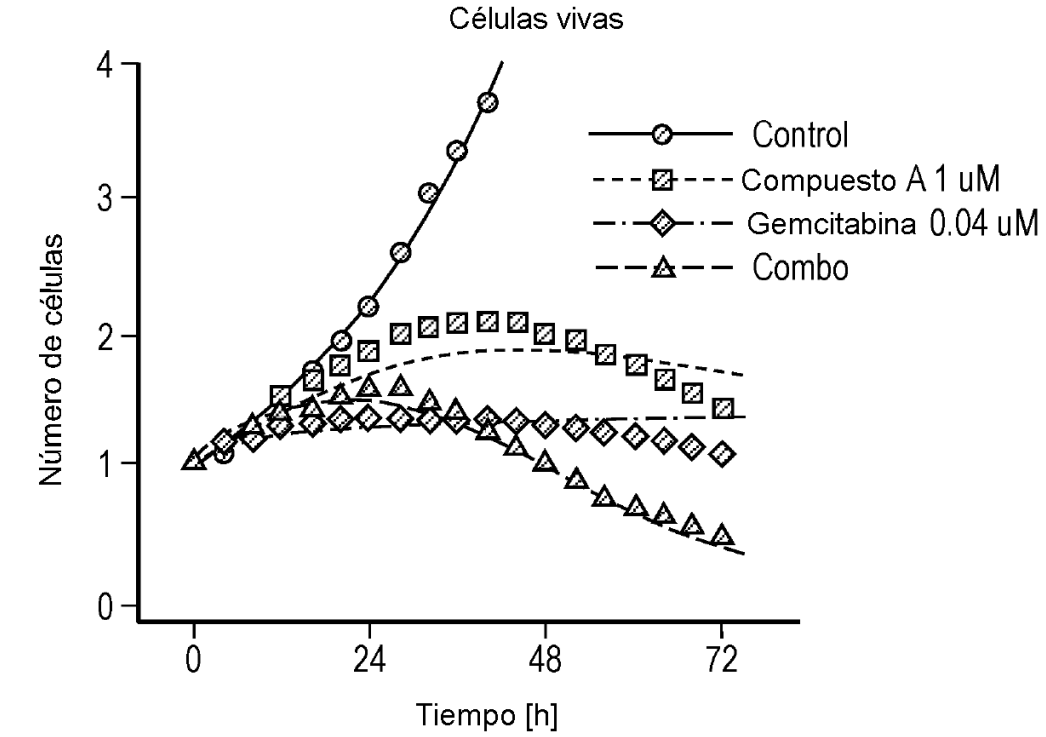

Predicción
ATRi [Log10 uM]
1
0
-1
-2
-3
-4
-3
-2
-1
0
Gemcitabina [log10 uM]
Validación
Compuesto A (ATRi) [log10 uM]
1
0
-1
-2
-3
-4
-3
-2
-1
0
Gemcitabina [log10 uM]
Log-10 del cambio en número de veces del número de células (con respecto al comienzo del tratamiento)
-1
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
Muerte
Estasis
Crecimiento

Fig. 18A


Células vivas
Número de células
Tiempo [h]
Control
Compuesto A 1 uM
Gemcitabina 0.04 uM
Combo
0
1
2
3
4
0
24
48
72

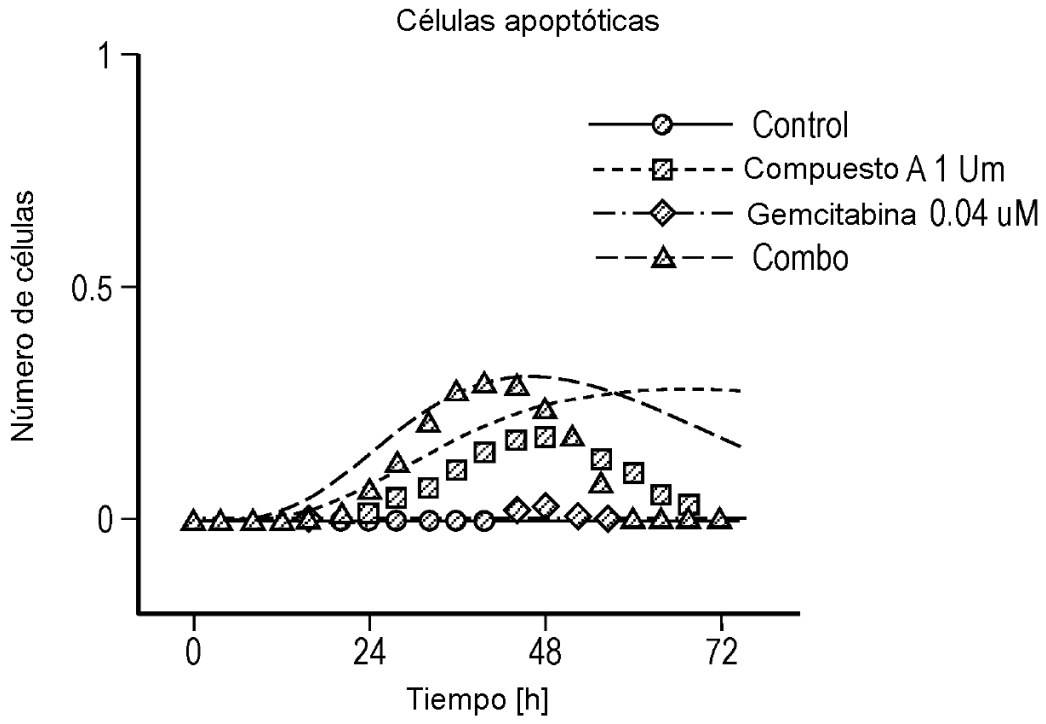

Células apoptóticas
Número de células
Tiempo [h]
Control
Compuesto A 1 Um
Gemcitabina 0.04 uM
Combo
0
0.5
1
0
24
48
72

Fig. 18B

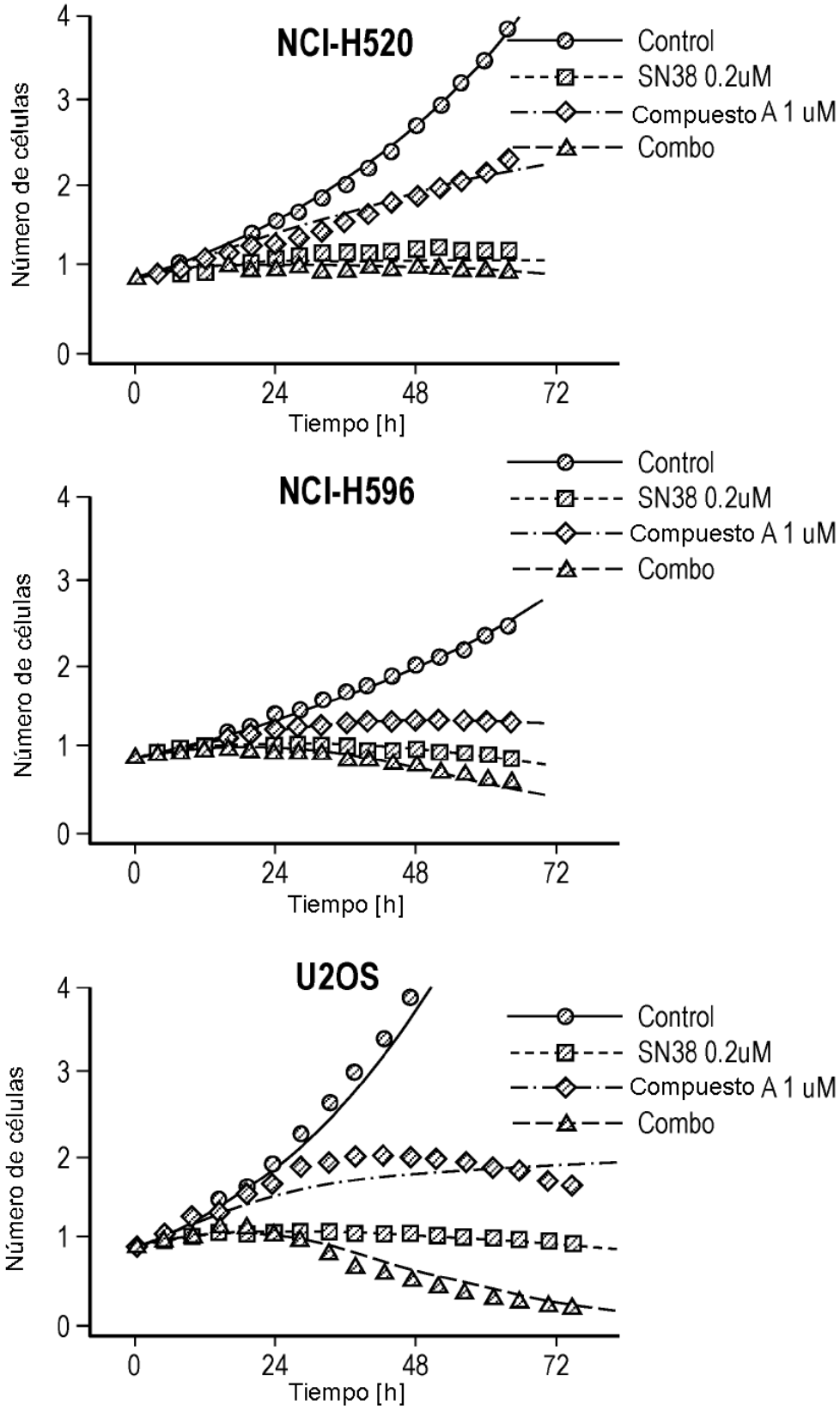

NCI-H520
Control
SN38 0.2uM
Compuesto A 1 uM
Combo
Número de células
Tiempo [h]
0
1
2
3
4
0
24
48
72
NCI-H596
Control
SN38 0.2uM
Compuesto A 1 uM
Combo
Número de células
Tiempo [h]
U2OS
Control
SN38 0.2uM
Compuesto A 1 uM
Combo
Número de células
Tiempo [h]

Fig. 19

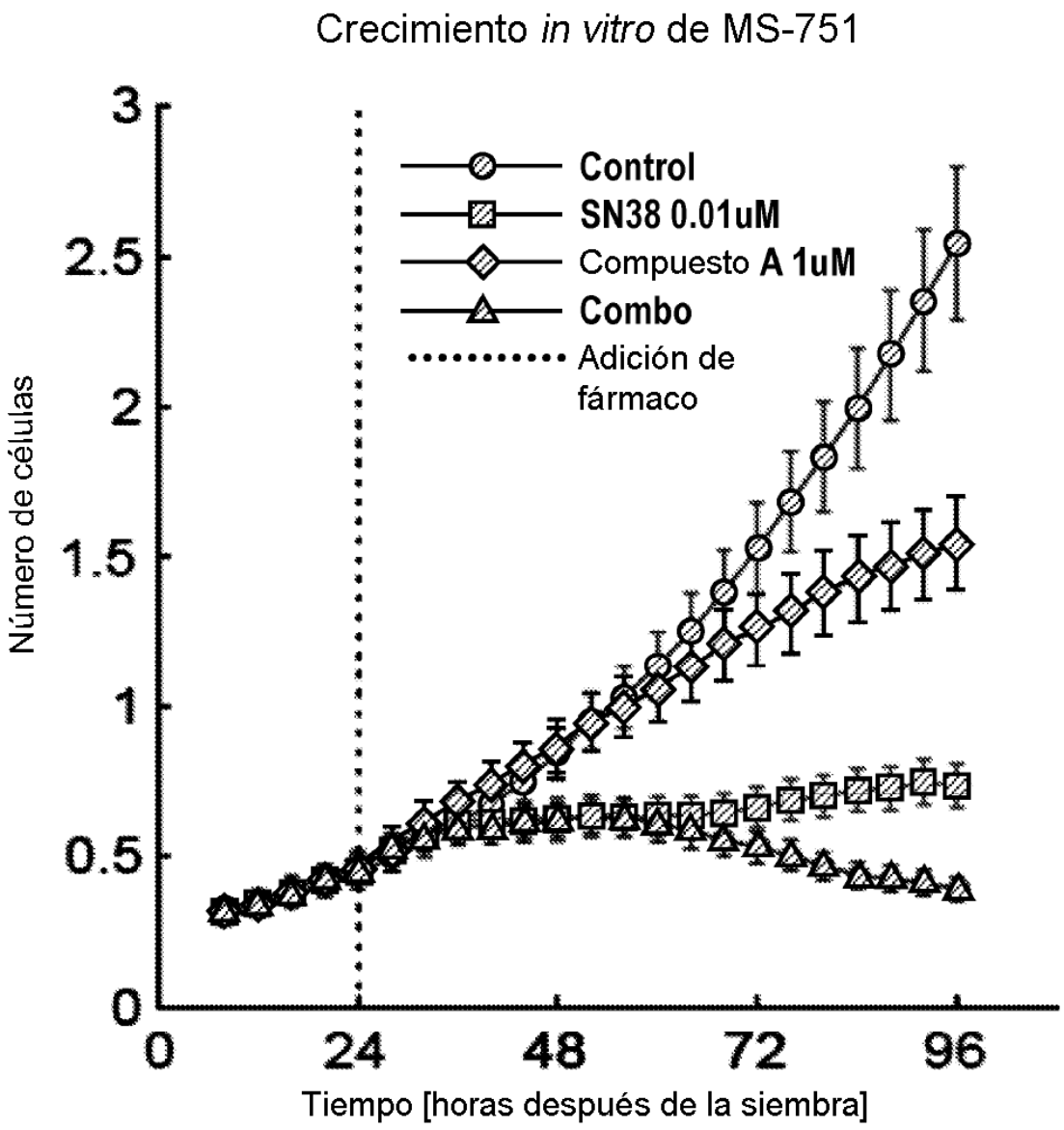

Crecimiento *in vitro* de MS-751
Control
SN38 0.01uM
Compuesto A 1uM
Combo
Adición de fármaco
Número de células
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
24
48
72
96
Tiempo [horas después de la siembra]

Fig. 20

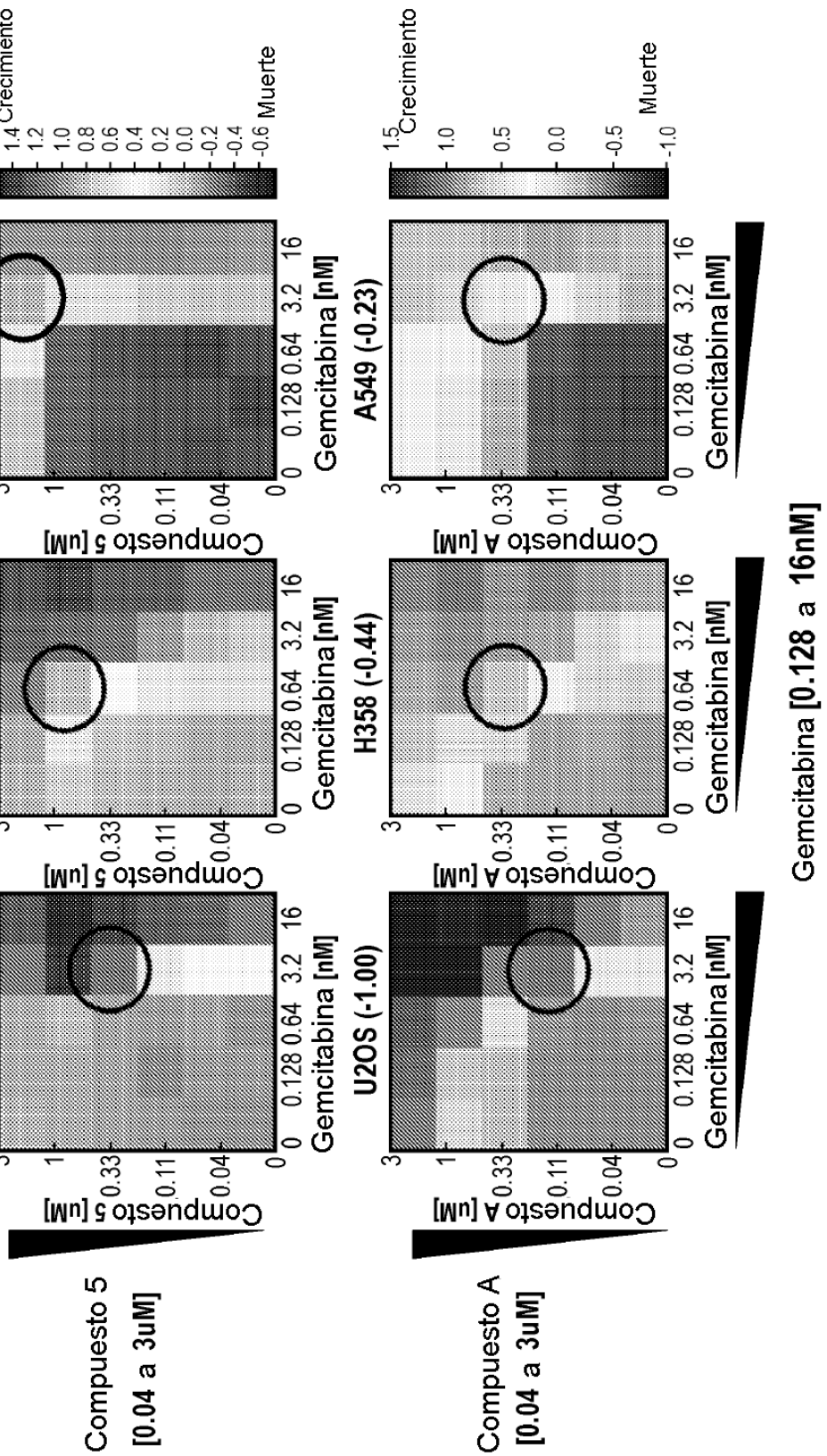

U2OS (-0.50)
H358 (-0.42)
A549 (-0.18)
U2OS (-1.00)
H358 (-0.44)
A549 (-0.23)
Compuesto 5 [uM]
Compuesto A [uM]
Gemcitabina [nM]
0 0.128 0.64 3.2 16
3 1 0.33 0.11 0.04 0
Crecimiento
Muerte
1.4 1.2 1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0 -0.2 -0.4 -0.6
1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5 -1.0
Compuesto 5 [0.04 a 3uM]
Compuesto A [0.04 a 3uM]
Gemcitabina [0.128 a 16nM]

Fig. 21A

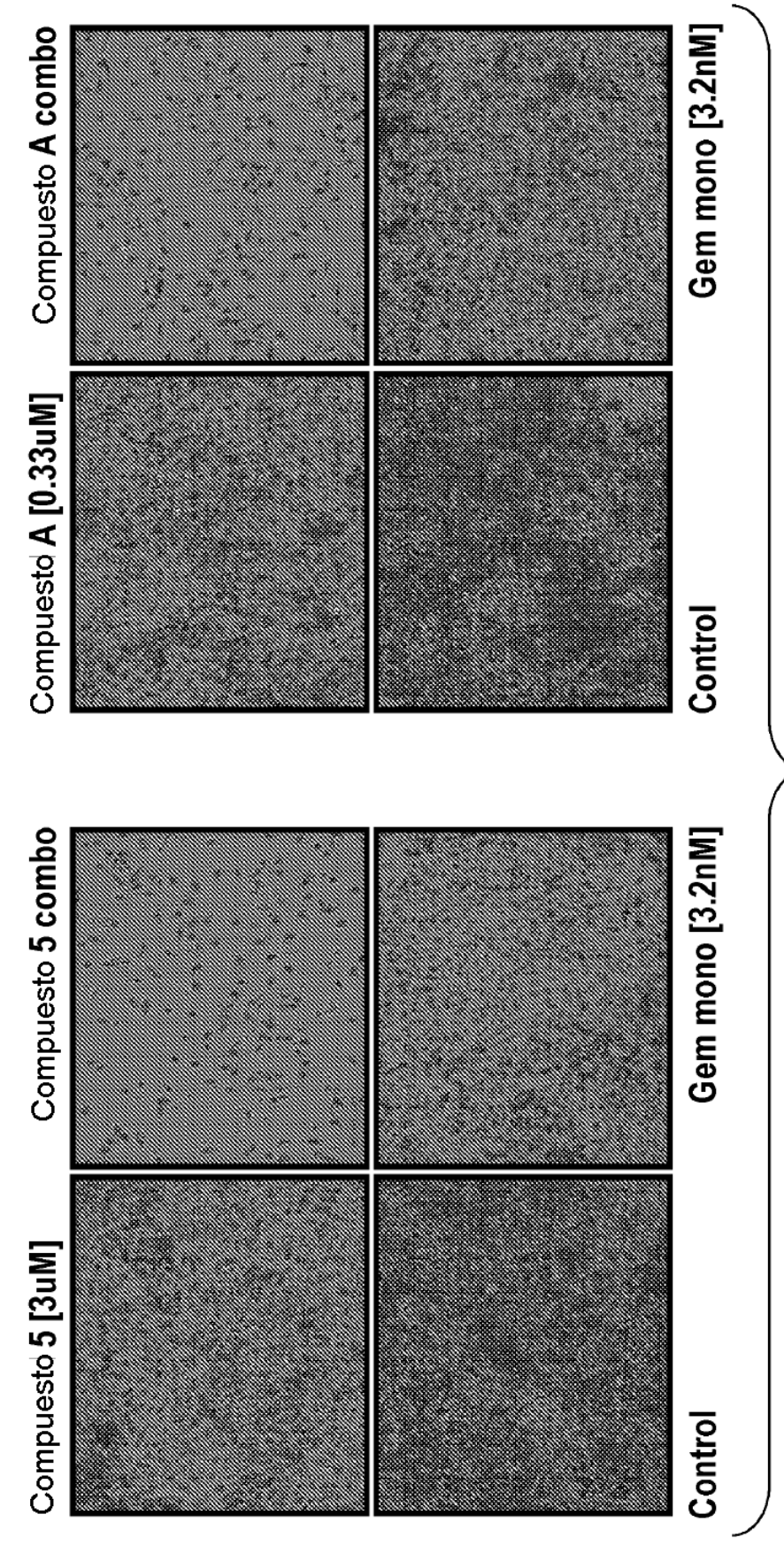

Compuesto 5 [3uM]
Compuesto 5 combo
Compuesto A [0.33uM]
Compuesto A combo
Control
Gem mono [3.2nM]
Control
Gem mono [3.2nM]

Fig. 21B

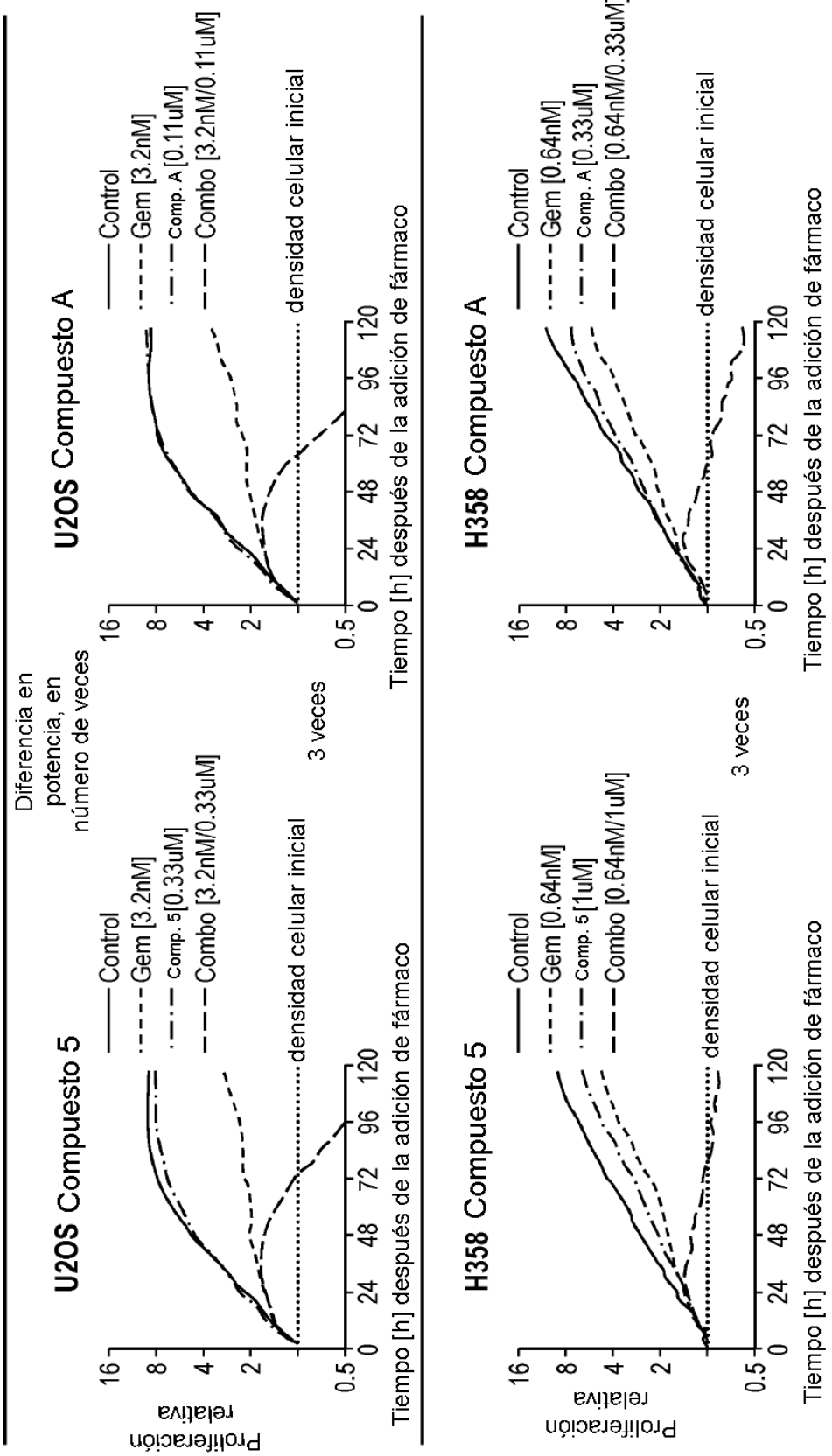

Compuesto 5 Gem combo
Compuesto A Gem combo
U2OS Compuesto 5
U2OS Compuesto A
H358 Compuesto 5
H358 Compuesto A
Control
Gem [3.2nM]
Comp. 5 [0.33uM]
Combo [3.2nM/0.33uM]
Comp. A [0.11uM]
Combo [3.2nM/0.11uM]
Gem [0.64nM]
Comp. 5 [1uM]
Combo [0.64nM/1uM]
Comp. A [0.33uM]
Combo [0.64nM/0.33uM]
densidad celular inicial
3 veces
Diferencia en potencia, en número de veces
Proliferación relativa
Tiempo [h] después de la adición de fármaco
16
8
4
2
0.5
0
24
48
72
96
120

Fig. 21C

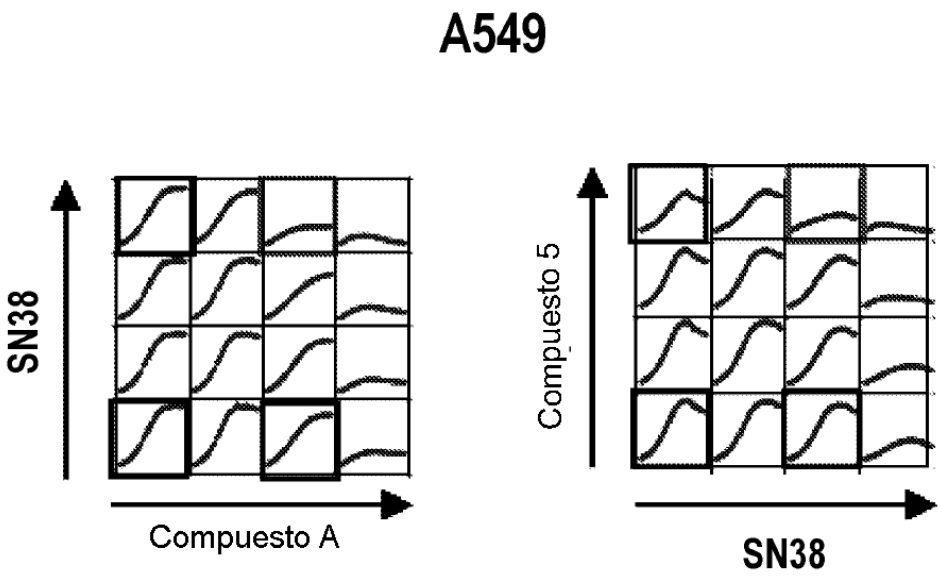


Fig. 22A

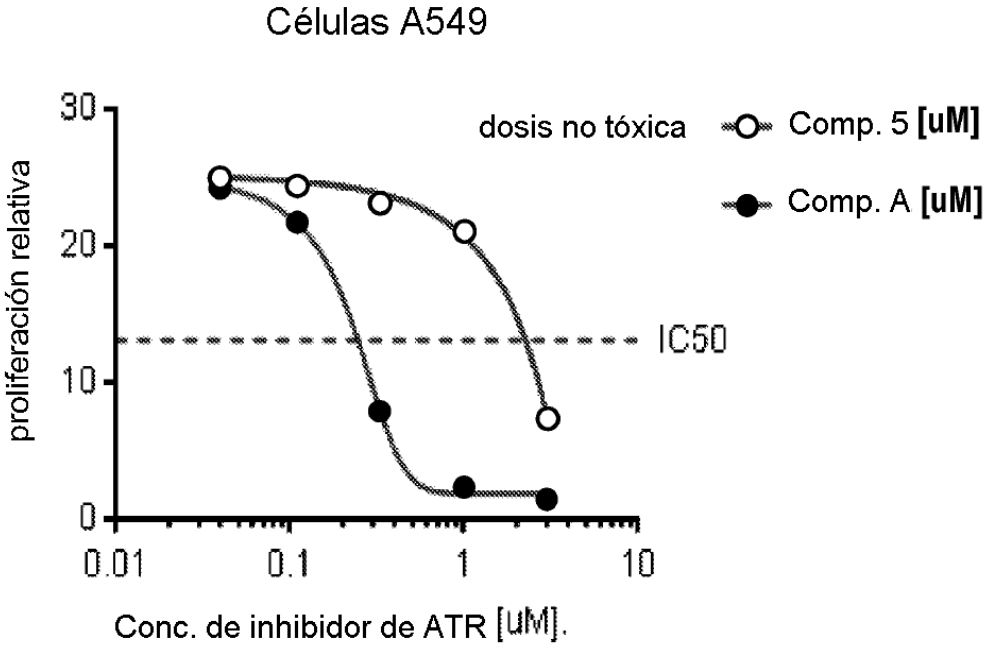


Fig. 22B

Conc. de Gemcitabina fija [3.2nM]

Disoluciones en serie conc- ATRi: 3, 1, 0.11, 0.33, 0.004uM

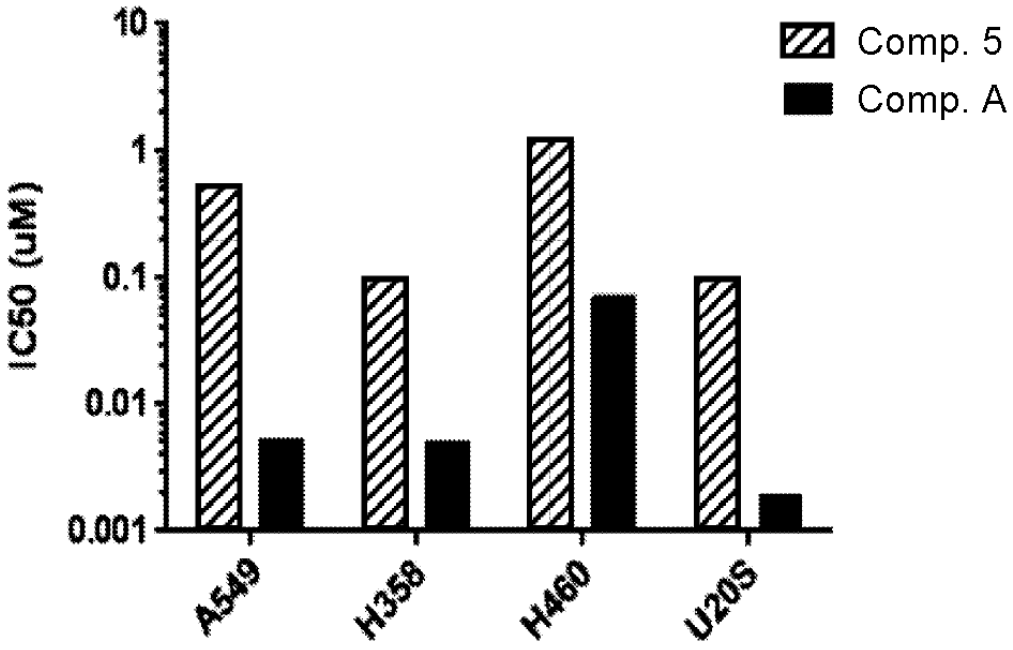


Fig. 23

Gemcitabina	Compuesto A	Compuesto 5
Respondedora	A549, HCC827, H2170, H358, H460	A549, HCC827, H2170, H358, H460
No respondedora	H2170, H358, H596	H2170, H358, H596

SN38	Compuesto A	Compuesto 5
Respondedora	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6
No respondedora	Calu-6, H1993, H23, H596	Calu-6, H1993, H23, H596

Fig. 24

Cinasa	**ATR** IC_{50} (nM)	**ATM** IC_{50} (nM)
Compuesto 6	470.8	> 10,000
Compuesto 2	139.8	4817
Compuesto 5	**233.9**	> 10,000
Compuesto 4	353.4	6869
Compuesto 3	196.1	> 10,000
Compuesto A	< 1 *	42
Compuesto 1 ***	49.6 **	3864

Lit. ref.

EuroFin, R.U., cell freesystem

* KI < 0.2nM

** KI = 6 nM
IC50 = 120nM

*** discontinuado

Fig. 25A

Cinasa	Compuesto 5 IC_{50} (nM)	Compuesto A IC_{50} (nM)
GSK3α	206	126
GSK3β	876	210
MLK1	74	59
MLK2	91	76

EuroFin, R.U., cell freesystem

Fig. 25B

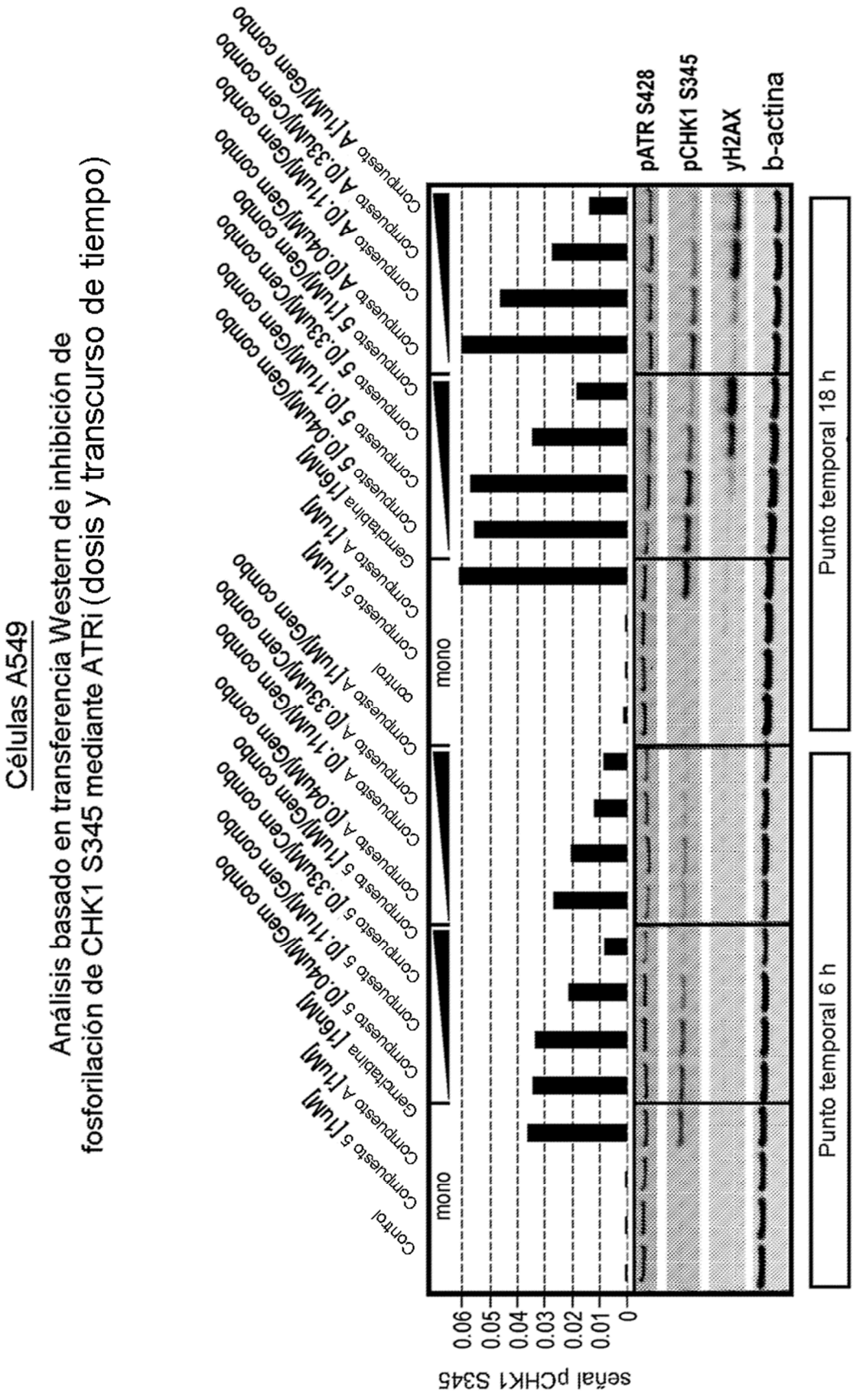

Células A549
Análisis basado en transferencia Western de inhibición de fosforilación de CHK1 S345 mediante ATRi (dosis y transcurso de tiempo)
señal pCHK1 S345
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
mono
mono
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
Compuesto A [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto A [0.04uM]/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 26A

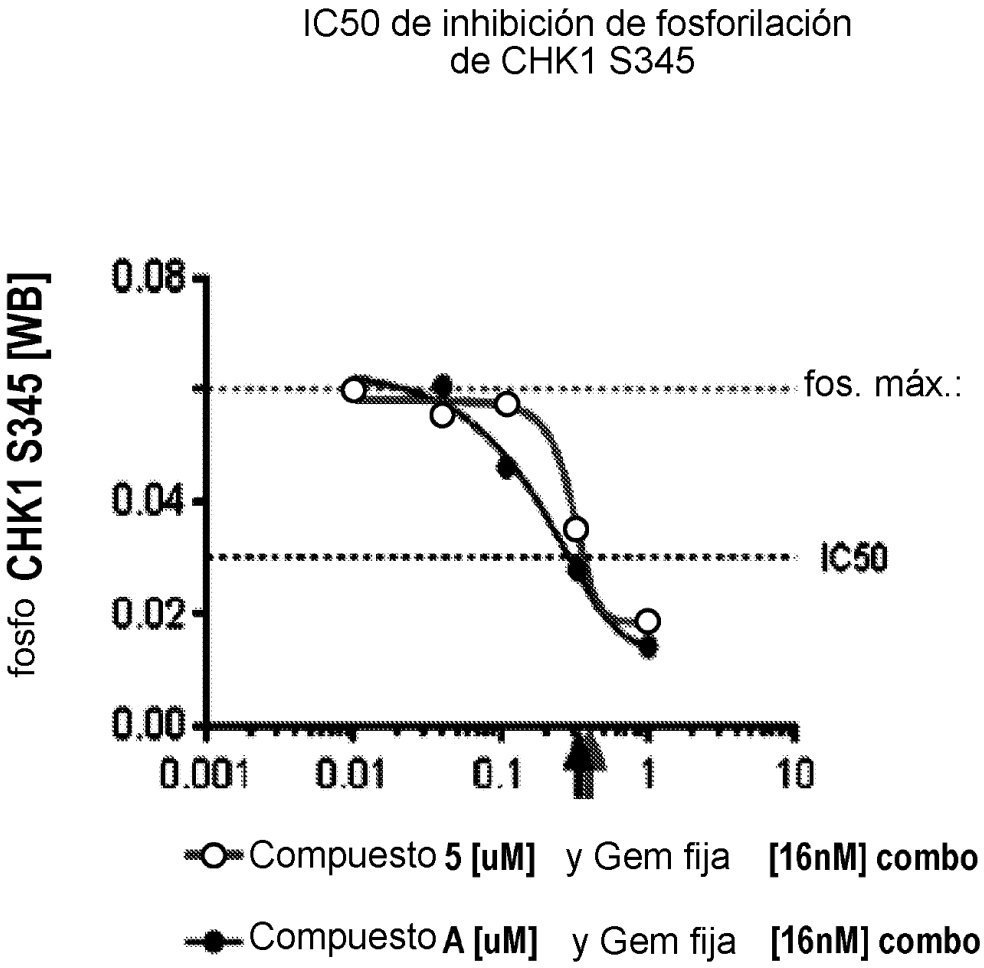

IC50 de inhibición de fosforilación
de CHK1 S345
fosfo CHK1 S345 [WB]
0.08
0.04
0.02
0.00
fos. máx.:
IC50
0.001
0.01
0.1
1
10
Compuesto 5 [uM] y Gem fija [16nM] combo
Compuesto A [uM] y Gem fija [16nM] combo

Fig. 26B

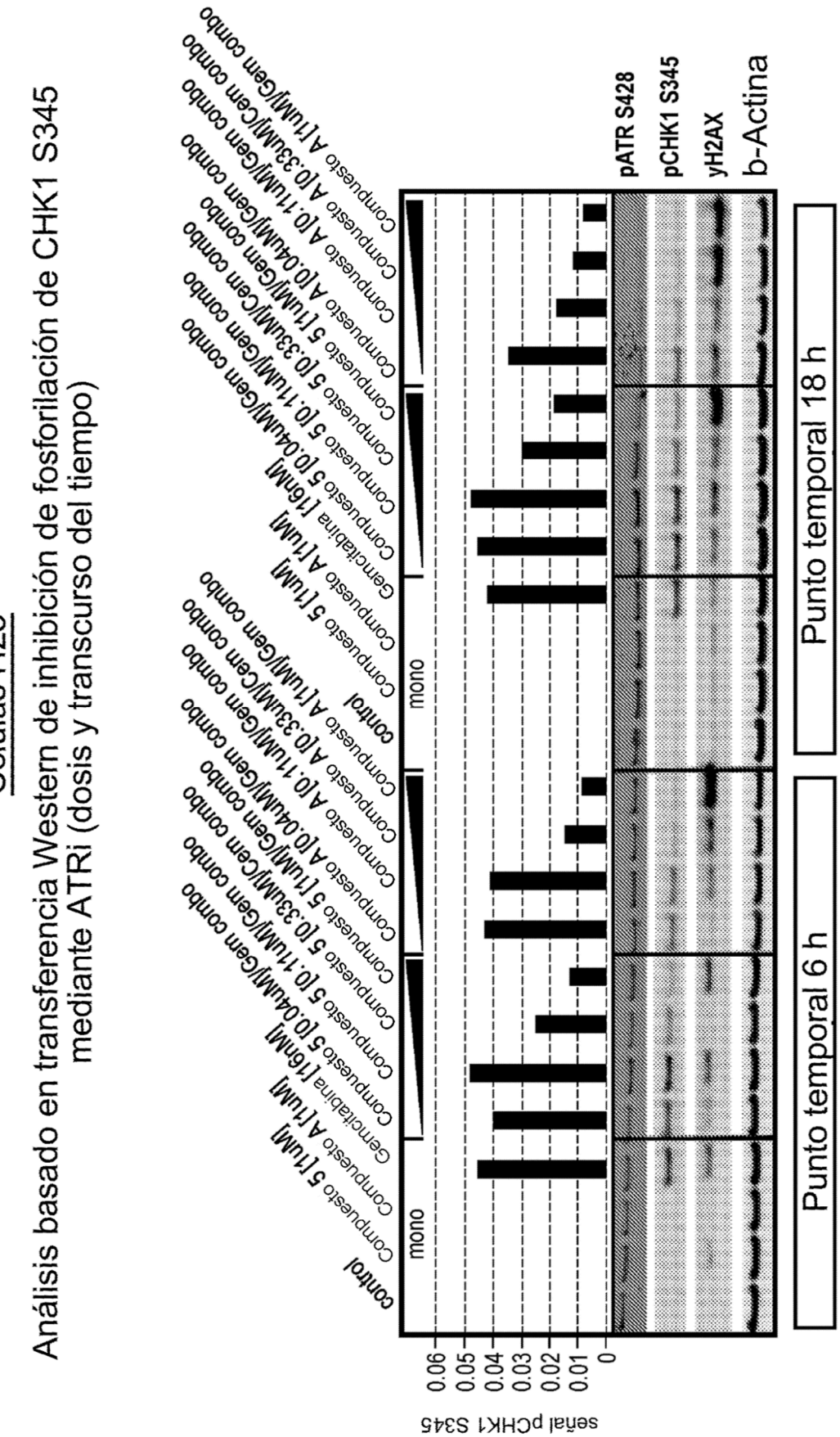

Células H23
Análisis basado en transferencia Western de inhibición de fosforilación de CHK1 S345 mediante ATRi (dosis y transcurso del tiempo)
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.04uM]/Gem combo
mono
mono
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h
señal pCHK1 S345
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06

Fig. 26C

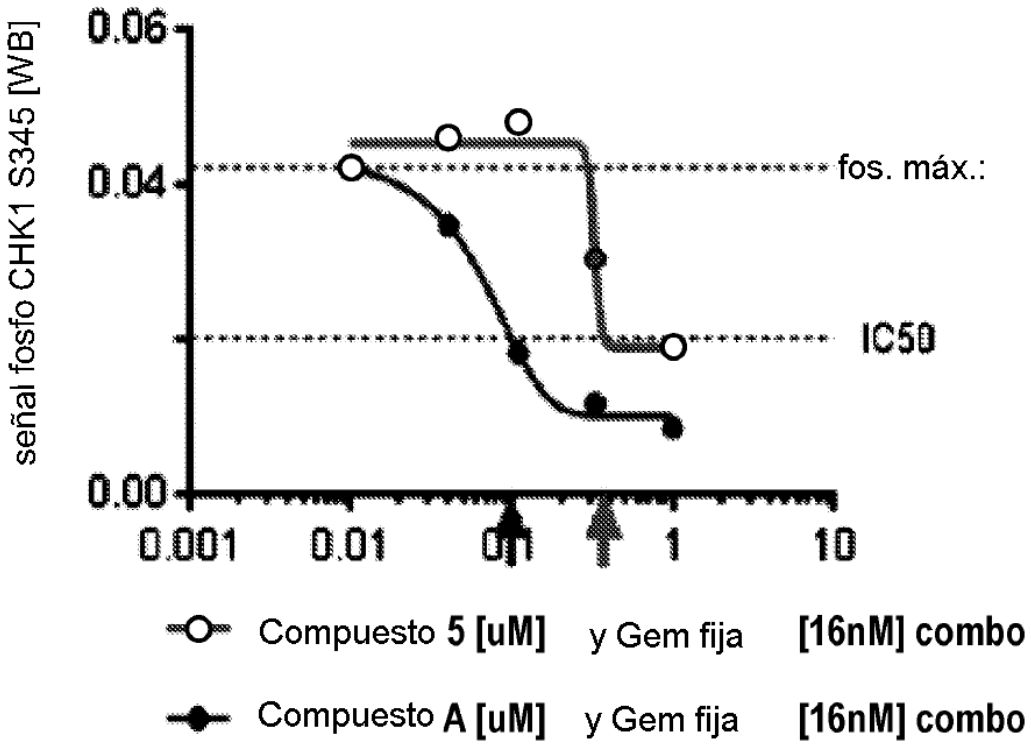

IC50 de inhibición de fosforilación
de CHK1 S345
señal fosfo CHK1 S345 [WB]
0.06
0.04
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
fos. máx.:
IC50
Compuesto 5 [uM] y Gem fija [16nM] combo
Compuesto A [uM] y Gem fija [16nM] combo

Fig. 26D

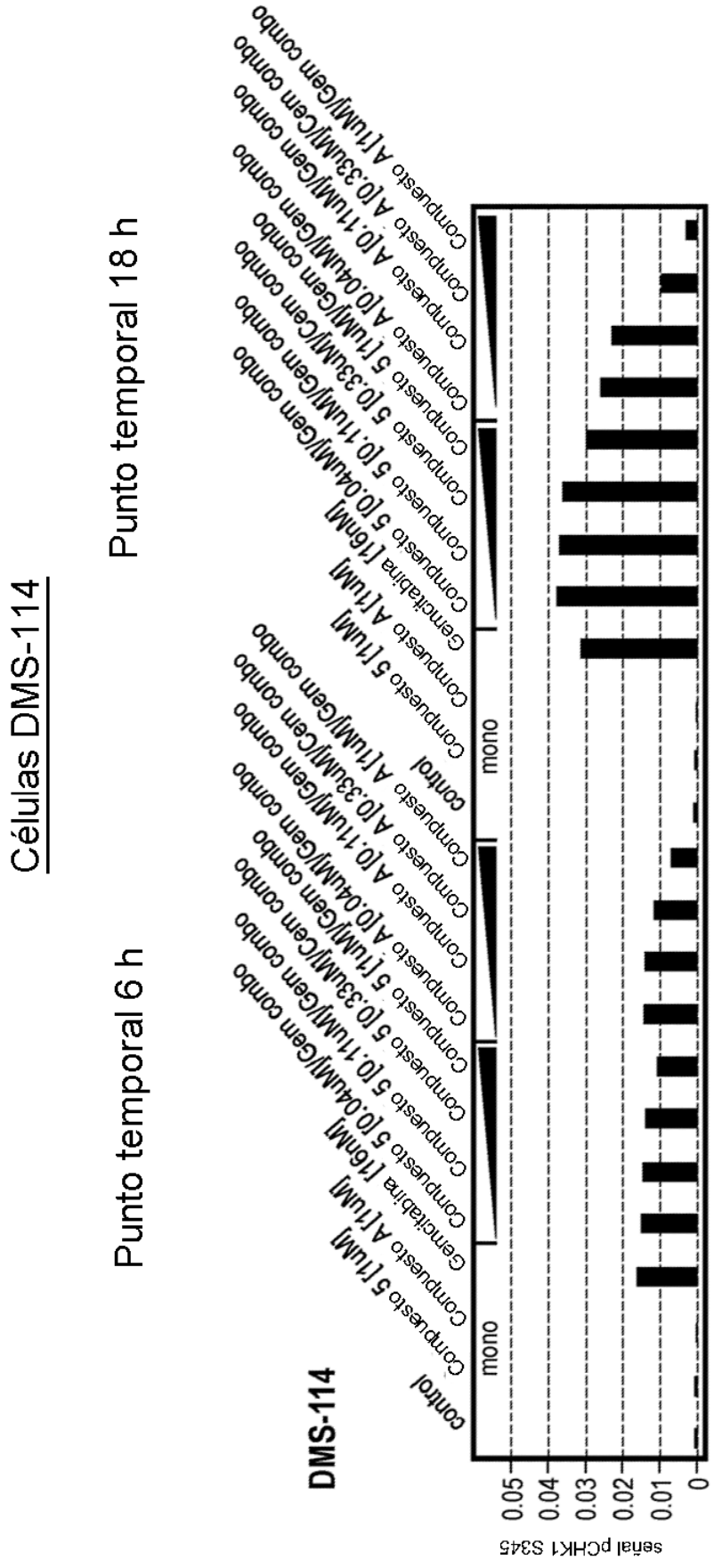

Células DMS-114
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h
DMS-114
mono
mono
señal pCHK1 S345
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM] /Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM] /Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM] /Gem combo
Compuesto 5 [1uM] /Gem combo
Compuesto A [0.04uM] /Gem combo
Compuesto A [0.11uM] /Gem combo
Compuesto A [0.33uM] /Gem combo
Compuesto A [1uM] /Gem combo
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM] /Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM] /Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM] /Gem combo
Compuesto 5 [1uM] /Gem combo
Compuesto A [0.04uM] /Gem combo
Compuesto A [0.11uM] /Gem combo
Compuesto A [0.33uM] /Gem combo
Compuesto A [1uM] /Gem combo

Fig. 26E

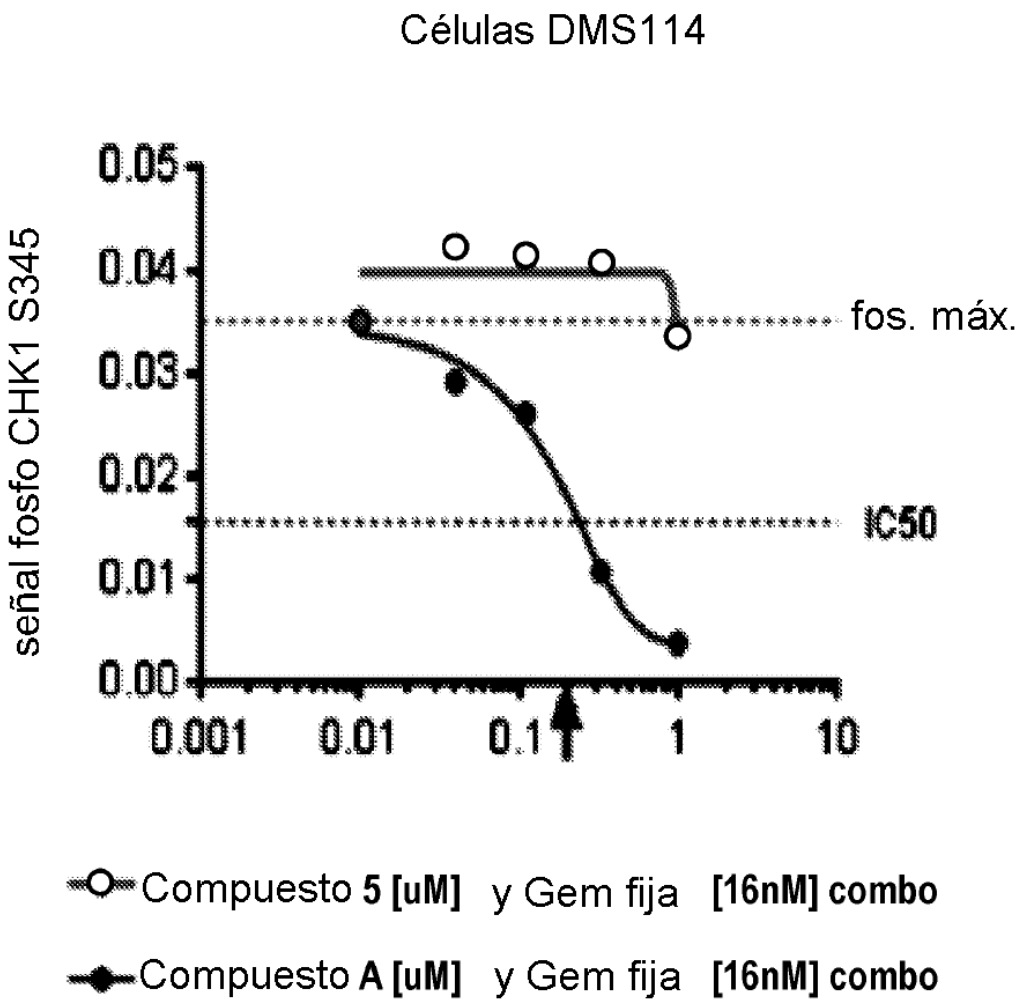

Células DMS114
señal fosfo CHK1 S345
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
fos. máx.
IC50
Compuesto 5 [uM] y Gem fija [16nM] combo
Compuesto A [uM] y Gem fija [16nM] combo

Fig. 26F

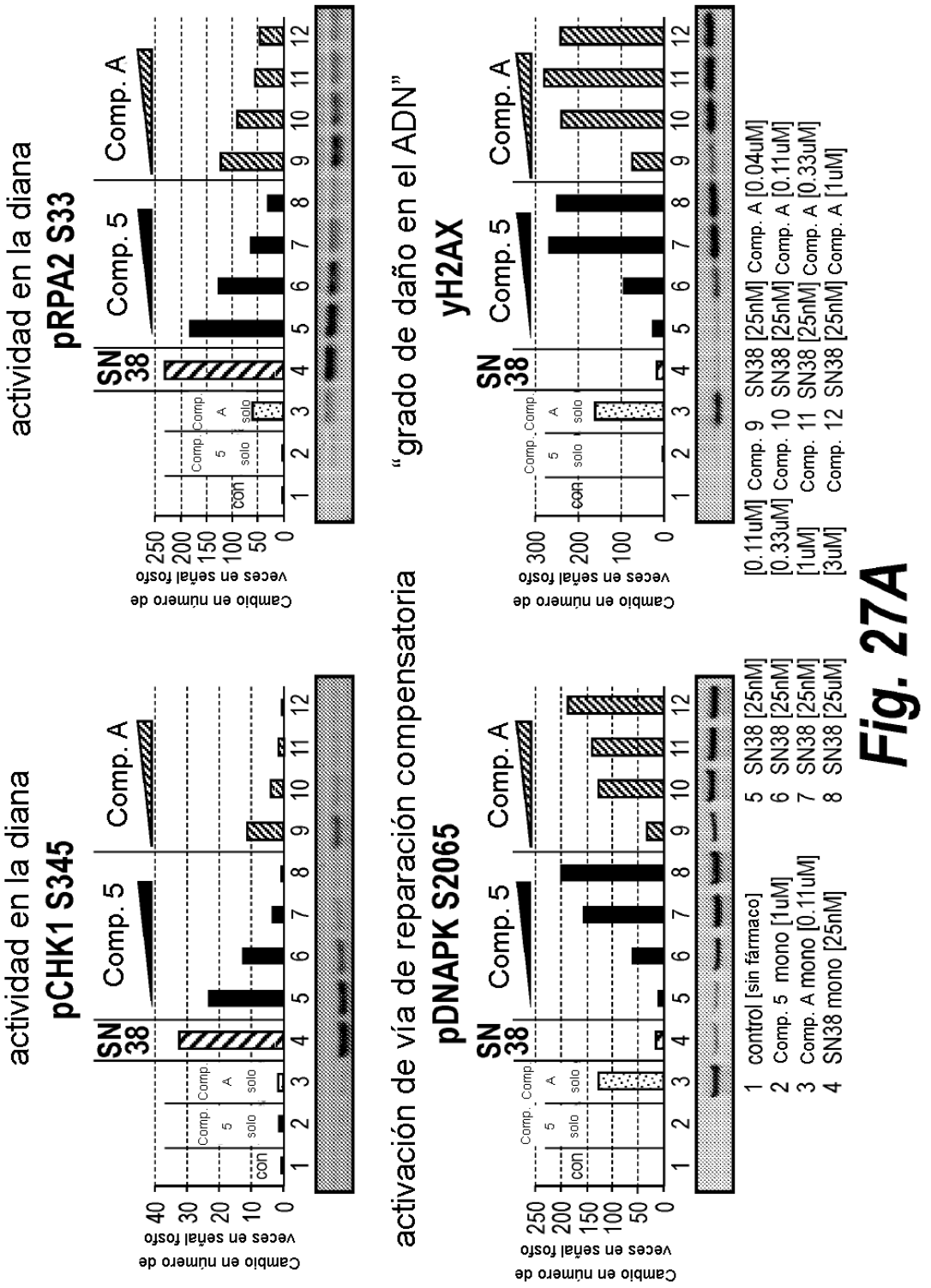

actividad en la diana
pCHK1 S345
actividad en la diana
pRPA2 S33
activación de vía de reparación compensatoria
pDNAPK S2065
"grado de daño en el ADN"
γH2AX
Cambio en número de veces en señal fosfo
SN 38
Comp. 5
Comp. A
con
solo
Comp. 5 solo
Comp. A solo
1 control [sin fármaco]
2 Comp. 5 mono [1uM]
3 Comp. A mono [0.11uM]
4 SN38 mono [25nM]
5 SN38 [25nM]
6 SN38 [25nM]
7 SN38 [25nM]
8 SN38 [25uM]
[0.11uM] Comp. 9 SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
[0.33uM] Comp. 10 SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
[1uM] Comp. 11 SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
[3uM] Comp. 12 SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 27A

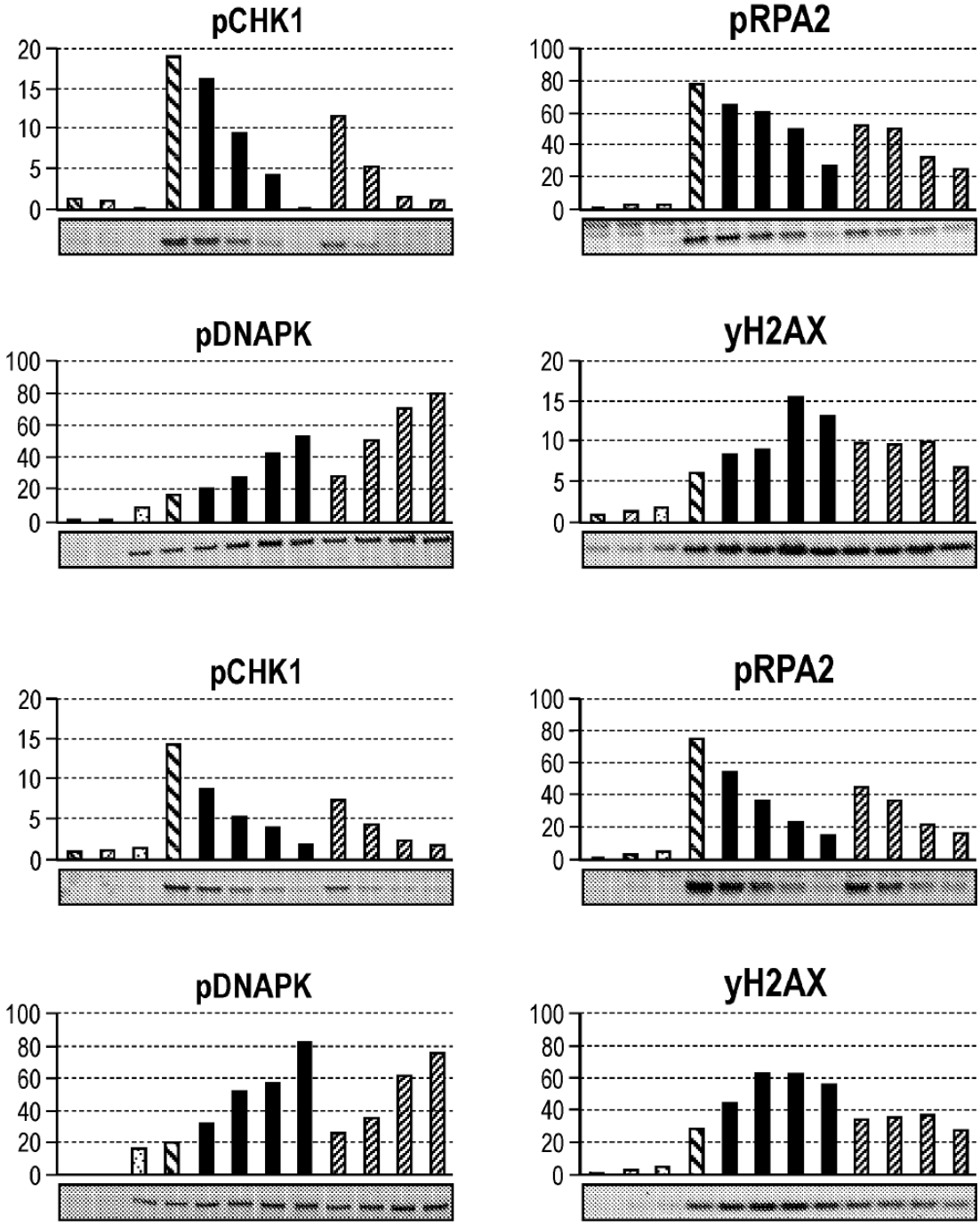
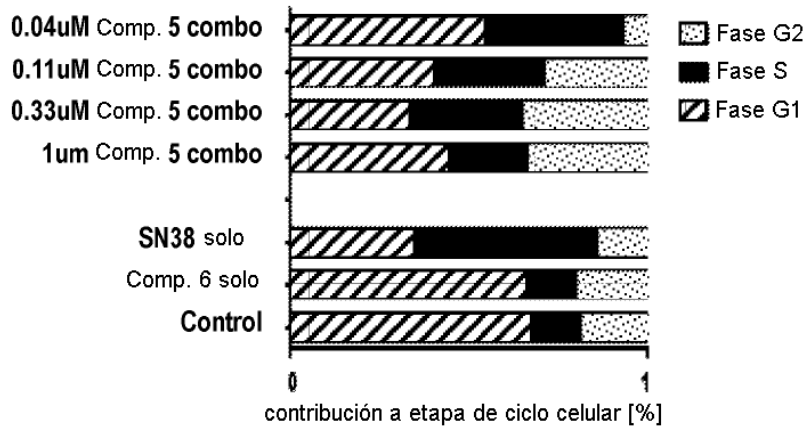
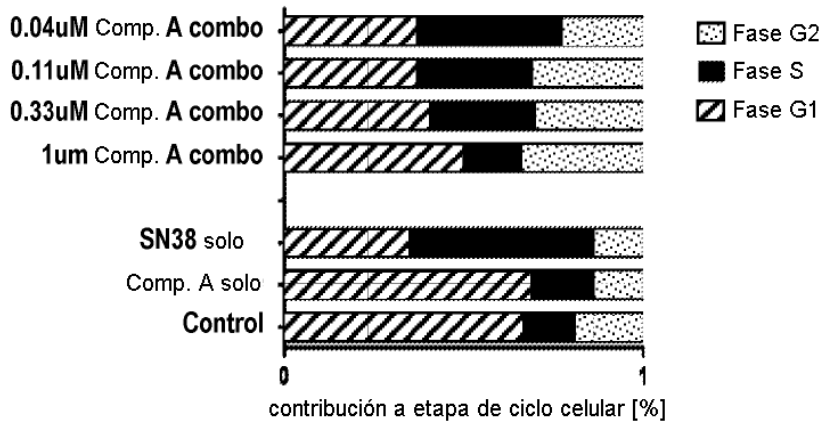

pCHK1
20
15
10
5
0
pRPA2
100
80
60
40
20
0
pDNAPK
100
80
60
40
20
0
yH2AX
20
15
10
5
0
pCHK1
20
15
10
5
0
pRPA2
100
80
60
40
20
0
pDNAPK
100
80
60
40
20
0
yH2AX
100
80
60
40
20
0

Fig. 27B





	G1	S	G2
Control	67%	14%	19%
Comp. 5 solo **[1uM]**	66%	14%	20%
SN38 solo **[25nM]**	35%	51%	14%
SN38 [25nM] Comp. **5 {3uM]**	44%	22%	34%
SN38 [25nM] Comp. **5 [1uM]**	34%	31%	35%
SN38 [25nM] Comp. **5 [0.33uM]**	40%	31%	29%
SN38 [25nM] Comp. **5 [0.11uM]**	54%	39%	7%

	G1	S	G2
Control	67%	14%	19%
Comp. A solo **[1uM]**	69%	17%	14%
SN38 solo **[25nM]**	35%	51%	14%
SN38 [25nM] Comp. **A {3uM]**	50%	16%	35%
SN38 [25nM] Comp. **A [1uM]**	41%	29%	30%
SN38 [25nM] Comp. **A [0.33uM]**	37%	32%	31%
SN38 [25nM] Comp. **A [0.11uM]**	37%	40%	23%

Fig. 28

ES 2 921 008 T3

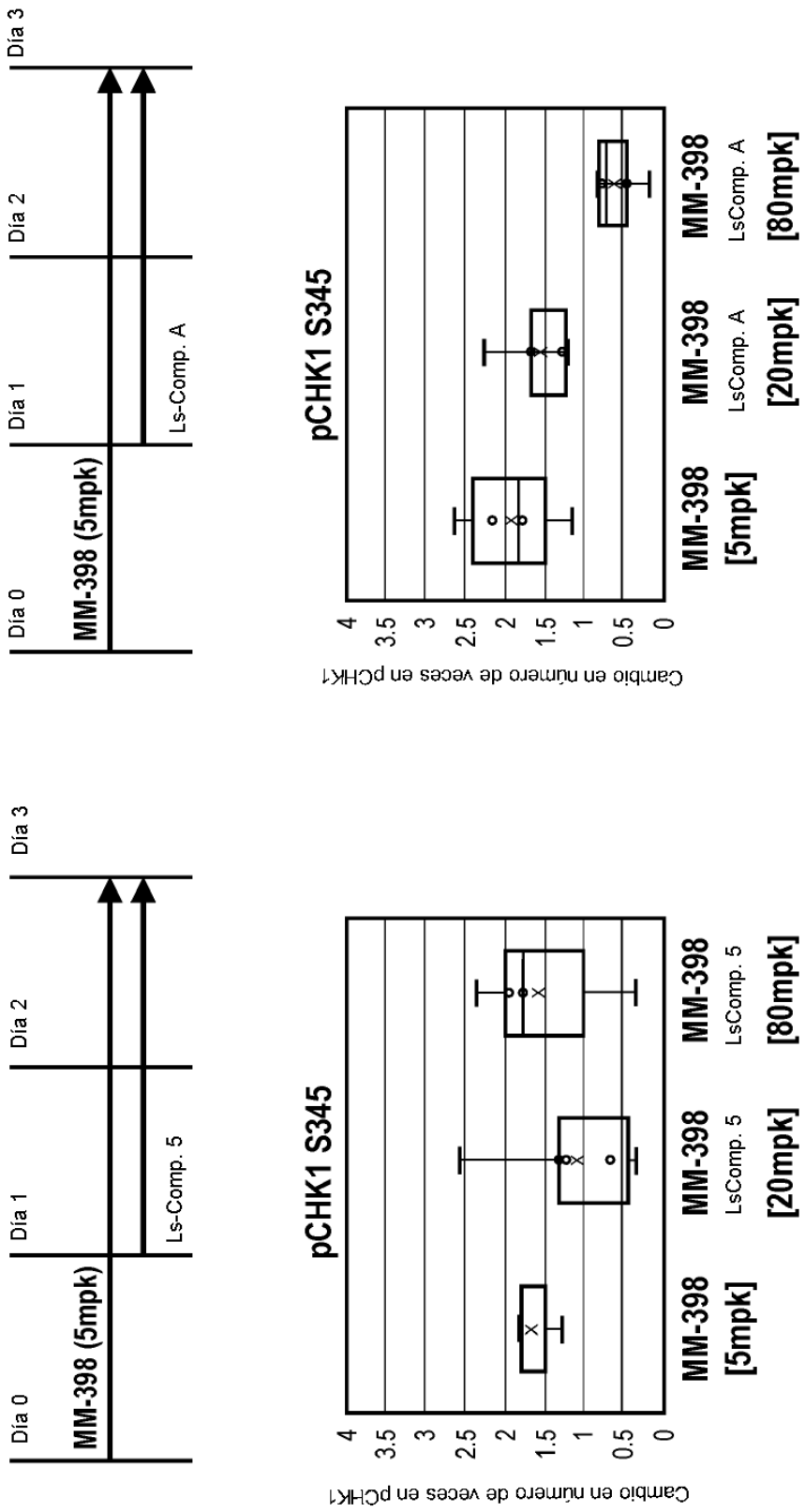

Día 0
MM-398 (5mpk)
Día 1
Ls-Comp. 5
Día 2
Día 3
pCHK1 S345
Cambio en número de veces en pCHK1
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
MM-398 [5mpk]
MM-398 LsComp. 5 [20mpk]
MM-398 LsComp. 5 [80mpk]
Día 0
MM-398 (5mpk)
Día 1
Ls-Comp. A
Día 2
Día 3
pCHK1 S345
Cambio en número de veces en pCHK1
MM-398 [5mpk]
MM-398 LsComp. A [20mpk]
MM-398 LsComp. A [80mpk]

Fig. 29

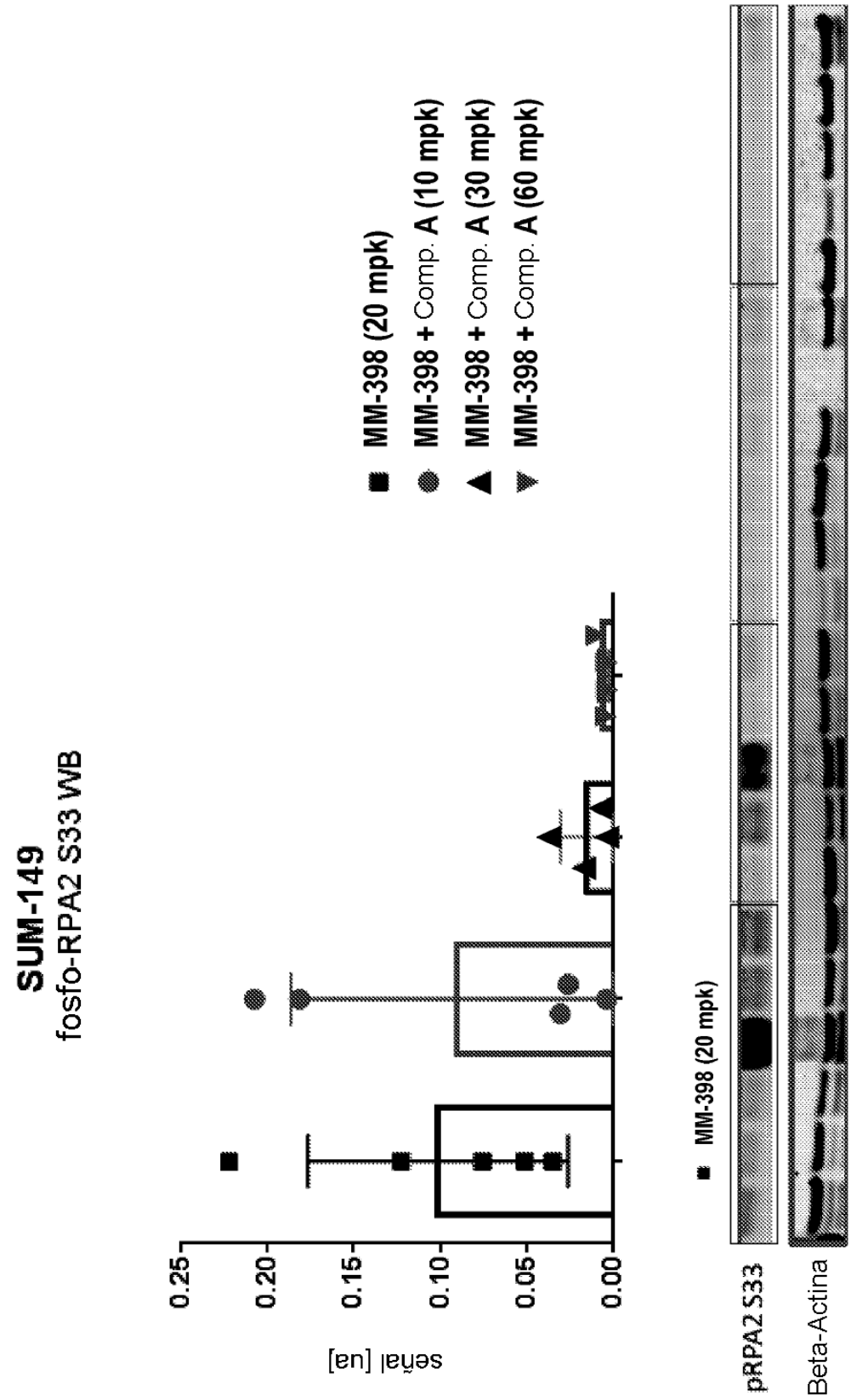

SUM-149
fosfo-RPA2 S33 WB
MM-398 (20 mpk)
MM-398 + Comp. A (10 mpk)
MM-398 + Comp. A (30 mpk)
MM-398 + Comp. A (60 mpk)
señal [ua]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
MM-398 (20 mpk)
pRPA2 S33
Beta-Actina

Fig. 30A

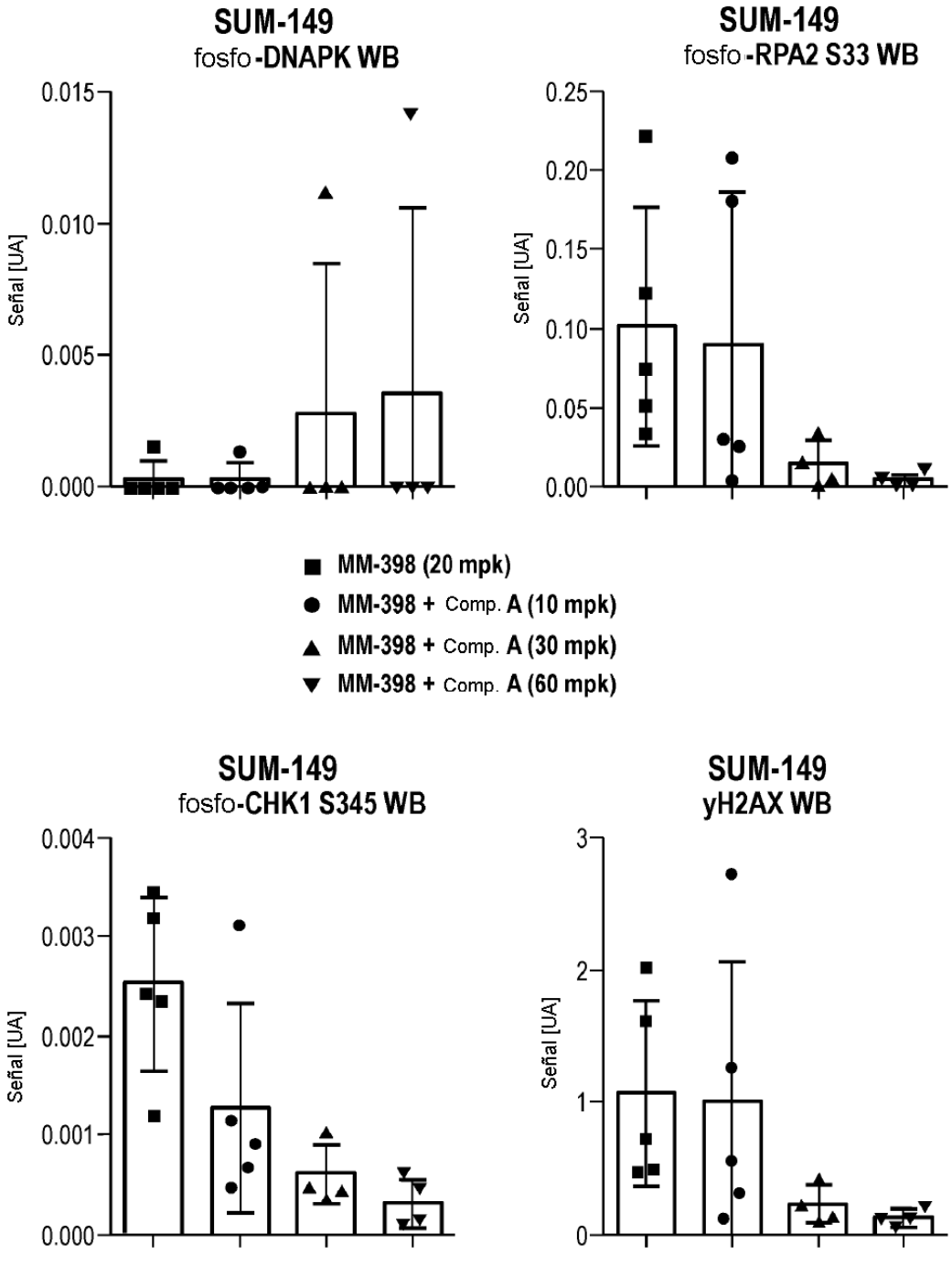

SUM-149
fosfo-DNAPK WB
Señal [UA]
0.015
0.010
0.005
0.000
SUM-149
fosfo-RPA2 S33 WB
Señal [UA]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
MM-398 (20 mpk)
MM-398 + Comp. A (10 mpk)
MM-398 + Comp. A (30 mpk)
MM-398 + Comp. A (60 mpk)
SUM-149
fosfo-CHK1 S345 WB
Señal [UA]
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
SUM-149
yH2AX WB
Señal [UA]
3
2
1
0

Fig. 30B

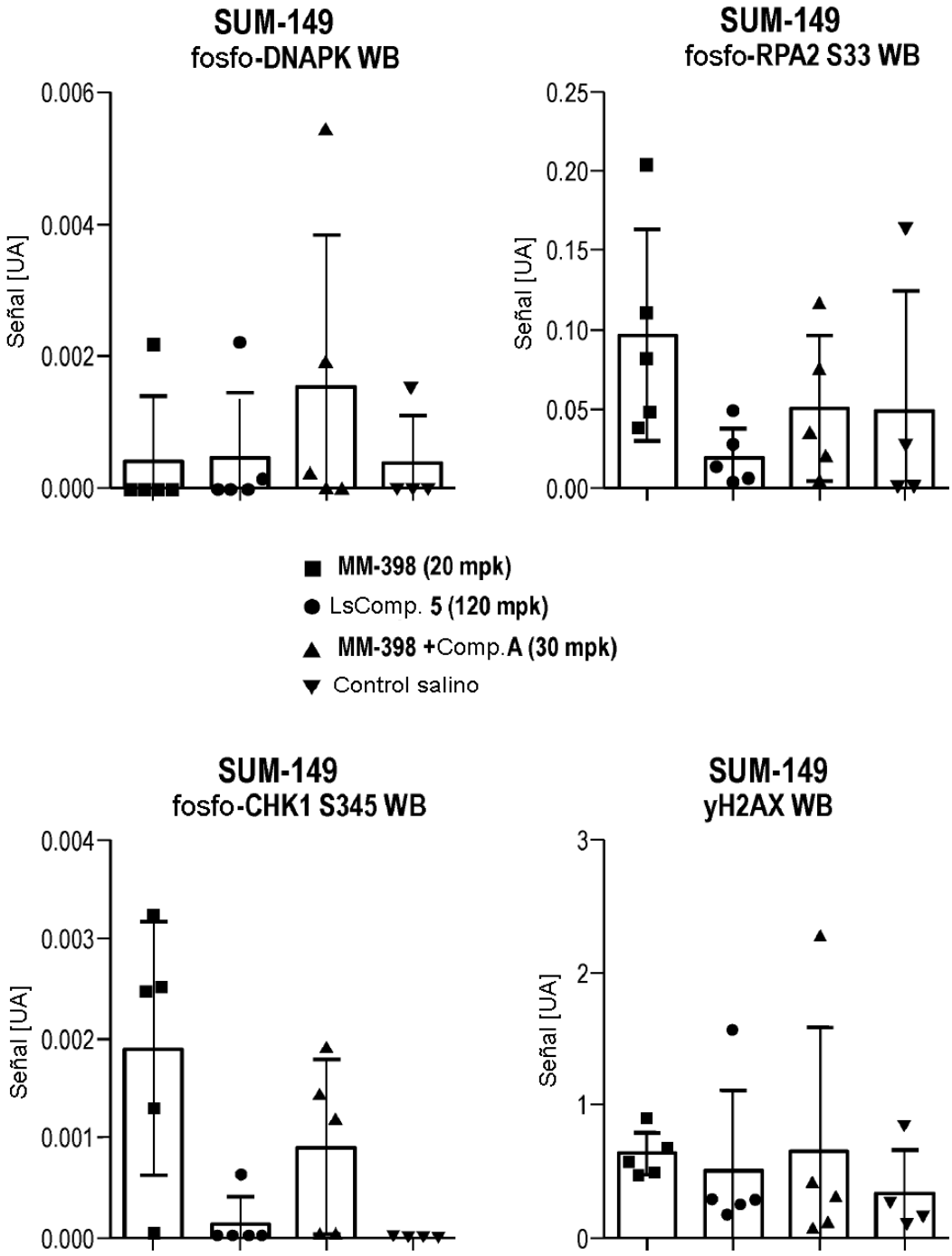

SUM-149
fosfo-DNAPK WB
Señal [UA]
0.006
0.004
0.002
0.000
SUM-149
fosfo-RPA2 S33 WB
Señal [UA]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
MM-398 (20 mpk)
LsComp. 5 (120 mpk)
MM-398 +Comp.A (30 mpk)
Control salino
SUM-149
fosfo-CHK1 S345 WB
Señal [UA]
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
SUM-149
yH2AX WB
Señal [UA]
3
2
1
0

Fig. 30C

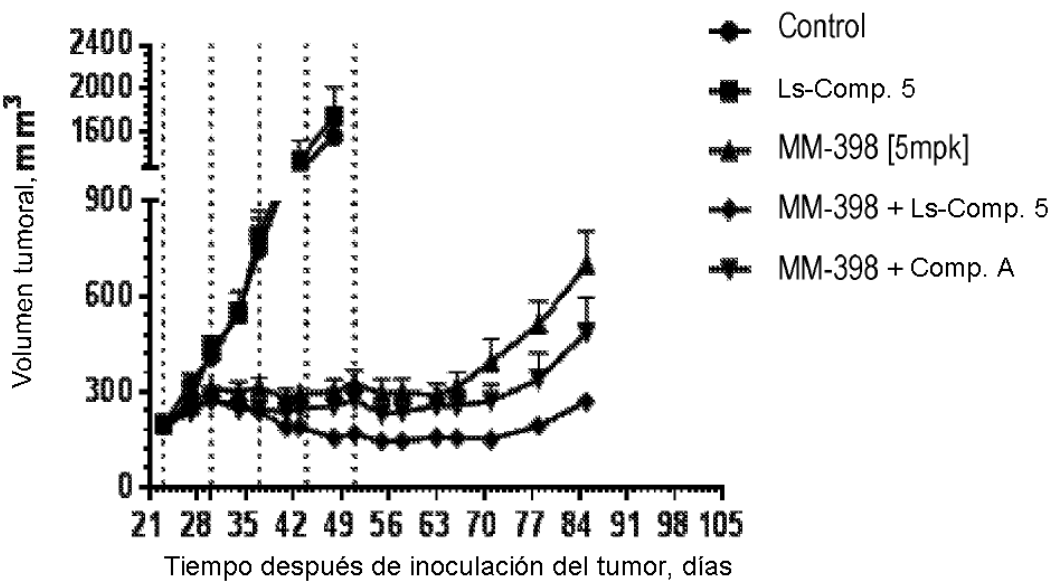

Volumen tumoral, mm3
2400
2000
1600
900
600
300
0
21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105
Tiempo después de inoculación del tumor, días
Control
Ls-Comp. 5
MM-398 [5mpk]
MM-398 + Ls-Comp. 5
MM-398 + Comp. A

Fig. 31

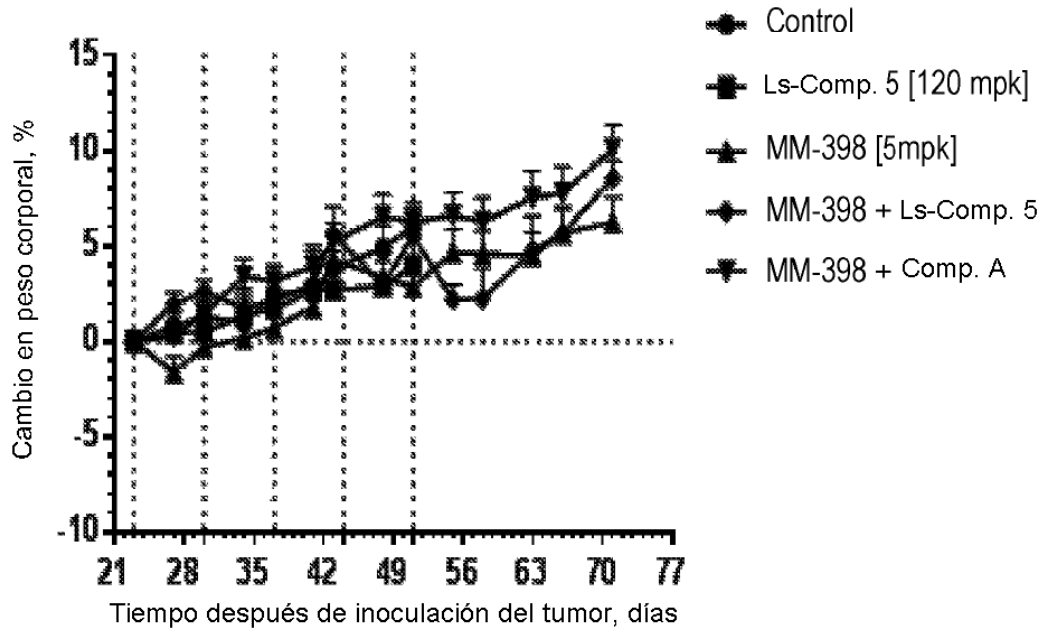

Cambio en peso corporal, %
15
10
5
0
-5
-10
21 28 35 42 49 56 63 70 77
Tiempo después de inoculación del tumor, días
Control
Ls-Comp. 5 [120 mpk]
MM-398 [5mpk]
MM-398 + Ls-Comp. 5
MM-398 + Comp. A

Fig. 32

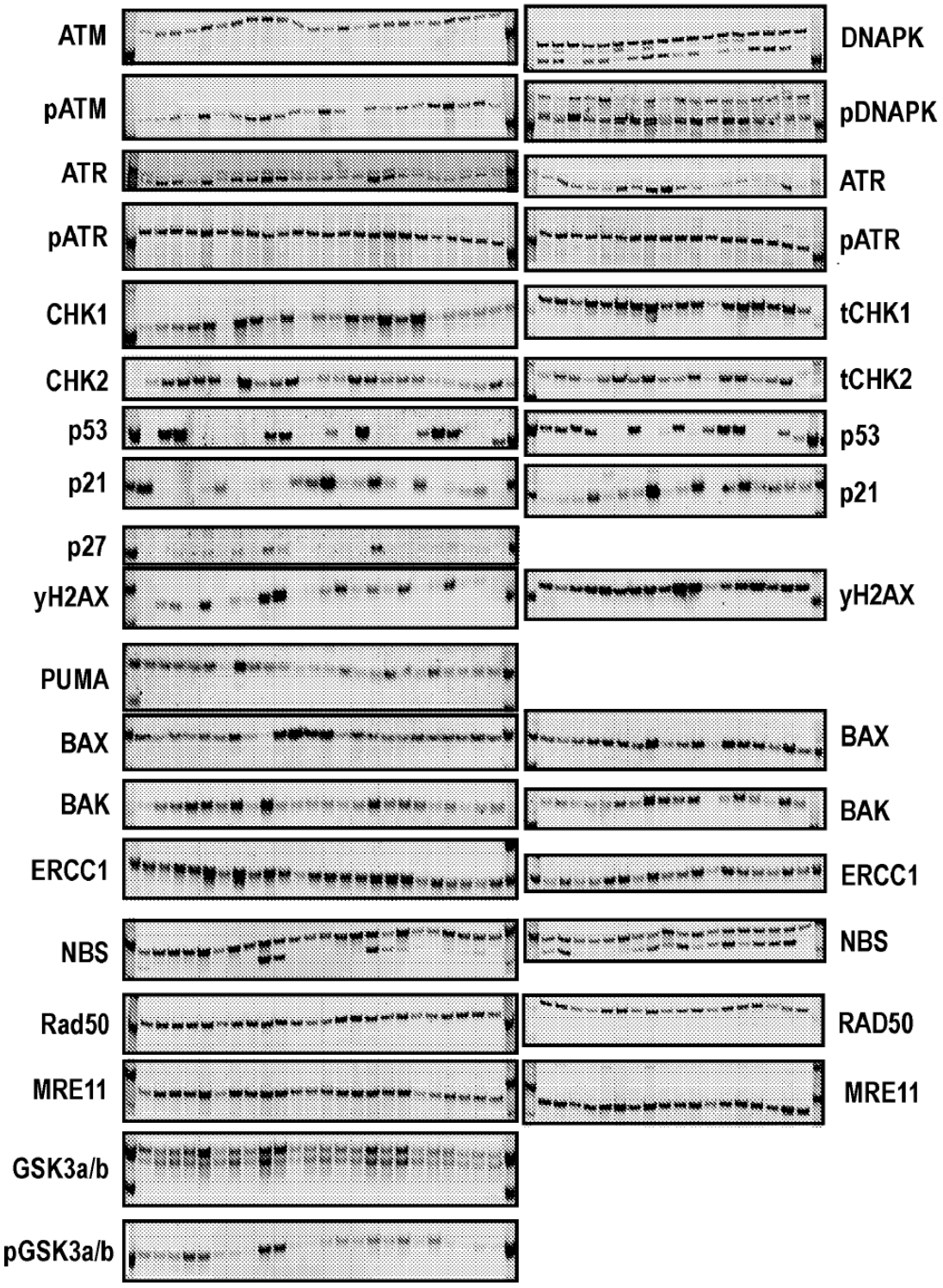

ATM
pATM
ATR
pATR
CHK1
CHK2
p53
p21
p27
yH2AX
PUMA
BAX
BAK
ERCC1
NBS
Rad50
MRE11
GSK3a/b
pGSK3a/b
DNAPK
pDNAPK
ATR
pATR
tCHK1
tCHK2
p53
p21
yH2AX
BAX
BAK
ERCC1
NBS
RAD50
MRE11

Fig. 33

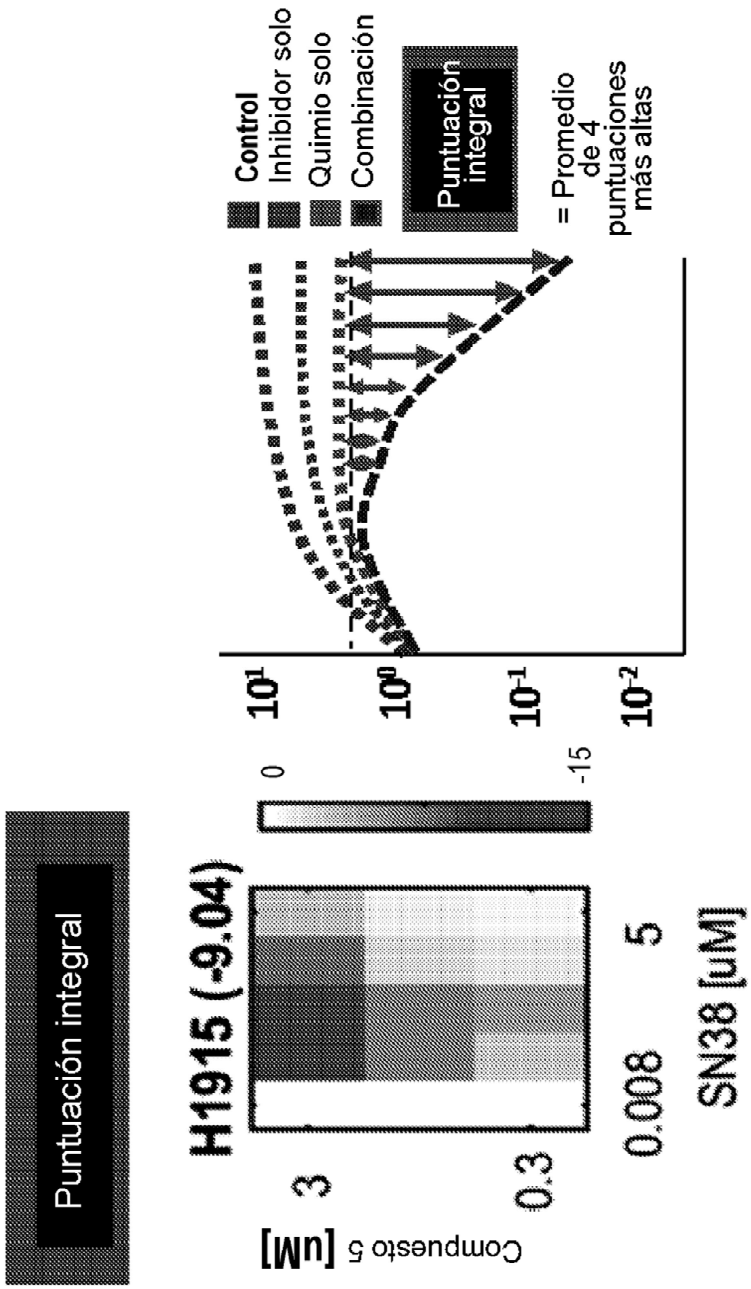

Puntuación integral
H1915 (-9.04)
Compuesto 5 [uM]
3
0.3
0.008
5
SN38 [uM]
0
-15
10^{1}
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
Control
Inhibidor solo
Quimio solo
Combinación
Puntuación integral
= Promedio de 4 puntuaciones más altas

Fig. 34

Correlación de expresión de la proteína MRE11 y puntuación integral de SN38

(ATRi/SN38 combo; solo pulmón)

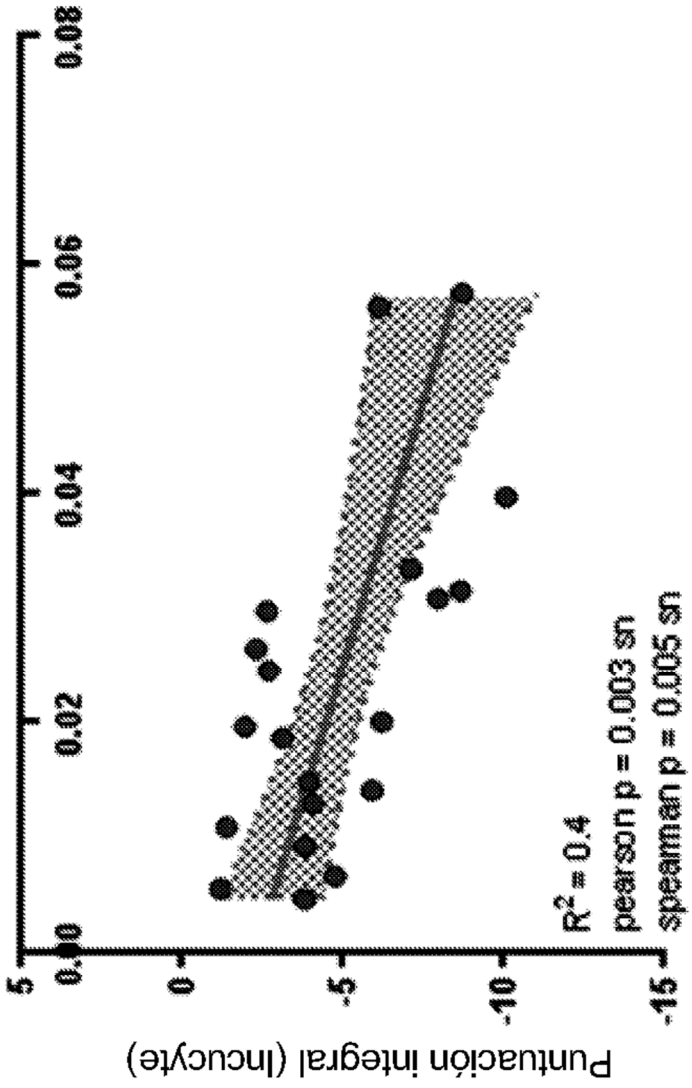


Fig. 35

Correlación de expresión de la proteína ATM y puntuación integral de SN38
(ATRi/SN38 combo, solo pulmón)
expresión de proteína ATM (WB)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
Puntuación integral (Incucyte)
5
0
-5
-10
-15
R2 = 0.26
pearson p = 0.022
spearman p = 0.01

Fig. 36

Correlación de expresión de la proteína NBS y puntuación integral de SN38
(ATRi/SN38 combo, p53 comprometido, solo pulmón)
expresión de proteína NBS (WB)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
5
0
-5
-10
-15
Puntuación integral (Incucyte)
R² = 0.74
pearson p = 0.06 sn
spearman p = 0.005 sn

Fig. 37

Correlación de expresión de la proteína MRE11 y puntuación integral de SN38

(ATRi/SN38 combo, p53 comprometido, solo pulmón)

Fig. 38

Correlación de expresión de la proteína MRE11 y puntuación integral de SN38

(ATRi/SN38 combo; p53 comprometido, solo pulmón)

Fig. 39

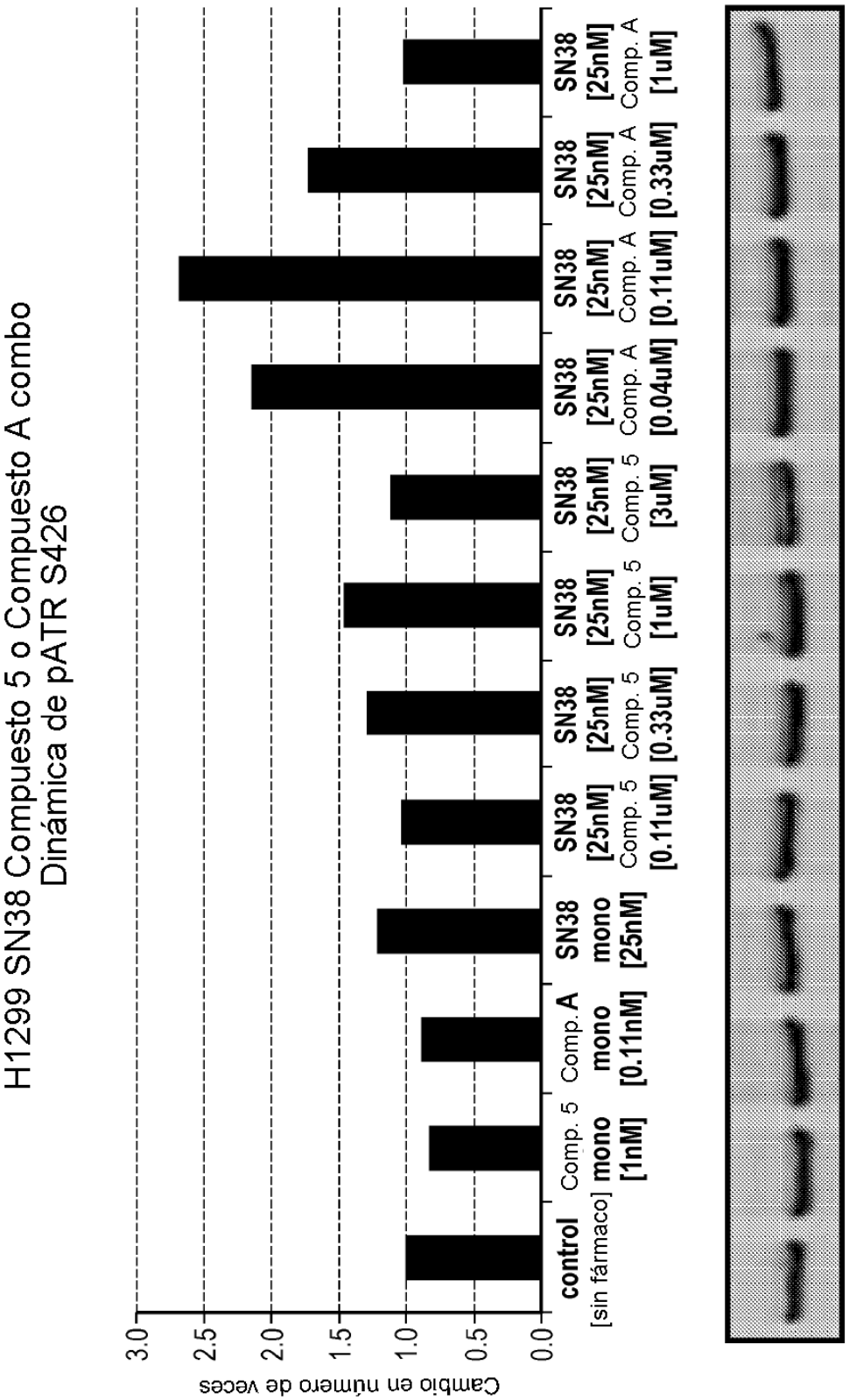

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pATR S426
Cambio en número de veces
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 40A

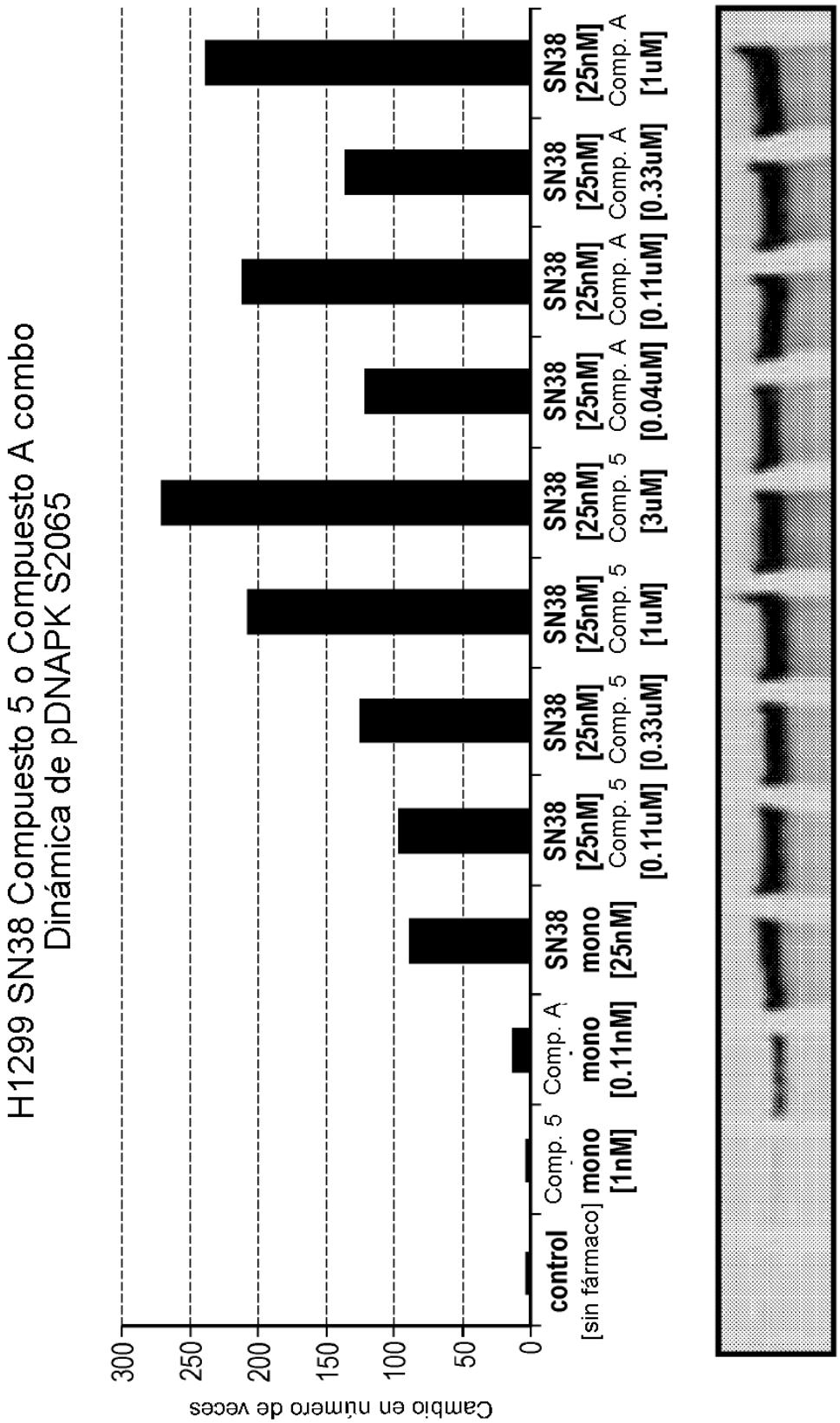

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pDNAPK S2065
Cambio en número de veces
300
250
200
150
100
50
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 40B

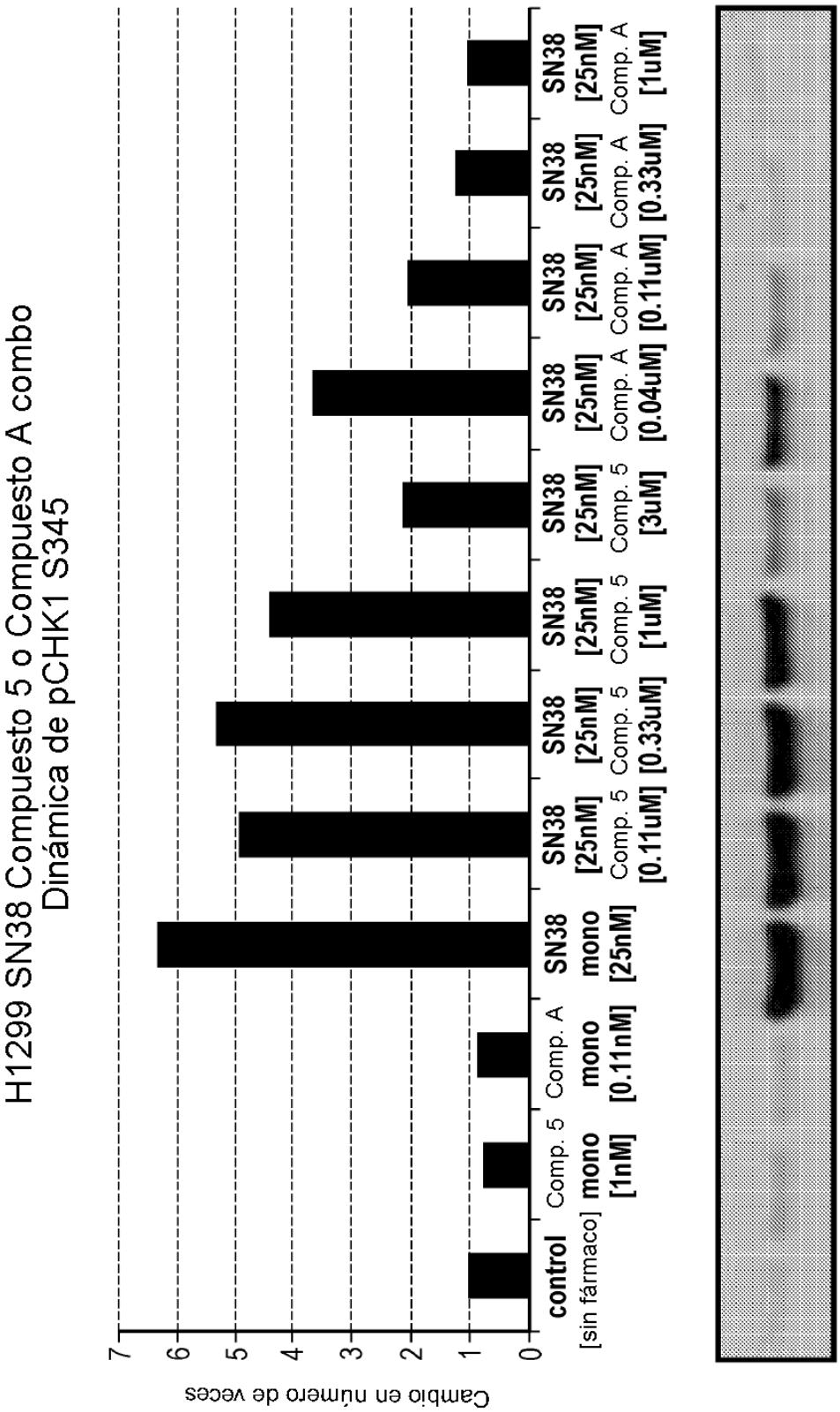

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 S345
Cambio en número de veces
0
1
2
3
4
5
6
7
[sin fármaco]
control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 40C

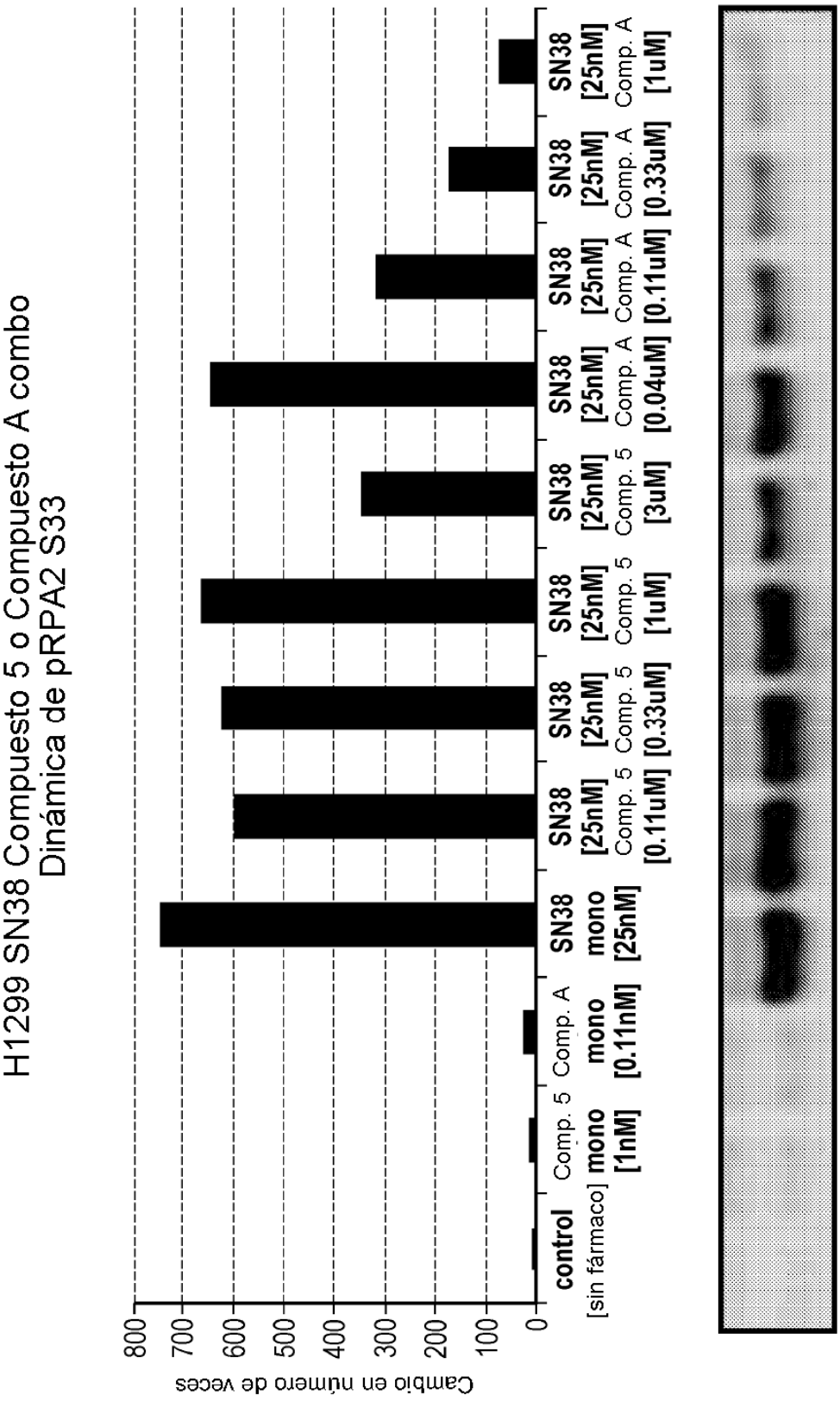

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pRPA2 S33
Cambio en número de veces
800
700
600
500
400
300
200
100
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 40D

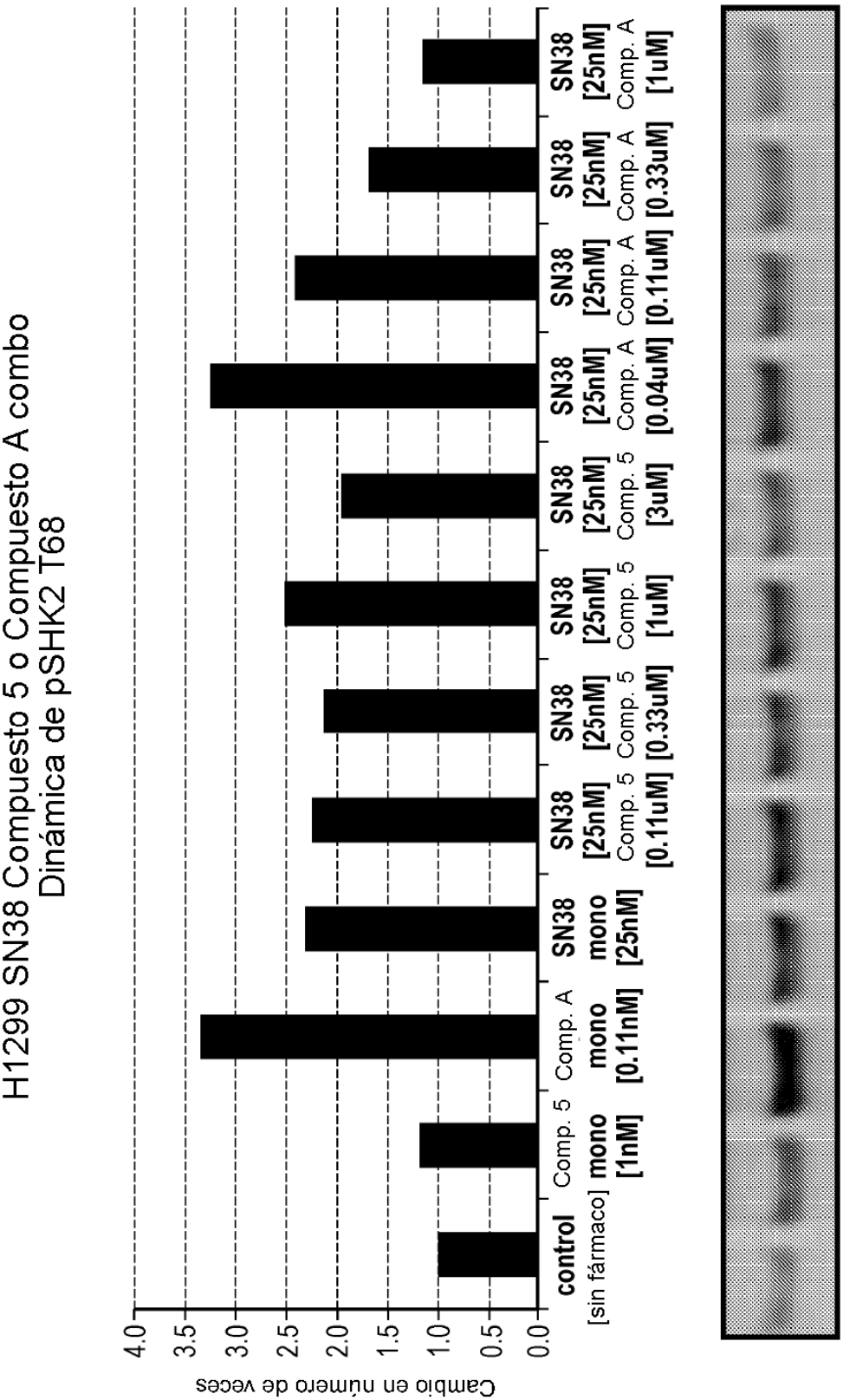

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pSHK2 T68
Cambio en número de veces
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
control
[sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [1uM]

Fig. 40E

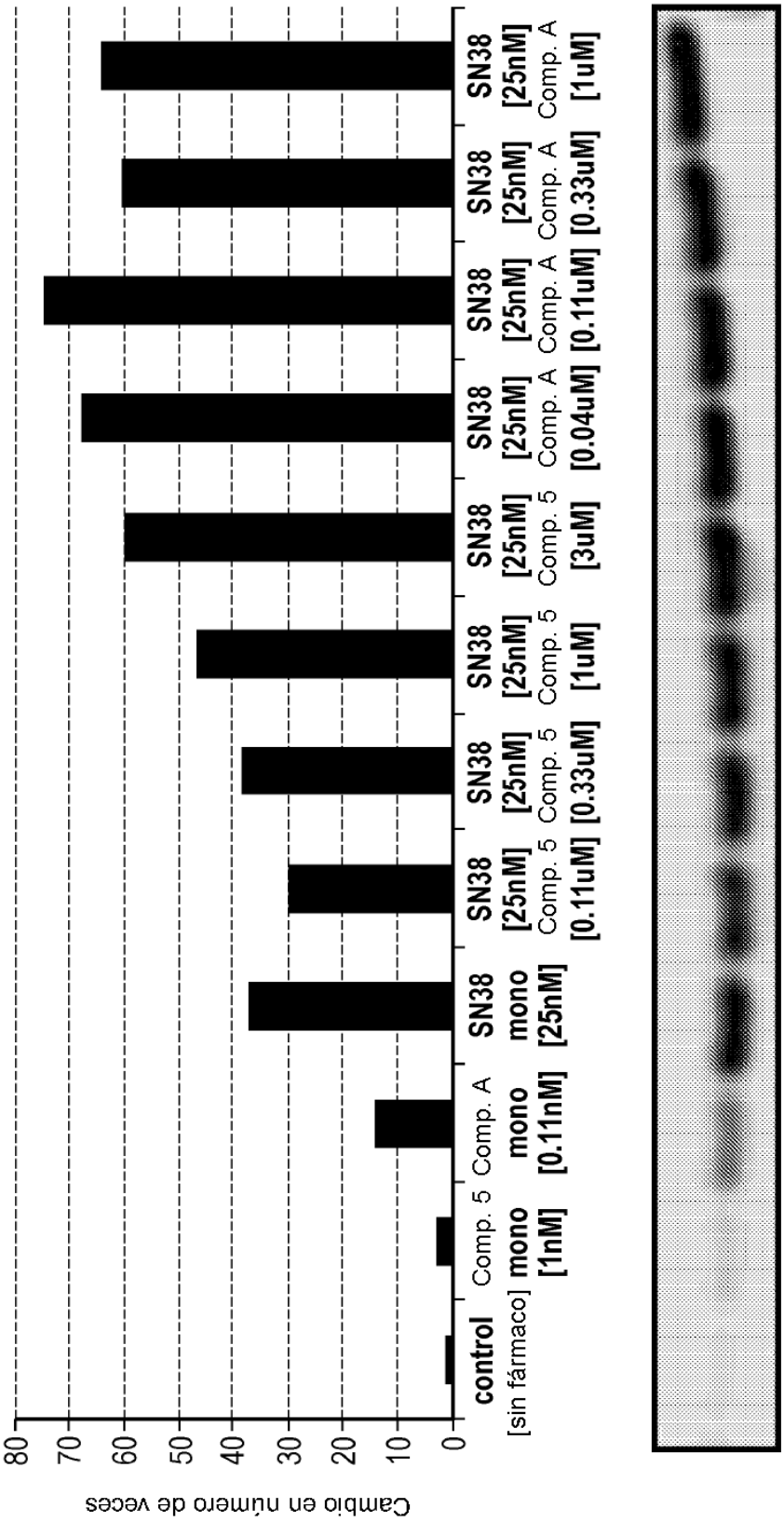

H1299 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de γH2AX S2065
Cambio en número de veces
0
10
20
30
40
50
60
70
80
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 40F

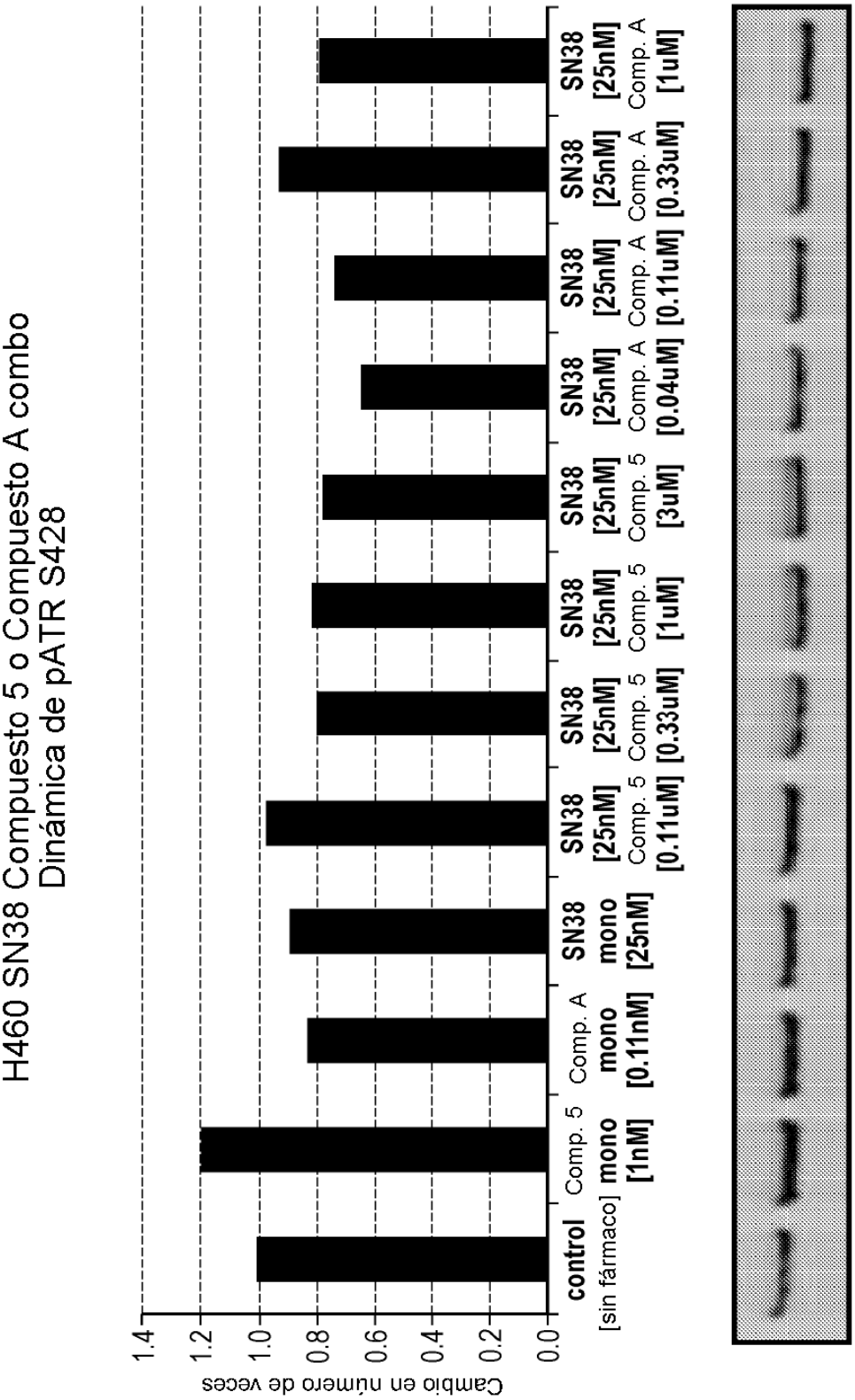

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pATR S428
Cambio en número de veces
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 41A

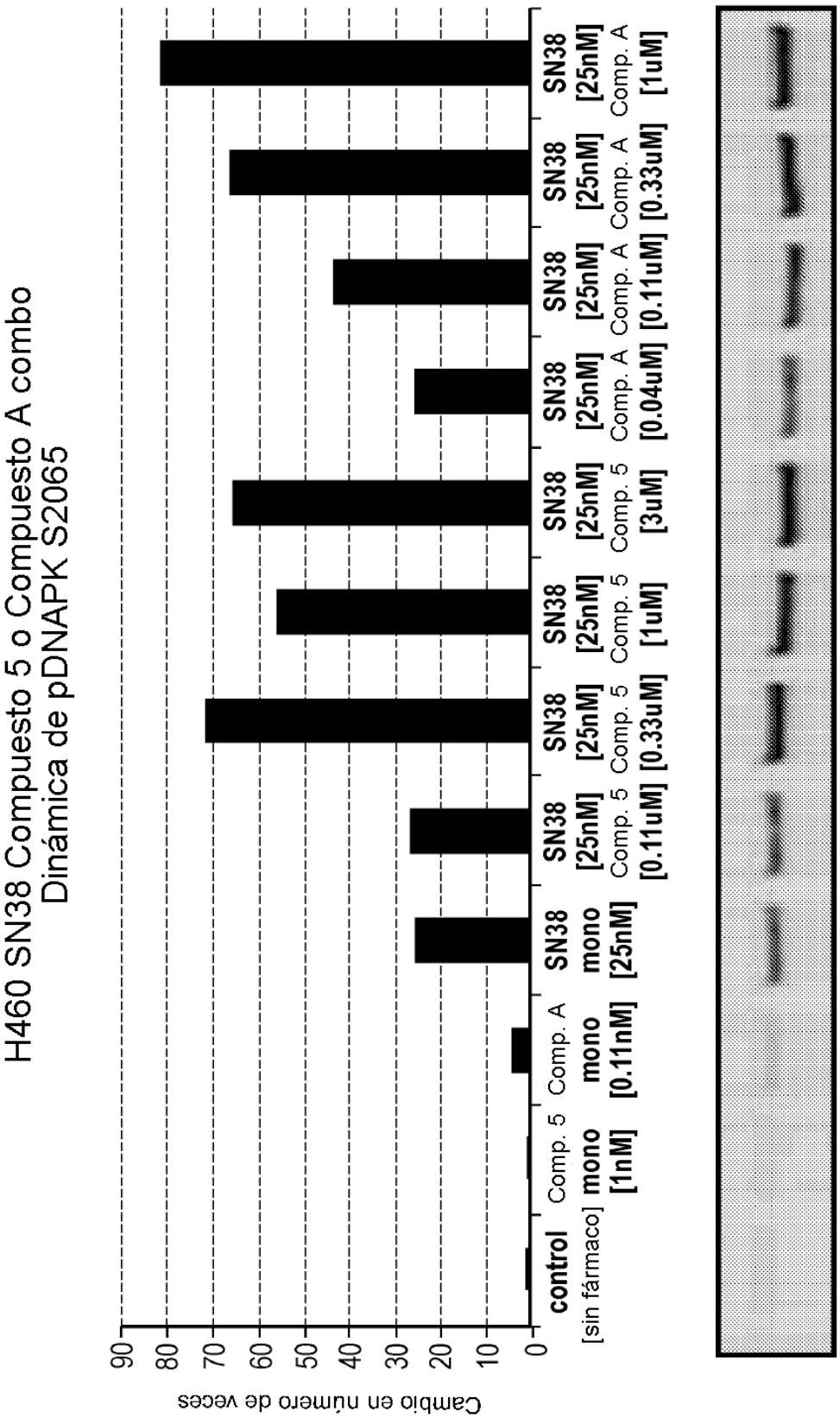

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pDNAPK S2065
Cambio en número de veces
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 41B

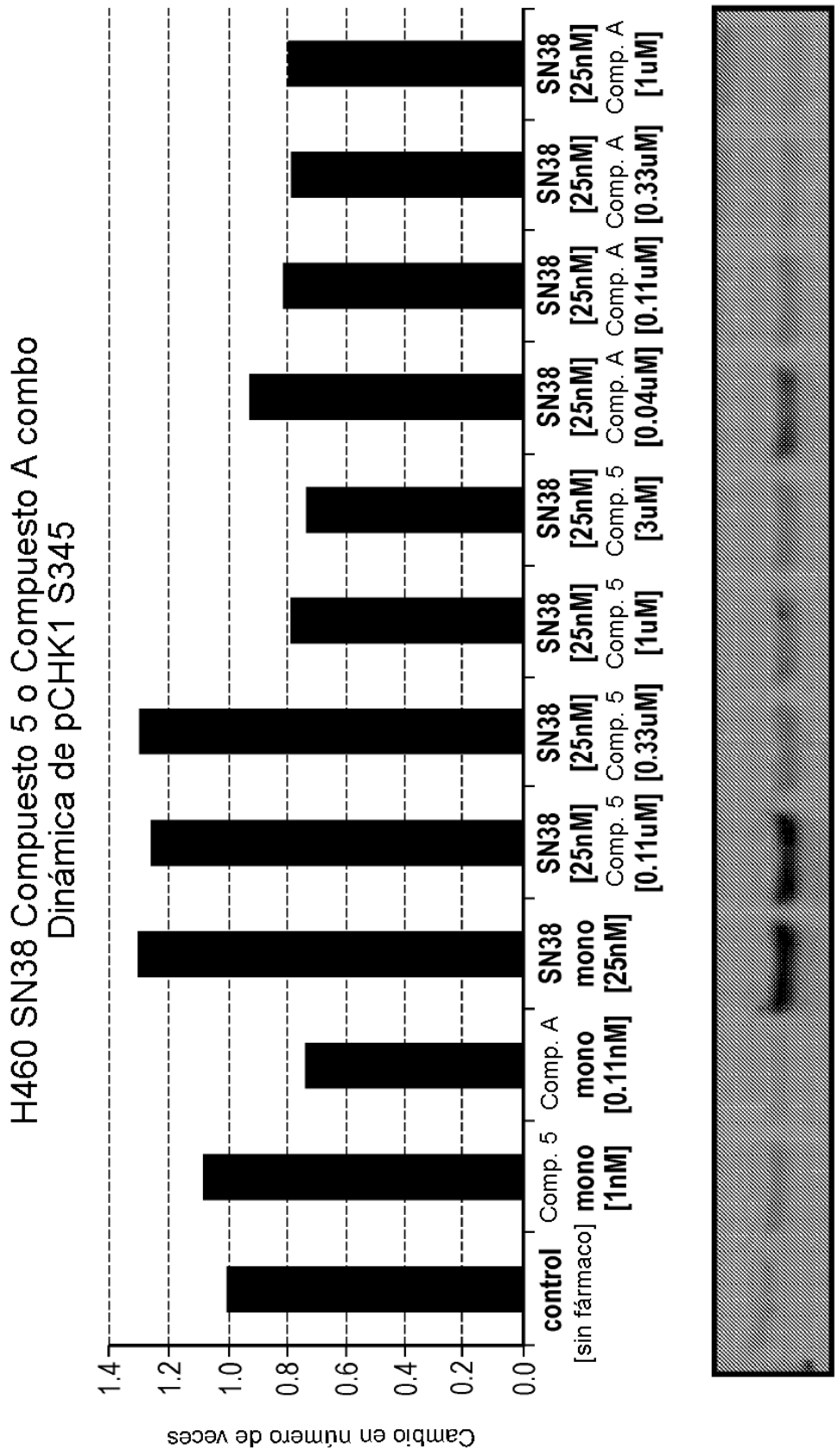

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 S345
Cambio en número de veces
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
[sin fármaco]
control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
Comp. 5 [0.11uM] + SN38 [25nM]
Comp. 5 [0.33uM] + SN38 [25nM]
Comp. 5 [1uM] + SN38 [25nM]
Comp. 5 [3uM] + SN38 [25nM]
Comp. A [0.04uM] + SN38 [25nM]
Comp. A [0.11uM] + SN38 [25nM]
Comp. A [0.33uM] + SN38 [25nM]
Comp. A [1uM] + SN38 [25nM]

Fig. 41C

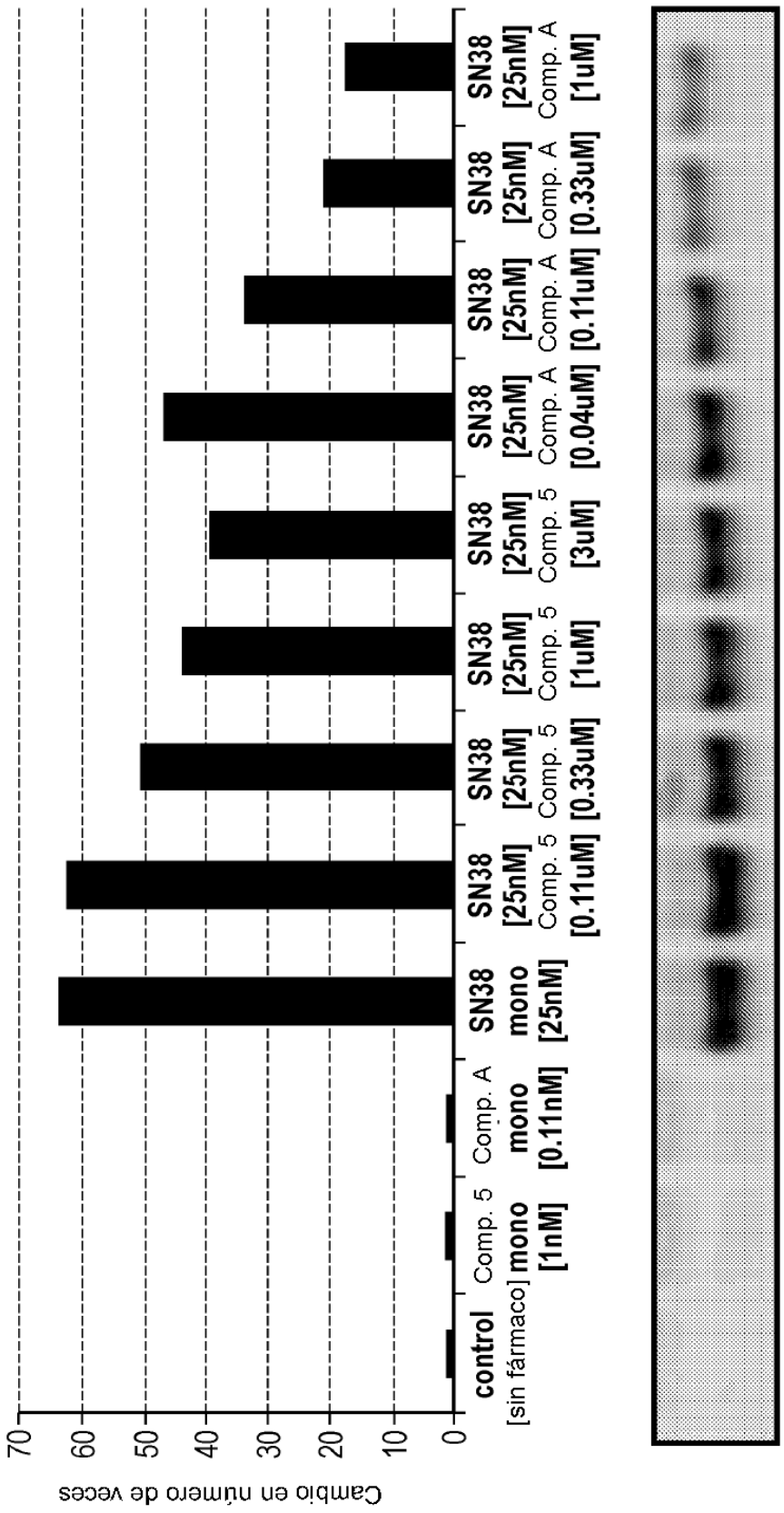

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pRPA2 S33
Cambio en número de veces
0
10
20
30
40
50
60
70
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 41D

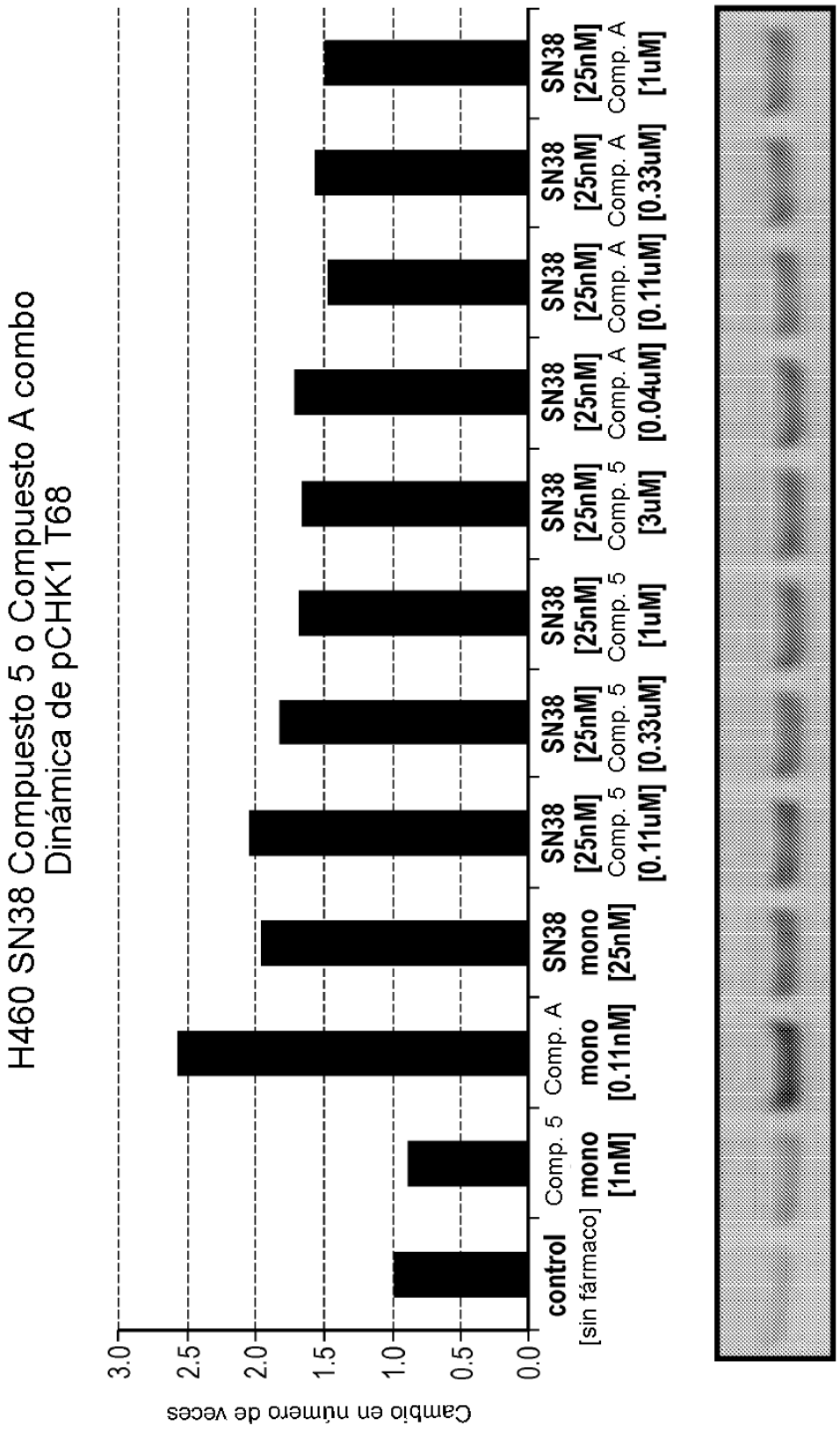

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 T68
Cambio en número de veces
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 41E

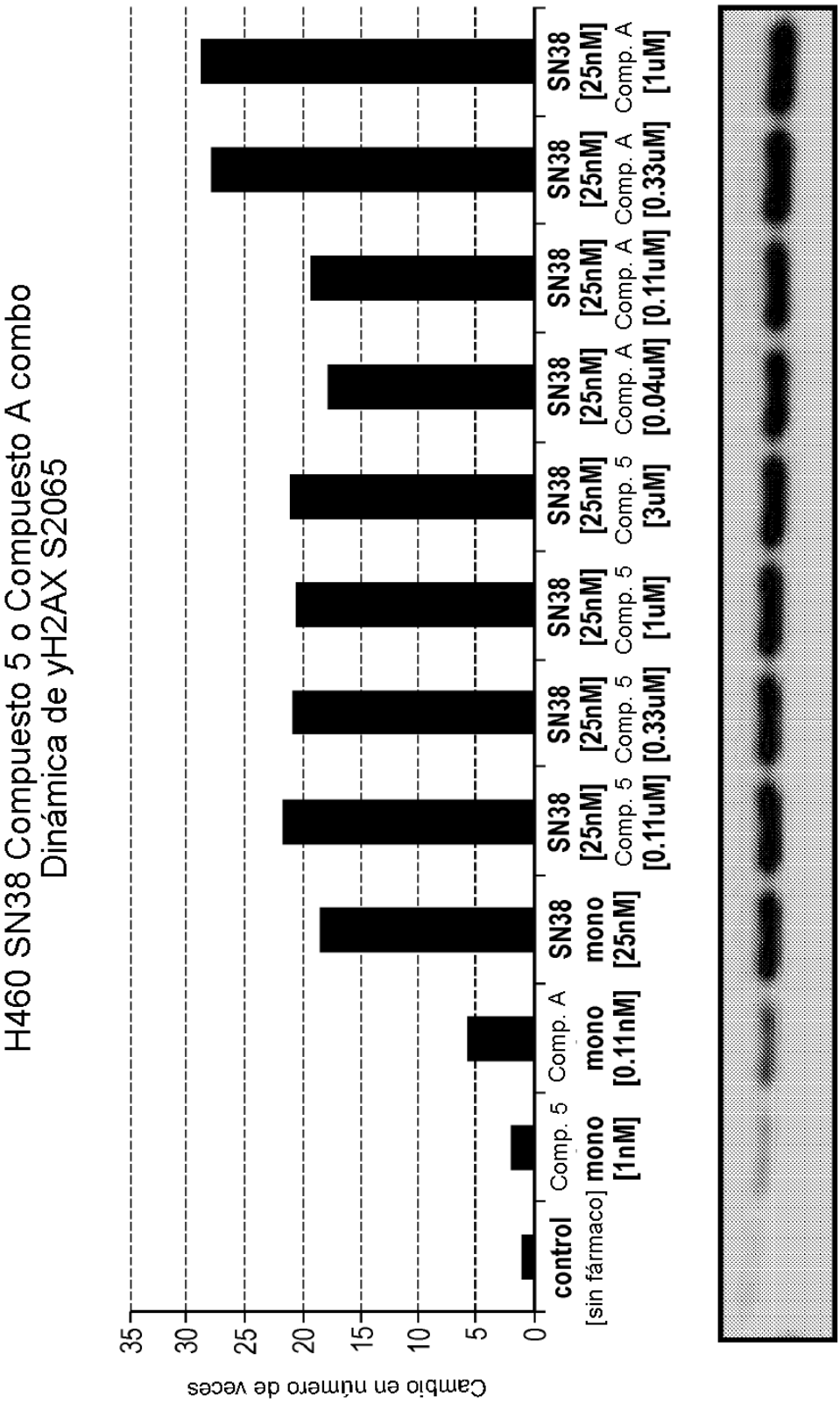

H460 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de γH2AX S2065
Cambio en número de veces
0
5
10
15
20
25
30
35
[sin fármaco] control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
Comp. 5 [0.11uM] SN38 [25nM]
Comp. 5 [0.33uM] SN38 [25nM]
Comp. 5 [1uM] SN38 [25nM]
Comp. 5 [3uM] SN38 [25nM]
Comp. A [0.04uM] SN38 [25nM]
Comp. A [0.11uM] SN38 [25nM]
Comp. A [0.33uM] SN38 [25nM]
Comp. A [1uM] SN38 [25nM]

Fig. 41F

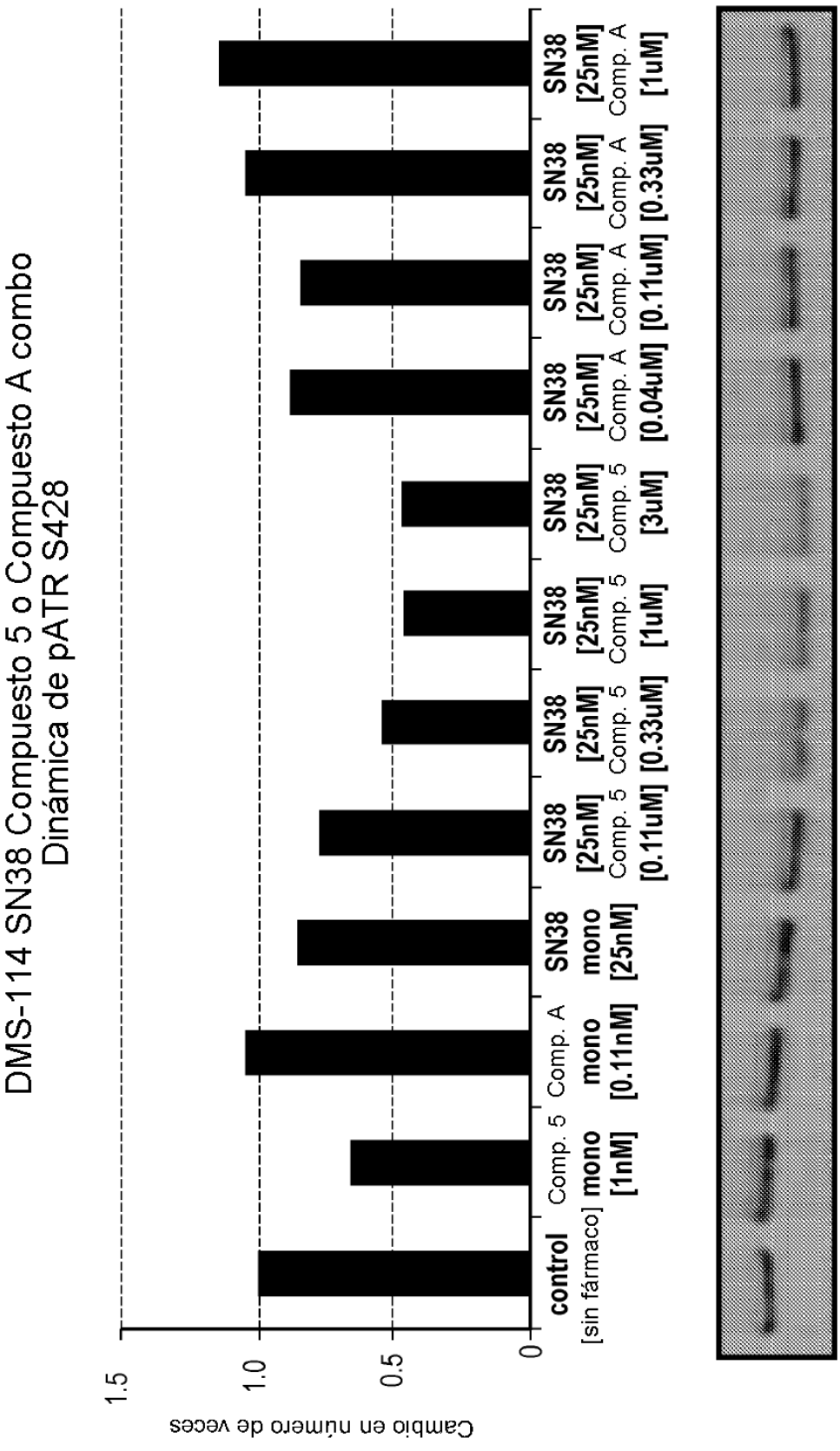

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pATR S428
Cambio en número de veces
1.5
1.0
0.5
0
[sin fármaco]
control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 42A

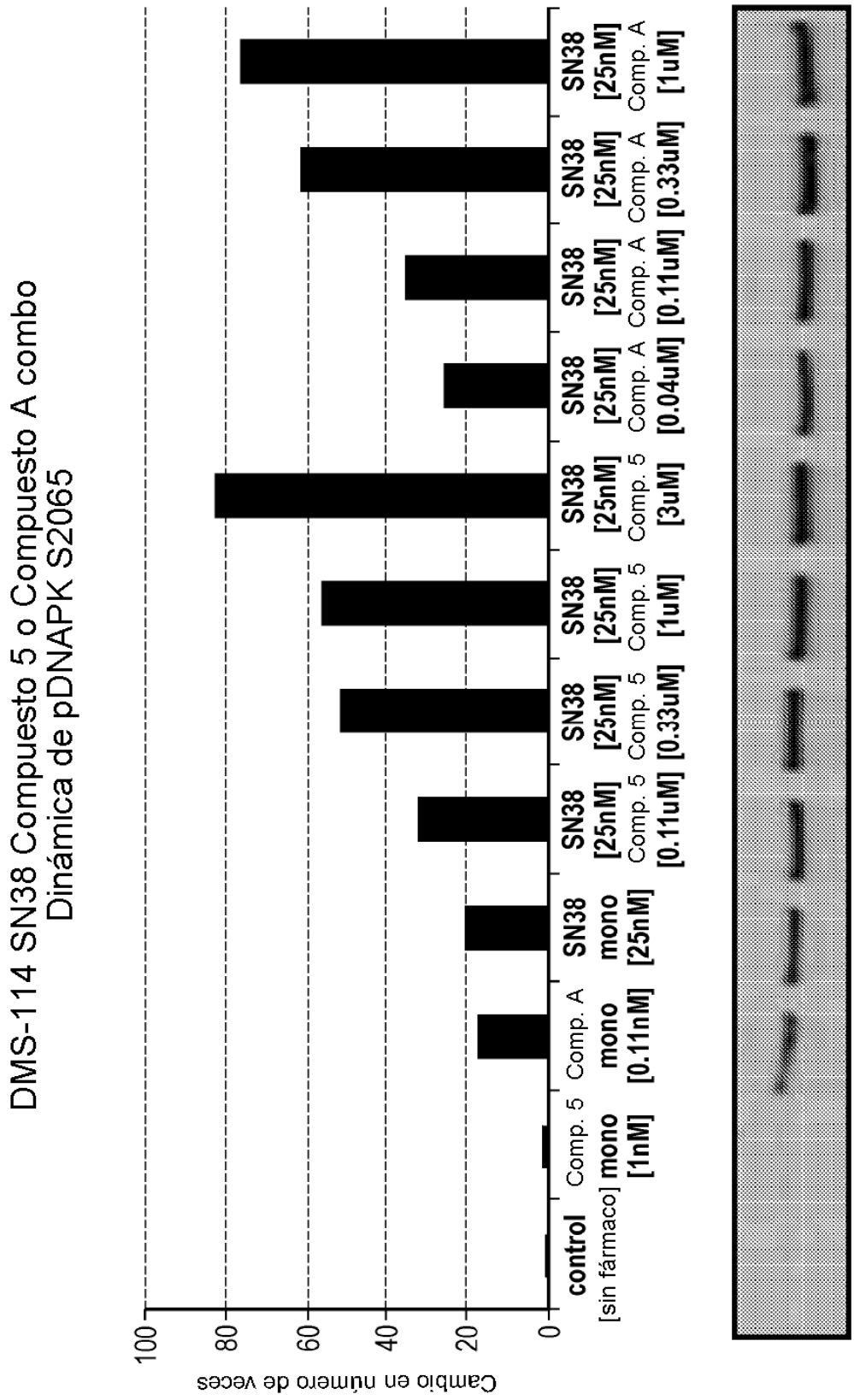

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pDNAPK S2065
Cambio en número de veces
100
80
60
40
20
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 42B

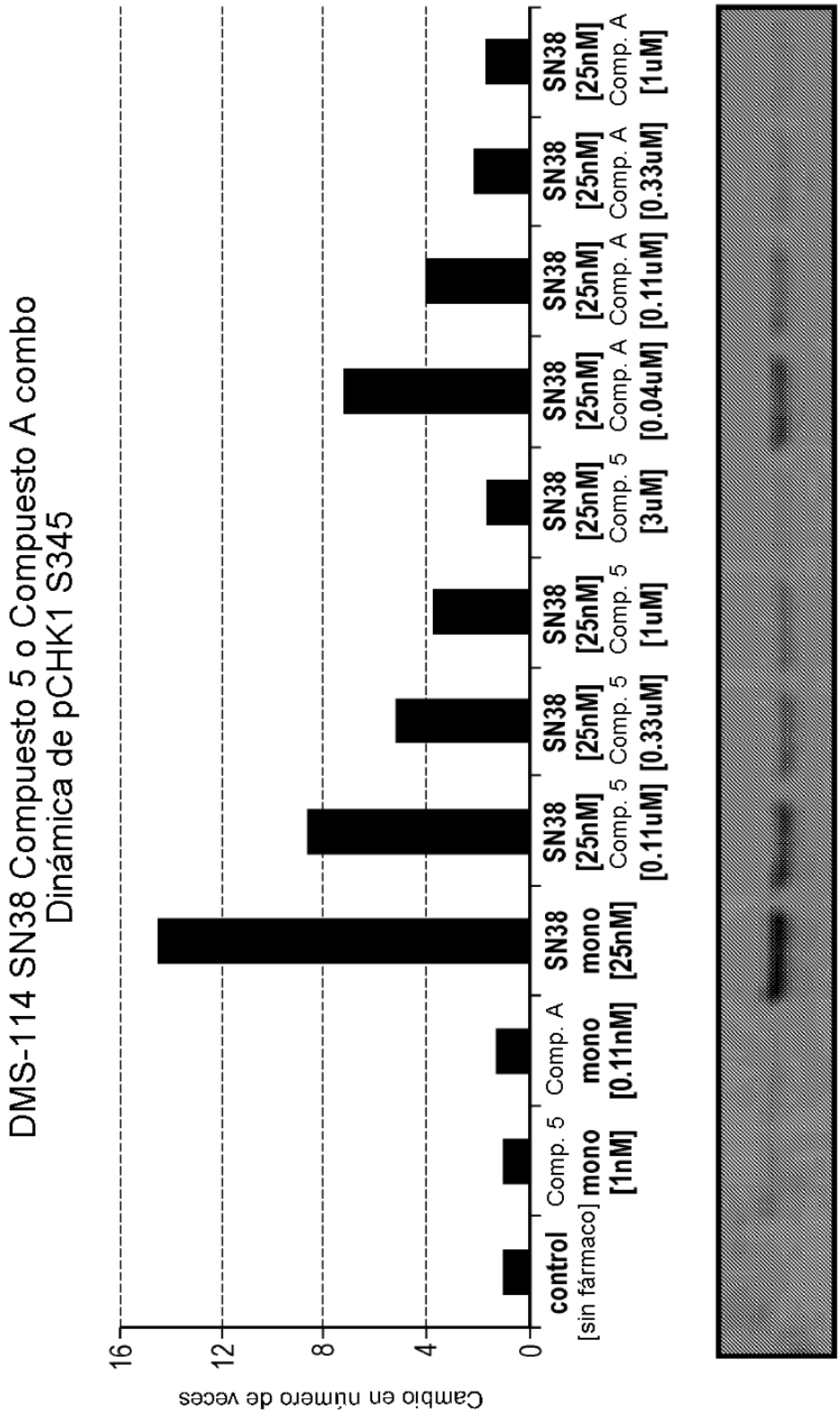

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 S345
Cambio en número de veces
16
12
8
4
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 42C

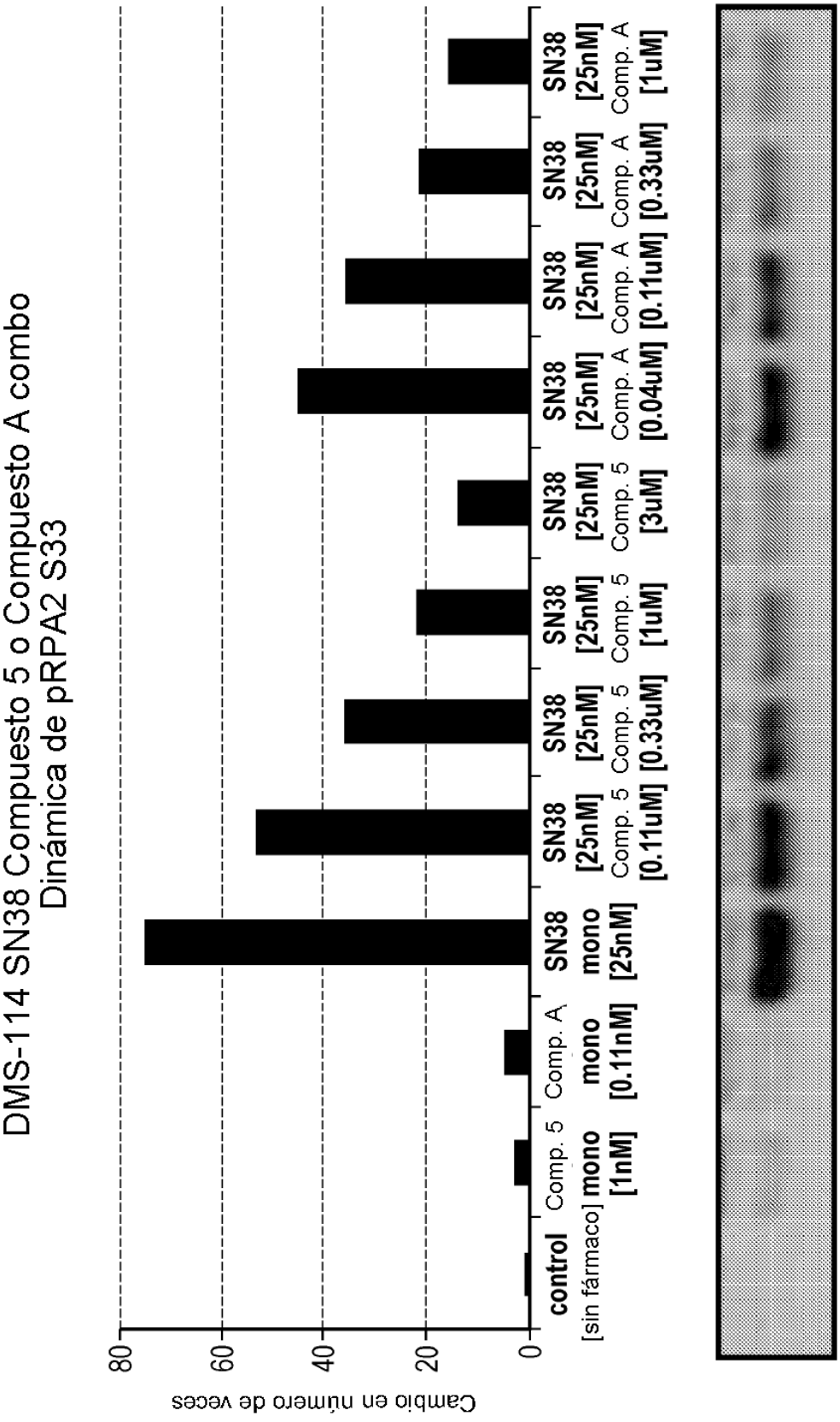

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pRPA2 S33
Cambio en número de veces
0
20
40
60
80
control
[sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
Comp. 5 [0.11uM]
Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [1uM]
Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.04uM]
Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.33uM]
Comp. A [1uM]

Fig. 42D

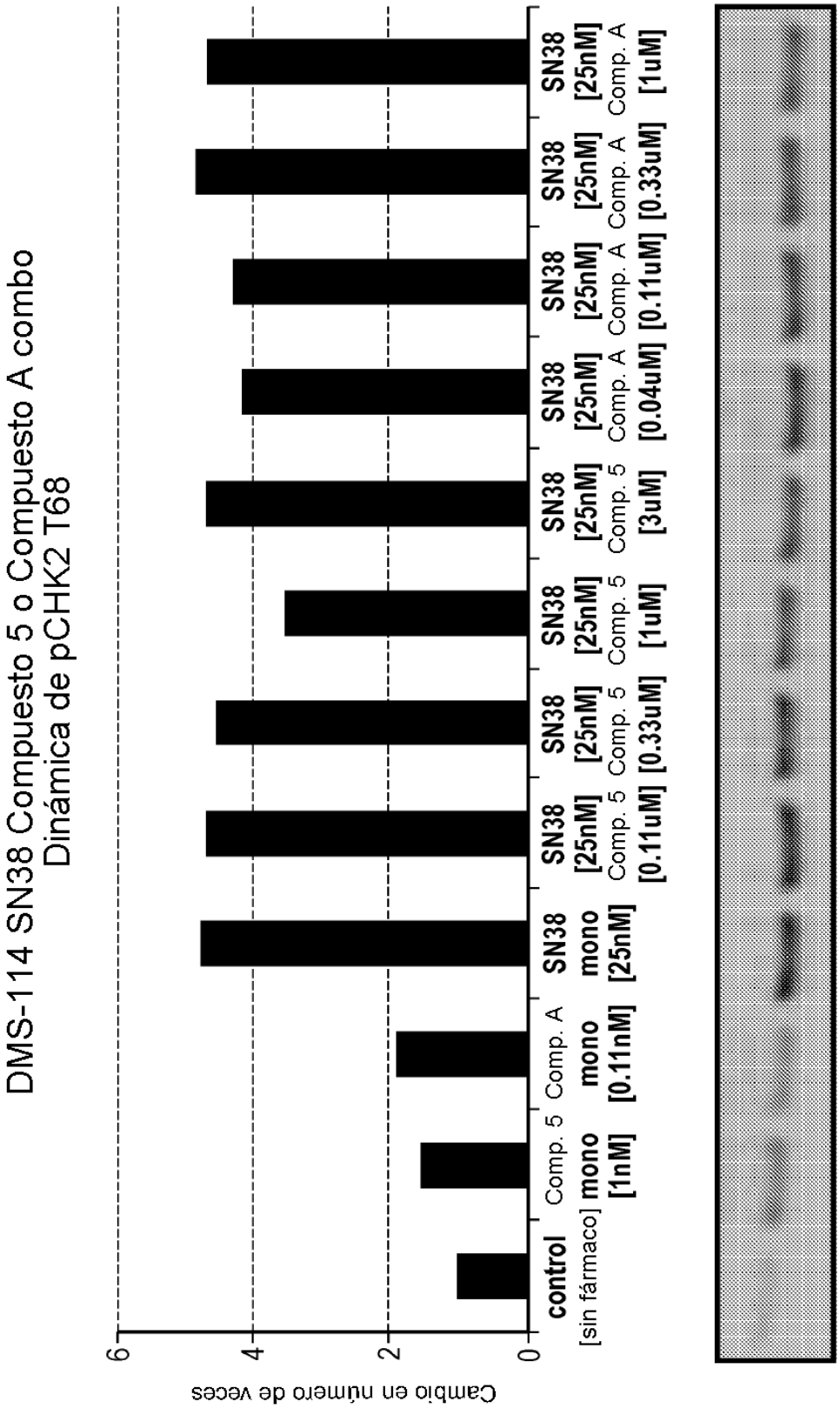

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK2 T68
Cambio en número de veces
0
2
4
6
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 42E

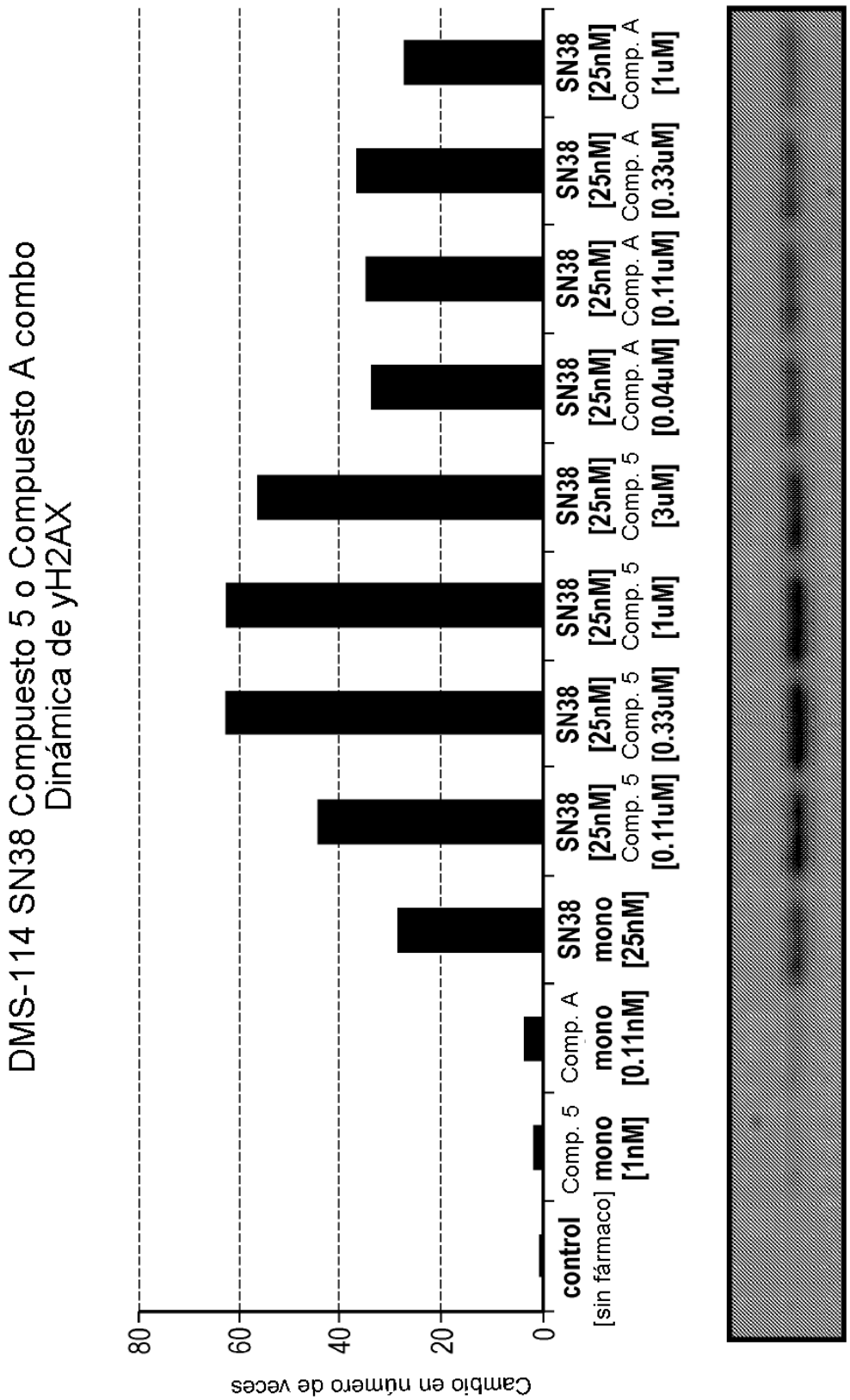

DMS-114 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de yH2AX
Cambio en número de veces
0
20
40
60
80
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 42F

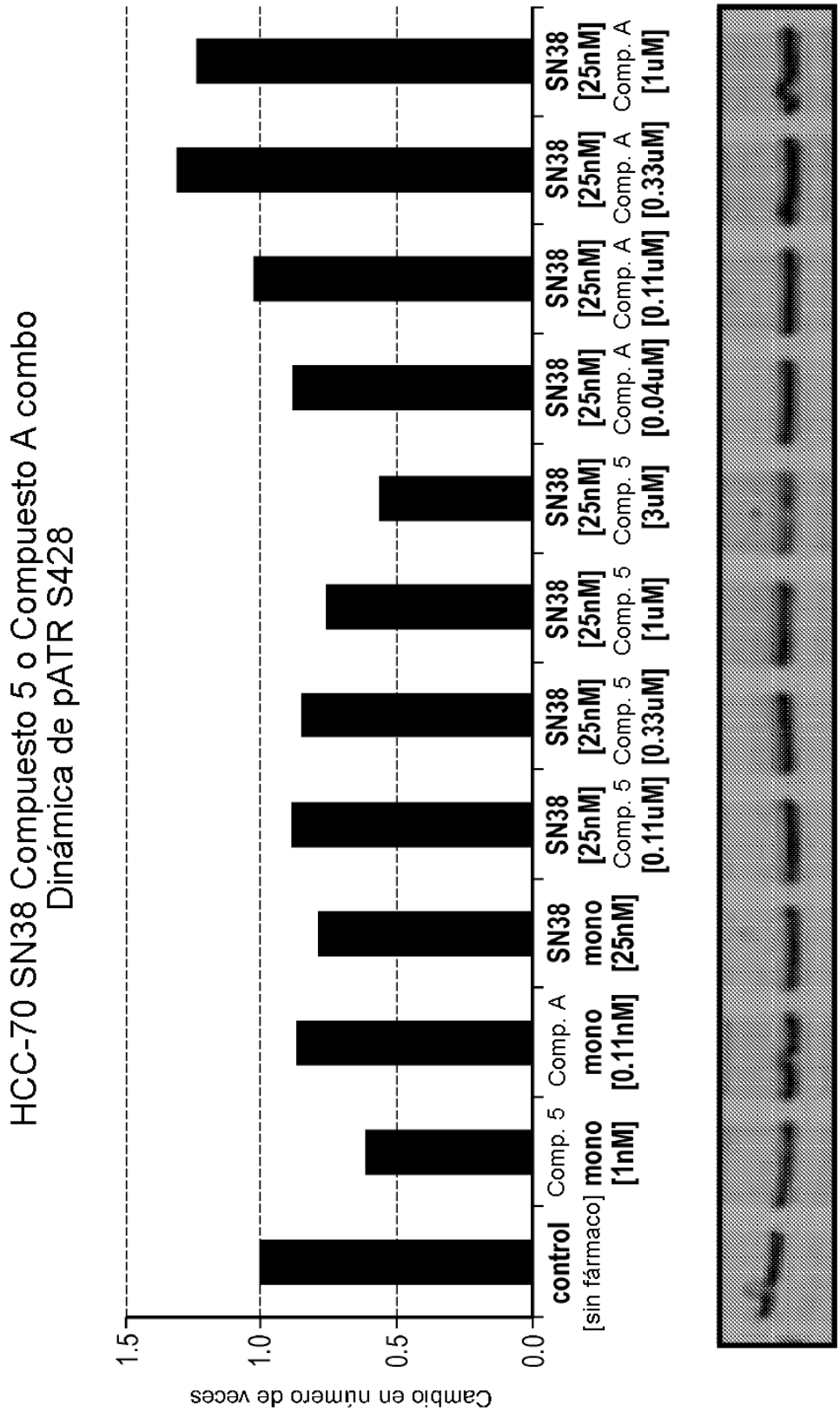

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pATR S428
Cambio en número de veces
1.5
1.0
0.5
0.0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 43A

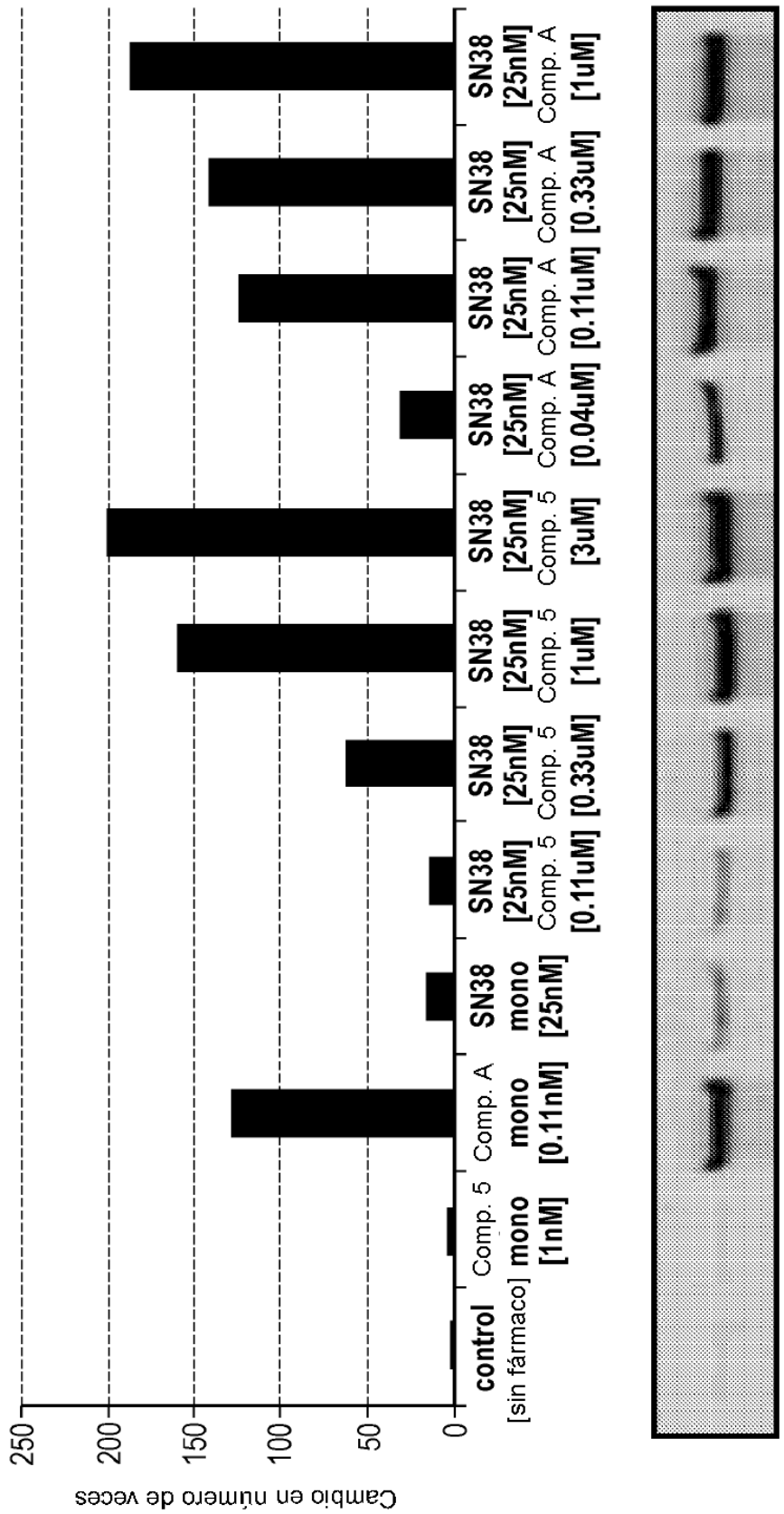

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pDNAPK S2065
Cambio en número de veces
250
200
150
100
50
0
control
[sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 43B

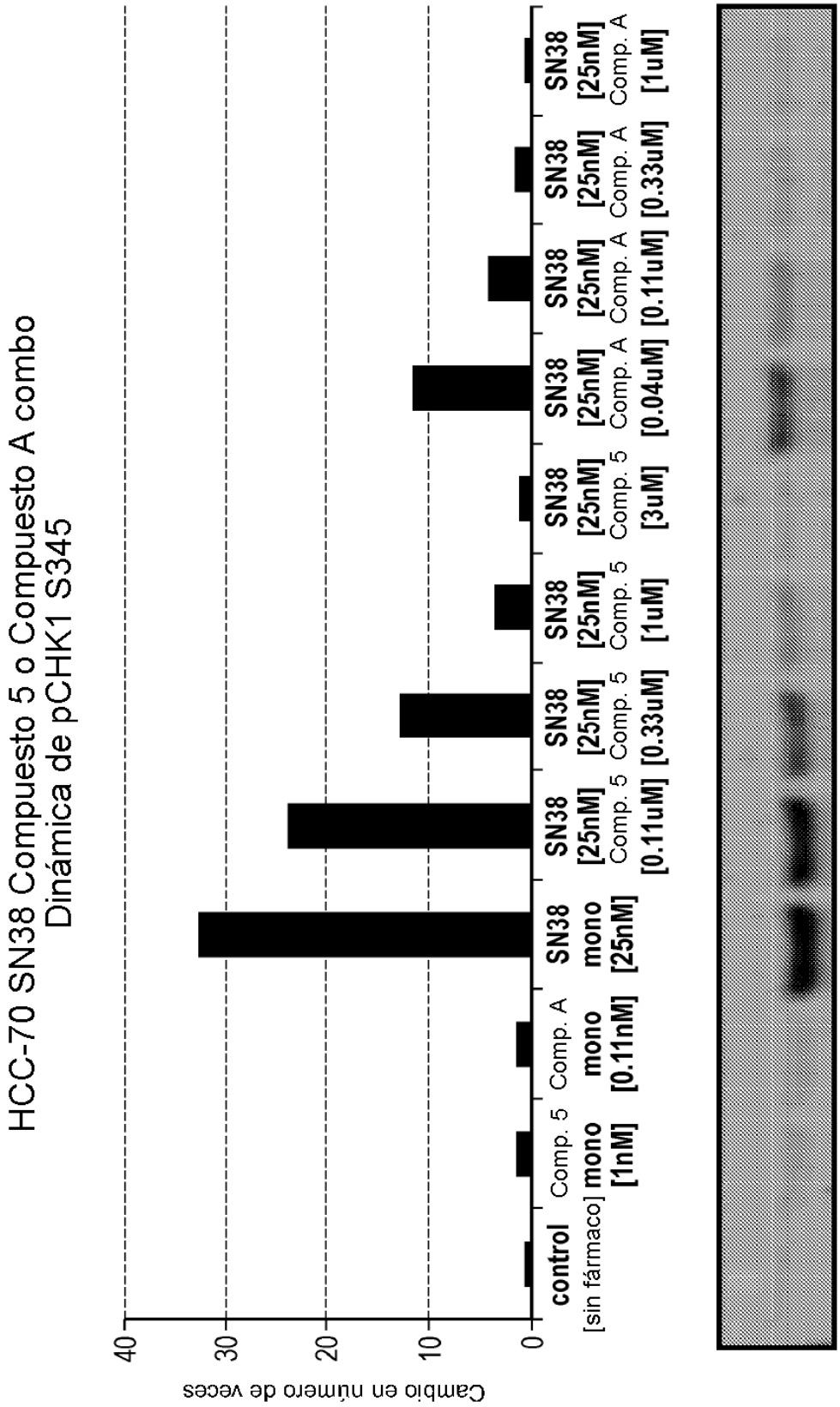

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 S345
Cambio en número de veces
40
30
20
10
0
[sin fármaco]
control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 43C

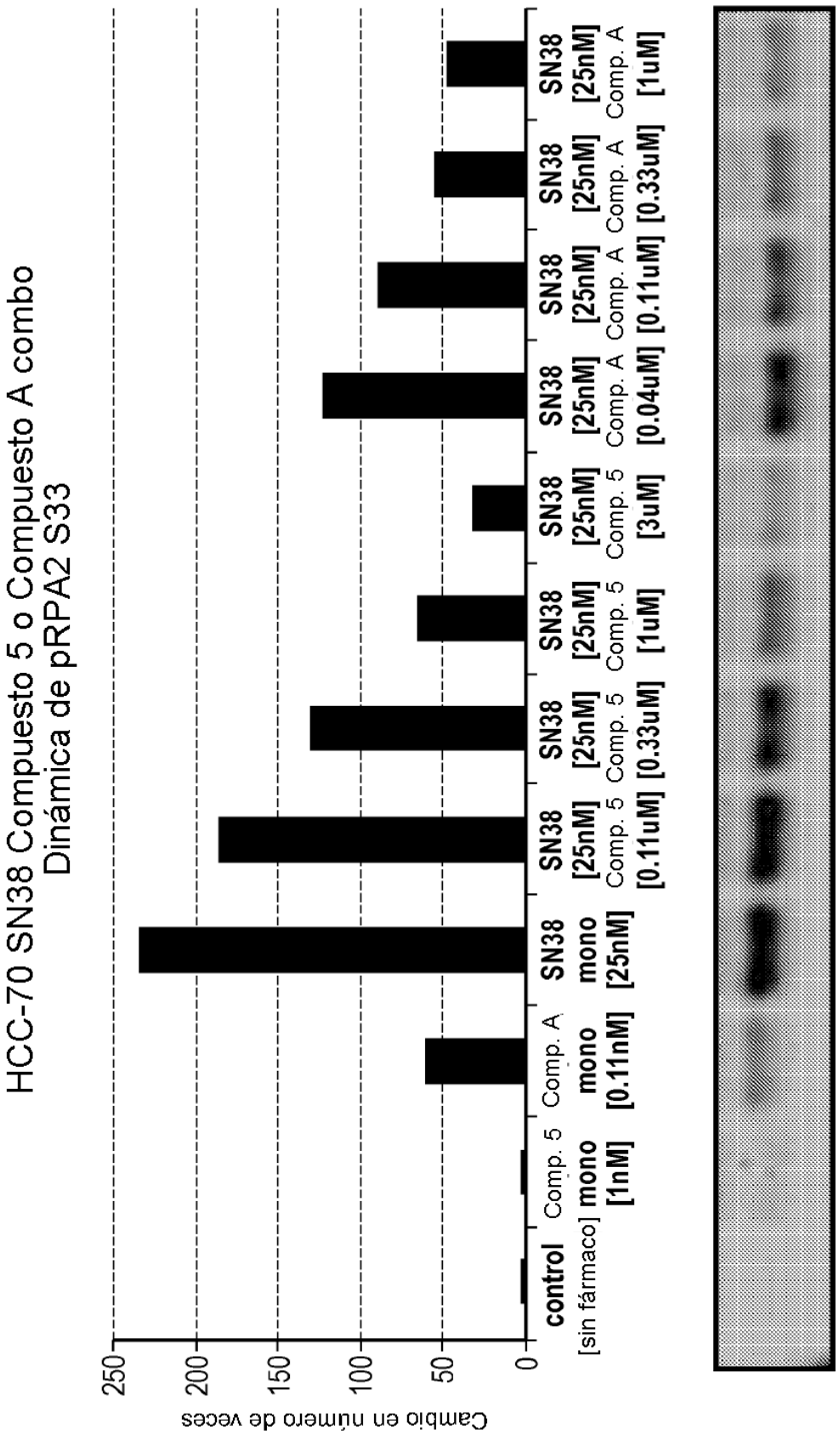

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pRPA2 S33
Cambio en número de veces
250
200
150
100
50
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 43D

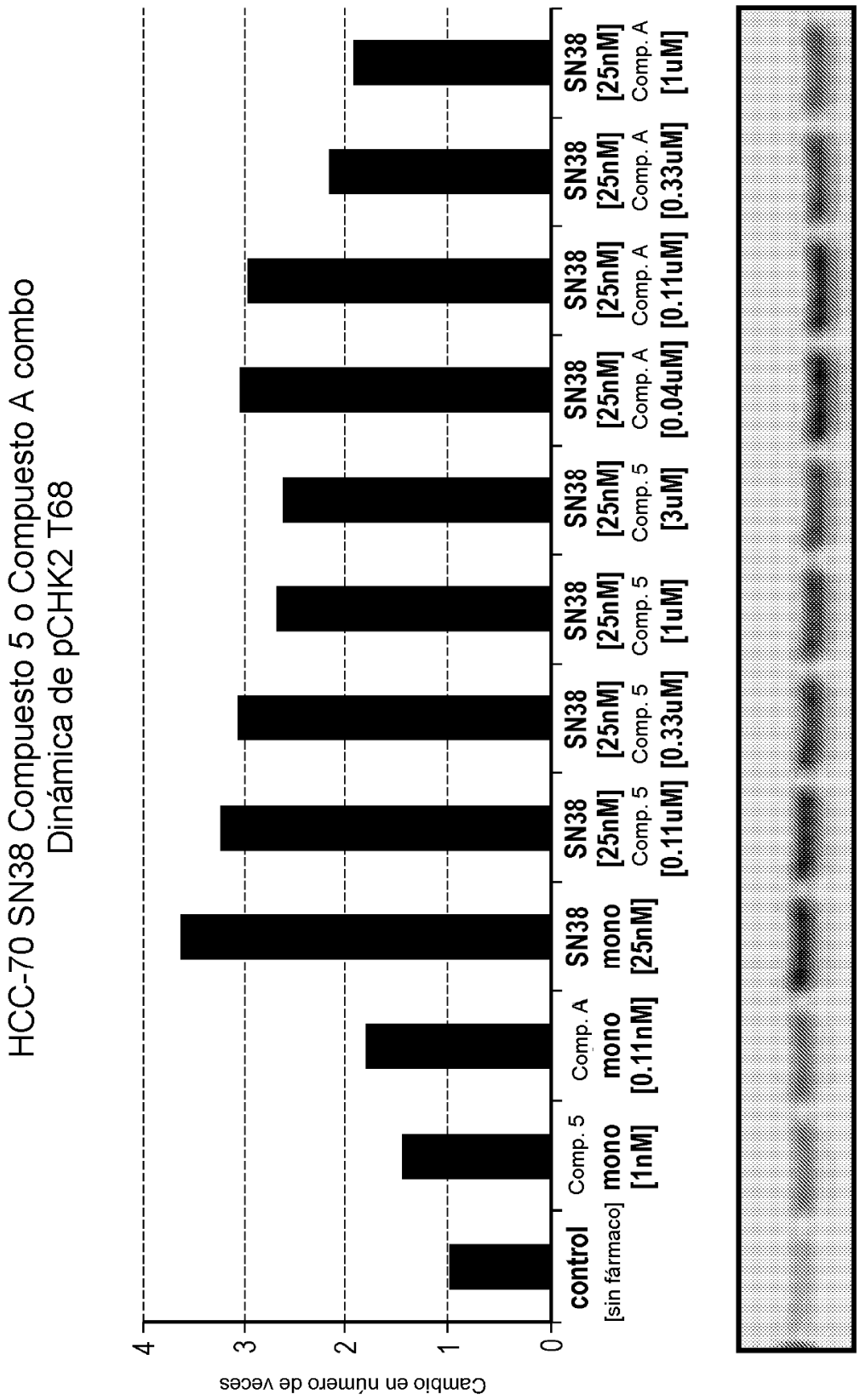

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK2 T68
Cambio en número de veces
0
1
2
3
4
control
[sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 43E

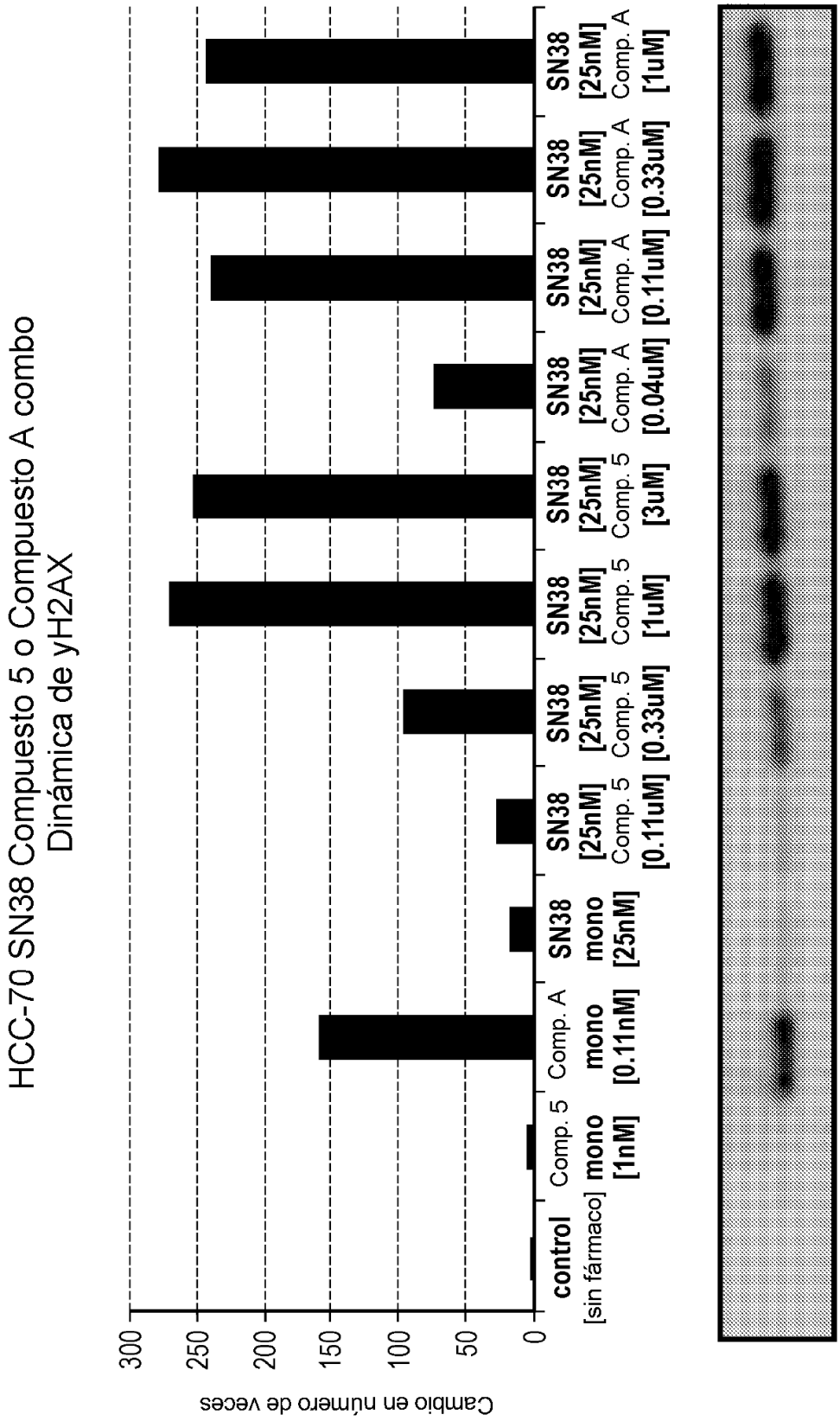

HCC-70 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de γH2AX
Cambio en número de veces
300
250
200
150
100
50
0
control
[sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM]
Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM]
Comp. A [1uM]

Fig. 43F

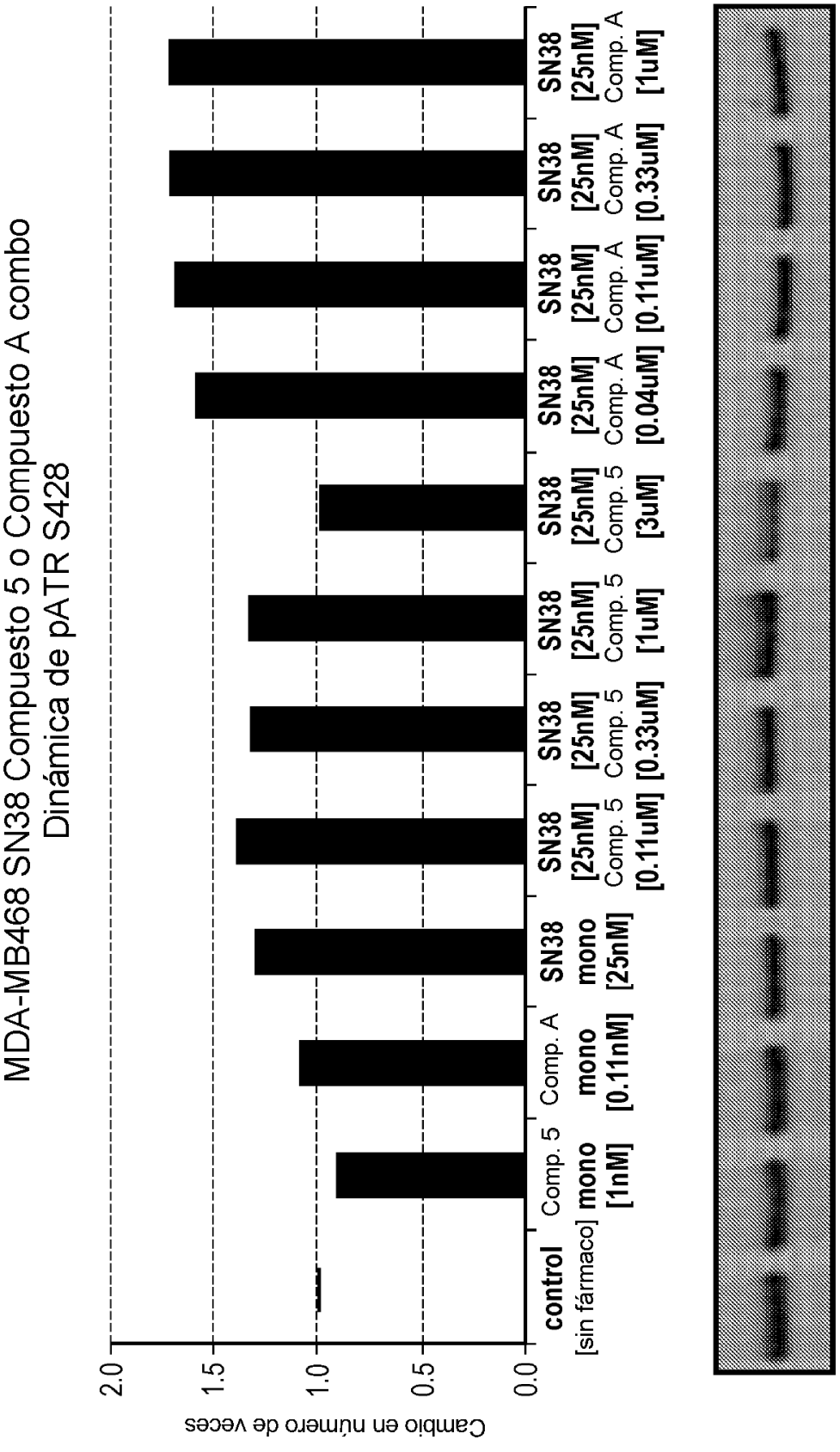

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pATR S428
Cambio en número de veces
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44A

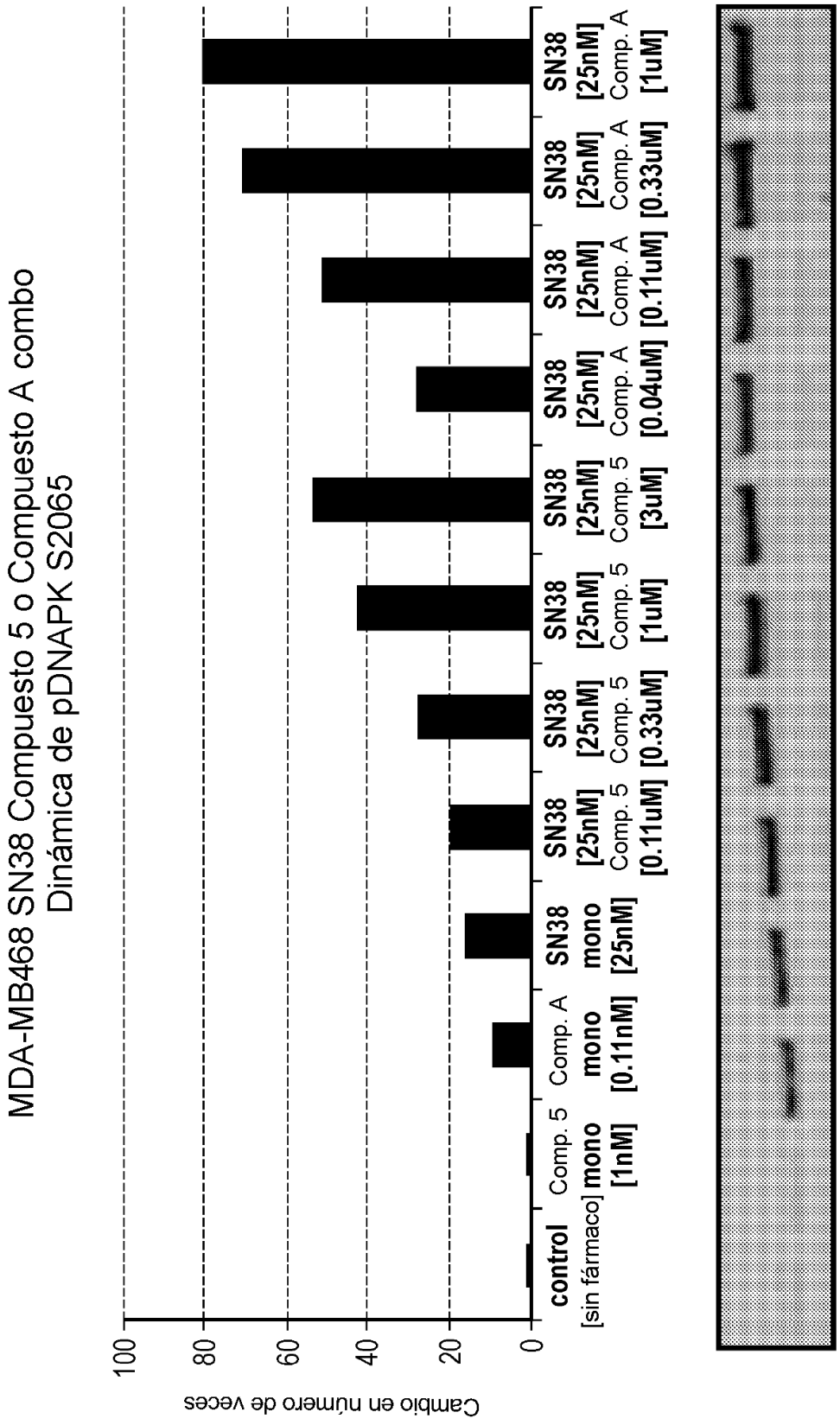

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pDNAPK S2065
Cambio en número de veces
0
20
40
60
80
100
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44B

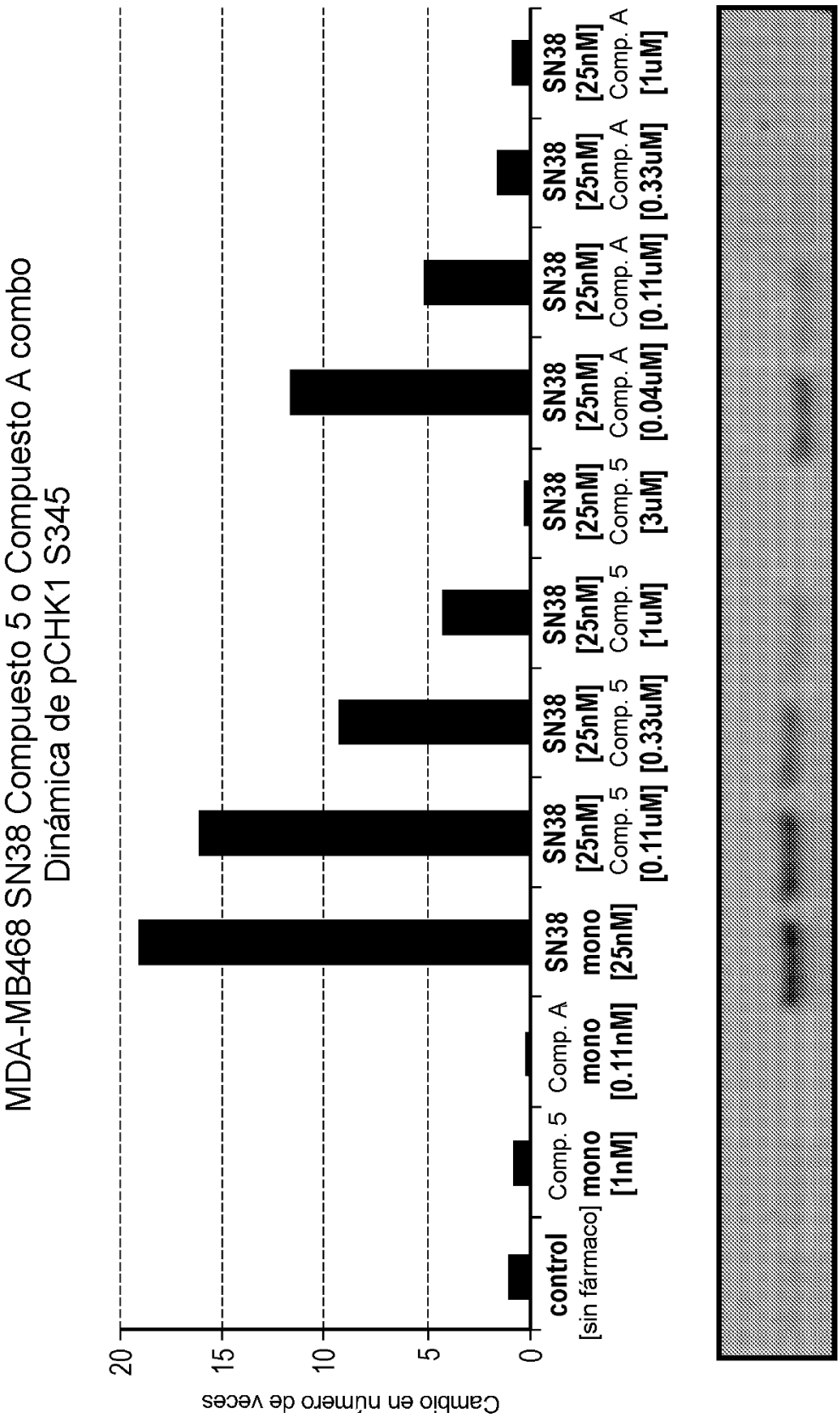

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK1 S345
Cambio en número de veces
0
5
10
15
20
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44C

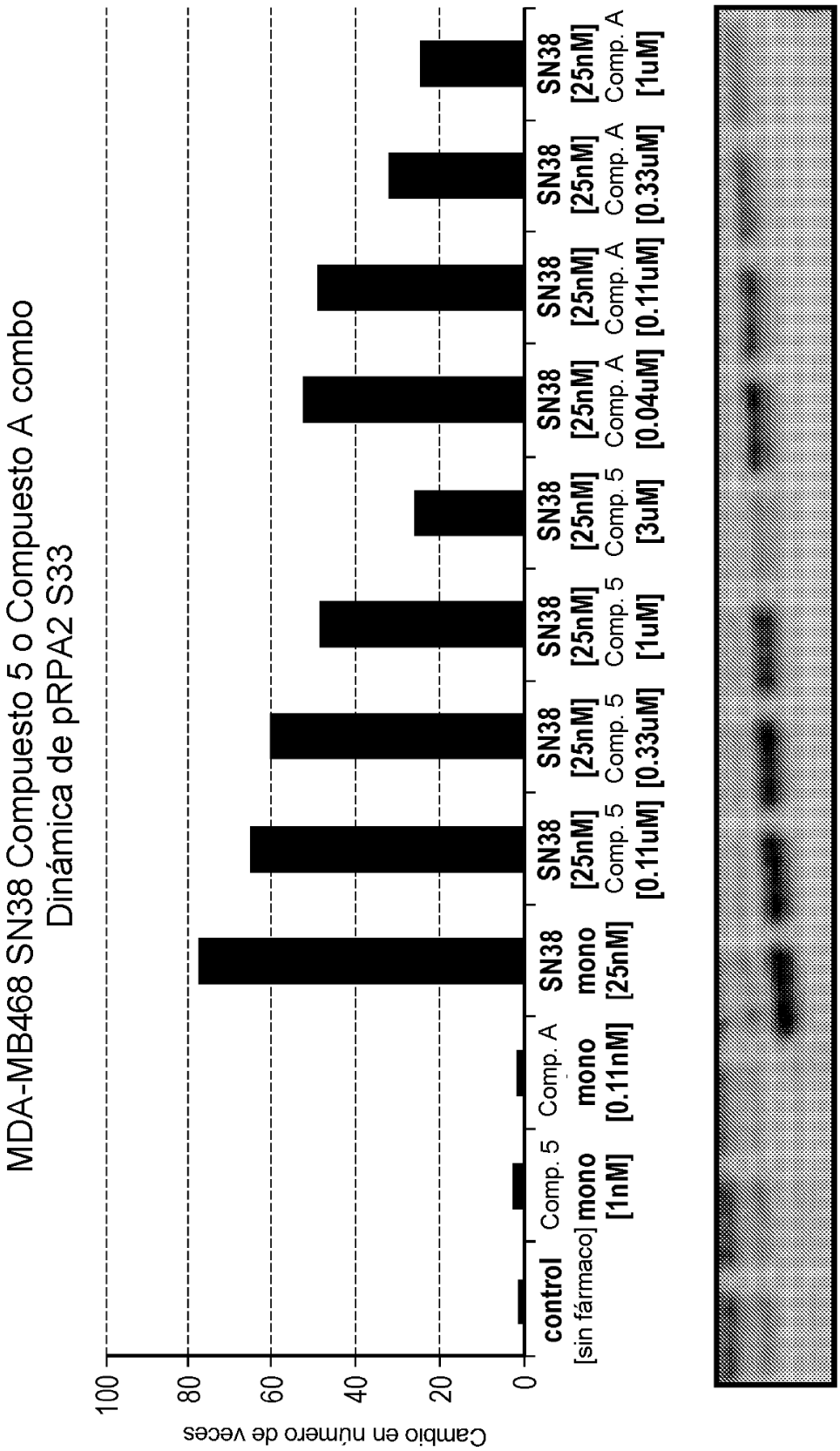

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pRPA2 S33
Cambio en número de veces
100
80
60
40
20
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44D

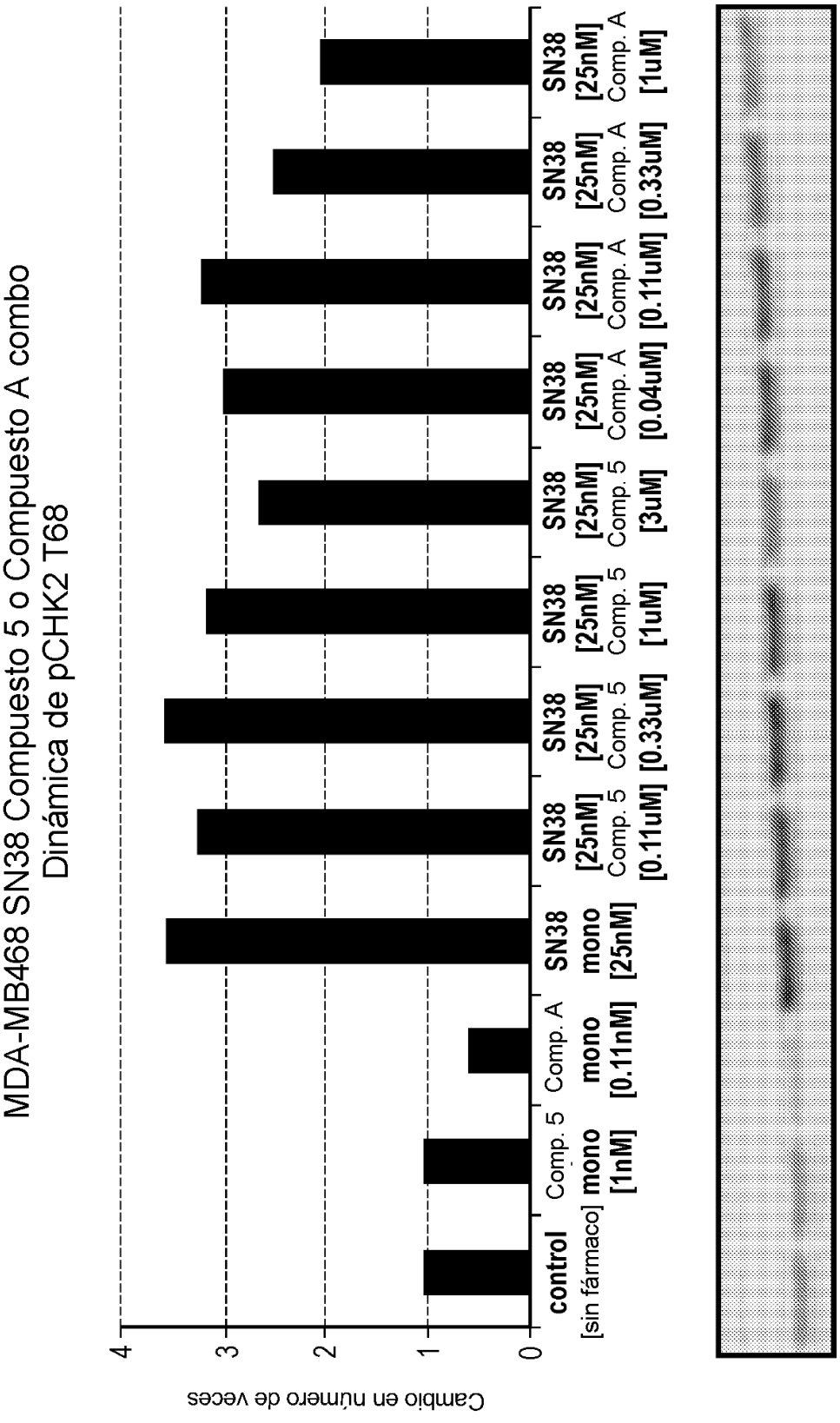

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de pCHK2 T68
Cambio en número de veces
0
1
2
3
4
[sin fármaco] control
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44E

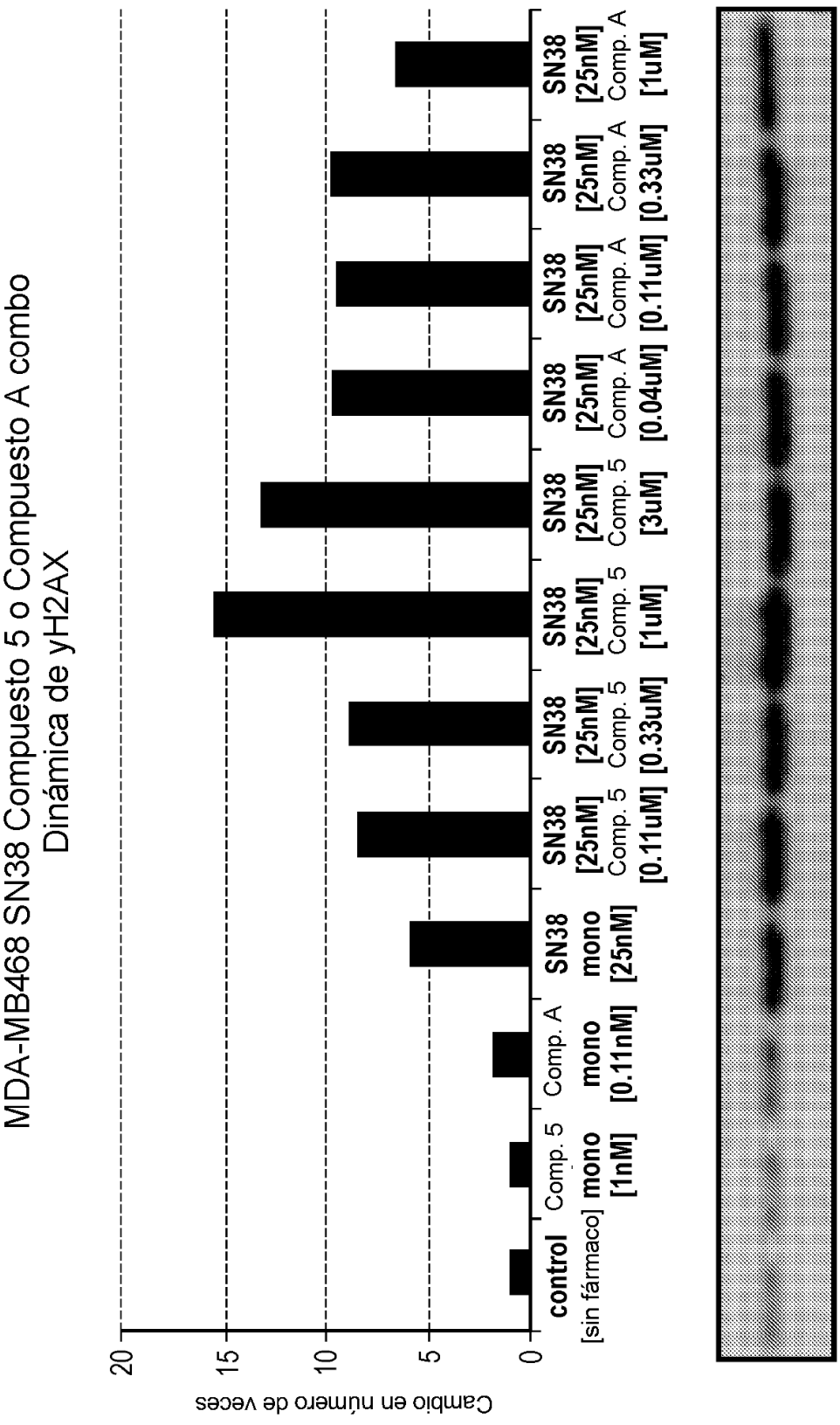

MDA-MB468 SN38 Compuesto 5 o Compuesto A combo
Dinámica de γH2AX
Cambio en número de veces
20
15
10
5
0
control [sin fármaco]
Comp. 5 mono [1nM]
Comp. A mono [0.11nM]
SN38 mono [25nM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [1uM]
SN38 [25nM] Comp. 5 [3uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.04uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.11uM]
SN38 [25nM] Comp. A [0.33uM]
SN38 [25nM] Comp. A [1uM]

Fig. 44F

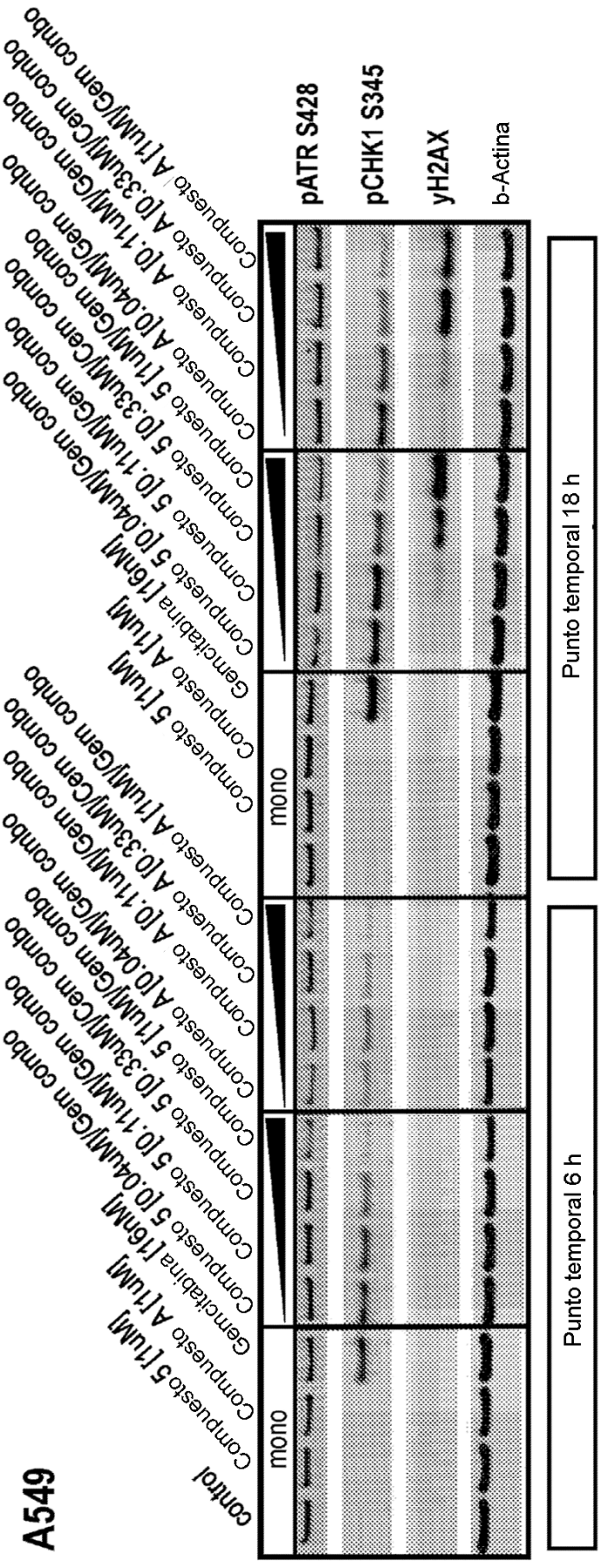

A549
control
mono
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
mono
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 45

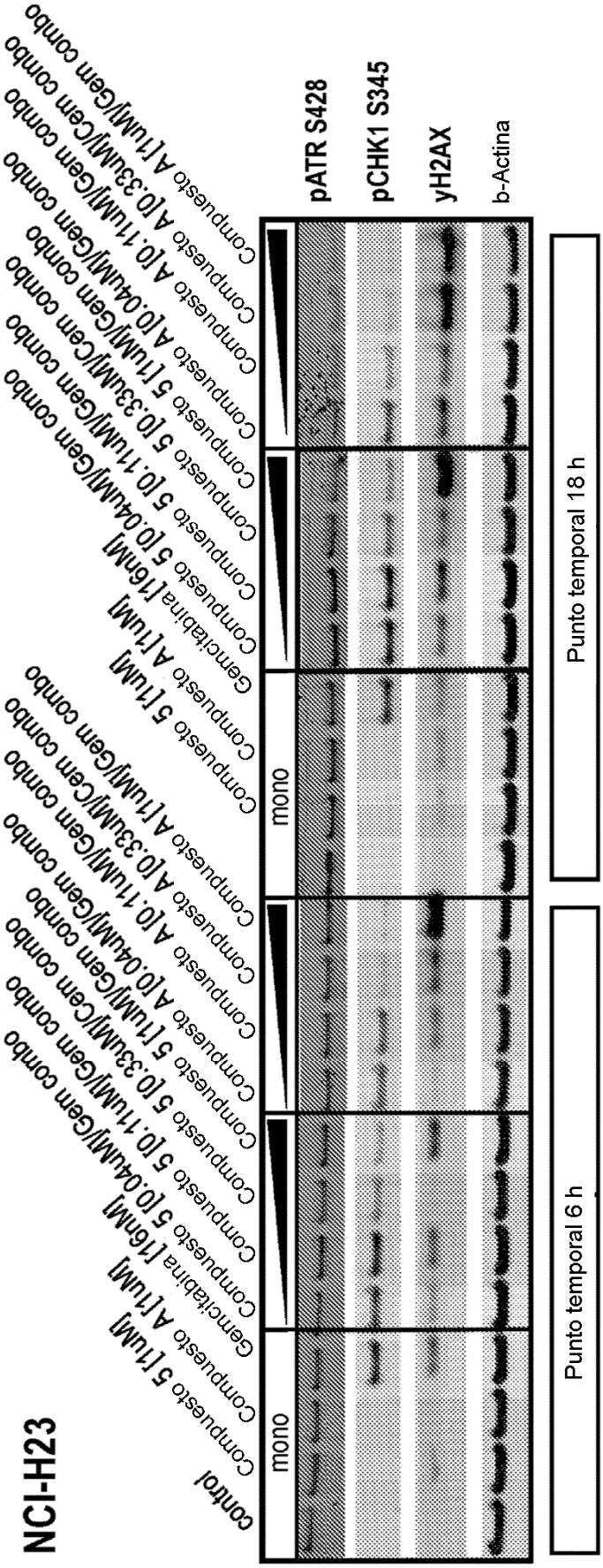

NCI-H23
control
mono
Compuesto 5 1uM
Compuesto A 1uM
Gemcitabina 16nM
Compuesto 5 1uM/Gem combo
Compuesto A 1uM/Gem combo
Compuesto 5 0.33uM/Gem combo
Compuesto A 0.33uM/Gem combo
Compuesto 5 0.11uM/Gem combo
Compuesto A 0.11uM/Gem combo
Compuesto 5 0.04uM/Gem combo
Compuesto A 0.04uM/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 46

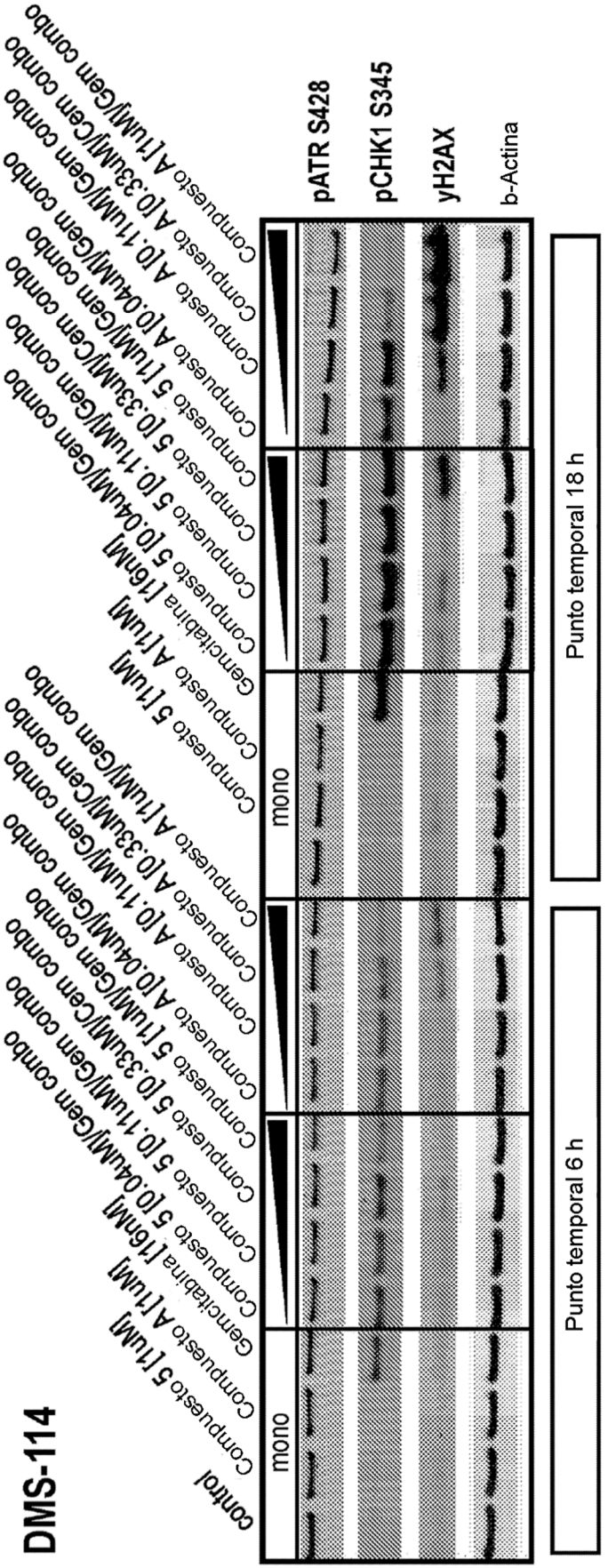

DMS-114
control
mono
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
mono
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 47

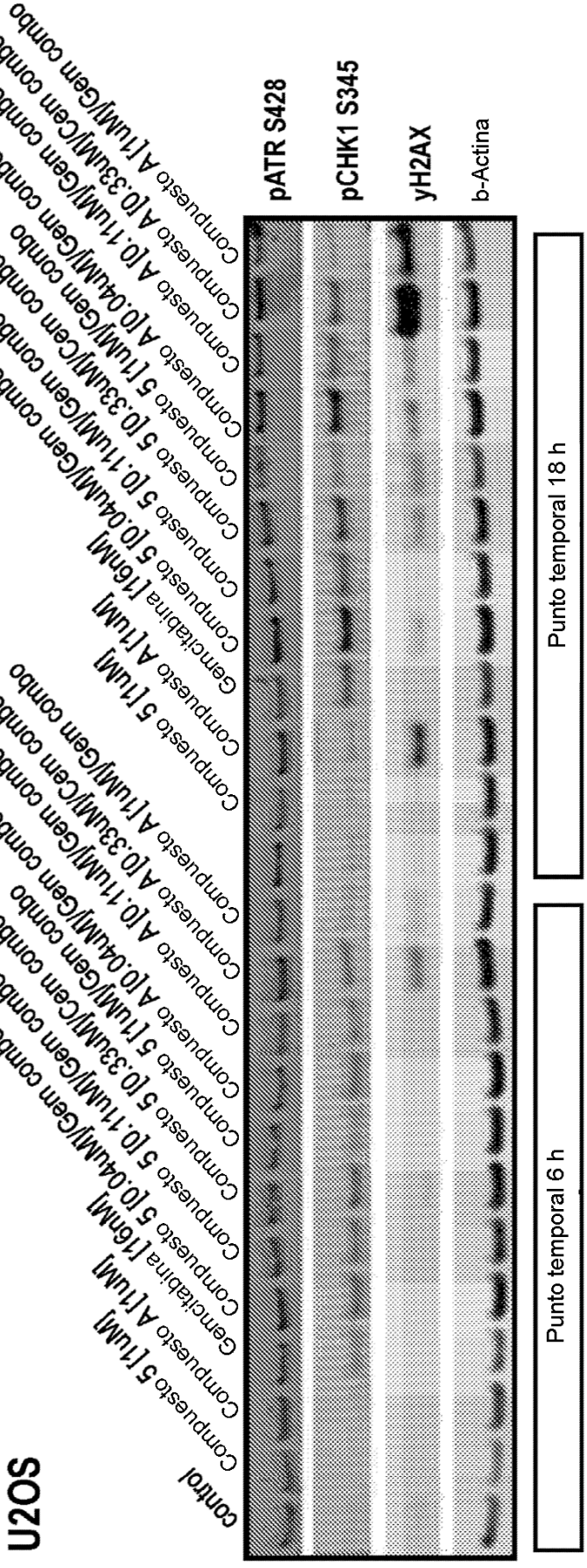

U2OS
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto A [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto A [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 48

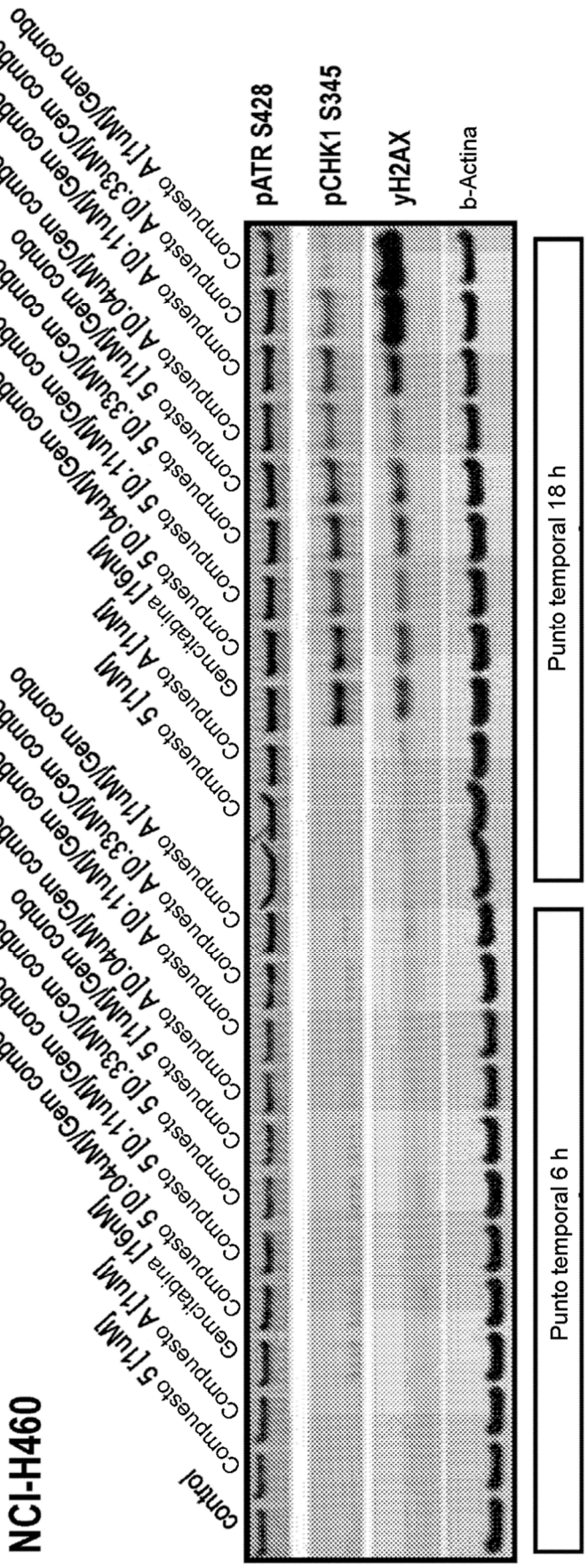

NCI-H460
control
Compuesto 5 [1uM]
Compuesto A [1uM]
Gemcitabina [16nM]
Compuesto 5 [0.04uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.11uM]/Gem combo
Compuesto 5 [0.33uM]/Gem combo
Compuesto 5 [1uM]/Gem combo
Compuesto A [0.04uM]/Gem combo
Compuesto A [0.11uM]/Gem combo
Compuesto A [0.33uM]/Gem combo
Compuesto A [1uM]/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 49

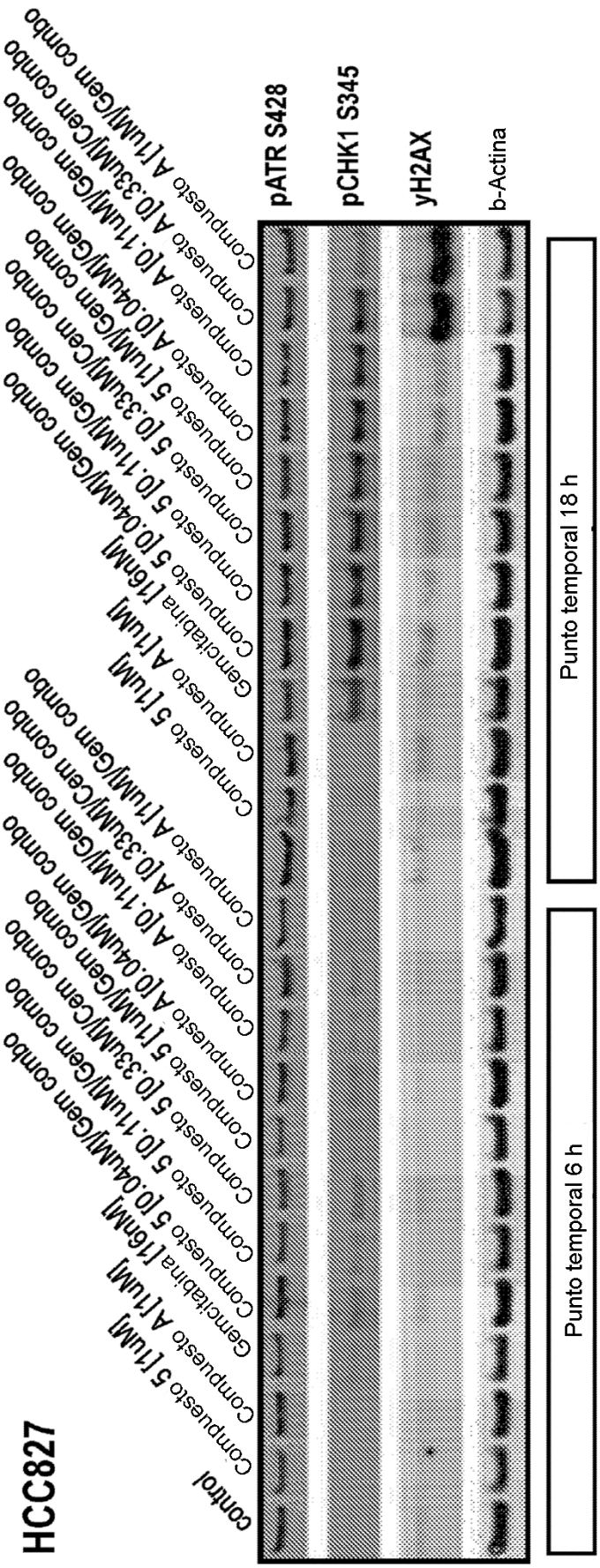

HCC827
control
Compuesto 5 f1uM
Compuesto A f1uM
Gemcitabina f16nM
Compuesto 5 f0.04uM/Gem combo
Compuesto 5 f0.11uM/Gem combo
Compuesto 5 f0.33uM/Gem combo
Compuesto 5 f1uM/Gem combo
Compuesto A f0.04uM/Gem combo
Compuesto A f0.11uM/Gem combo
Compuesto A f0.33uM/Gem combo
Compuesto A f1uM/Gem combo
Compuesto 5 f1uM
Compuesto A f1uM
Gemcitabina f16nM
Compuesto 5 f0.04uM/Gem combo
Compuesto 5 f0.11uM/Gem combo
Compuesto 5 f0.33uM/Gem combo
Compuesto 5 f1uM/Gem combo
Compuesto A f0.04uM/Gem combo
Compuesto A f0.11uM/Gem combo
Compuesto A f0.33uM/Gem combo
Compuesto A f1uM/Gem combo
pATR S428
pCHK1 S345
yH2AX
b-Actina
Punto temporal 6 h
Punto temporal 18 h

Fig. 50

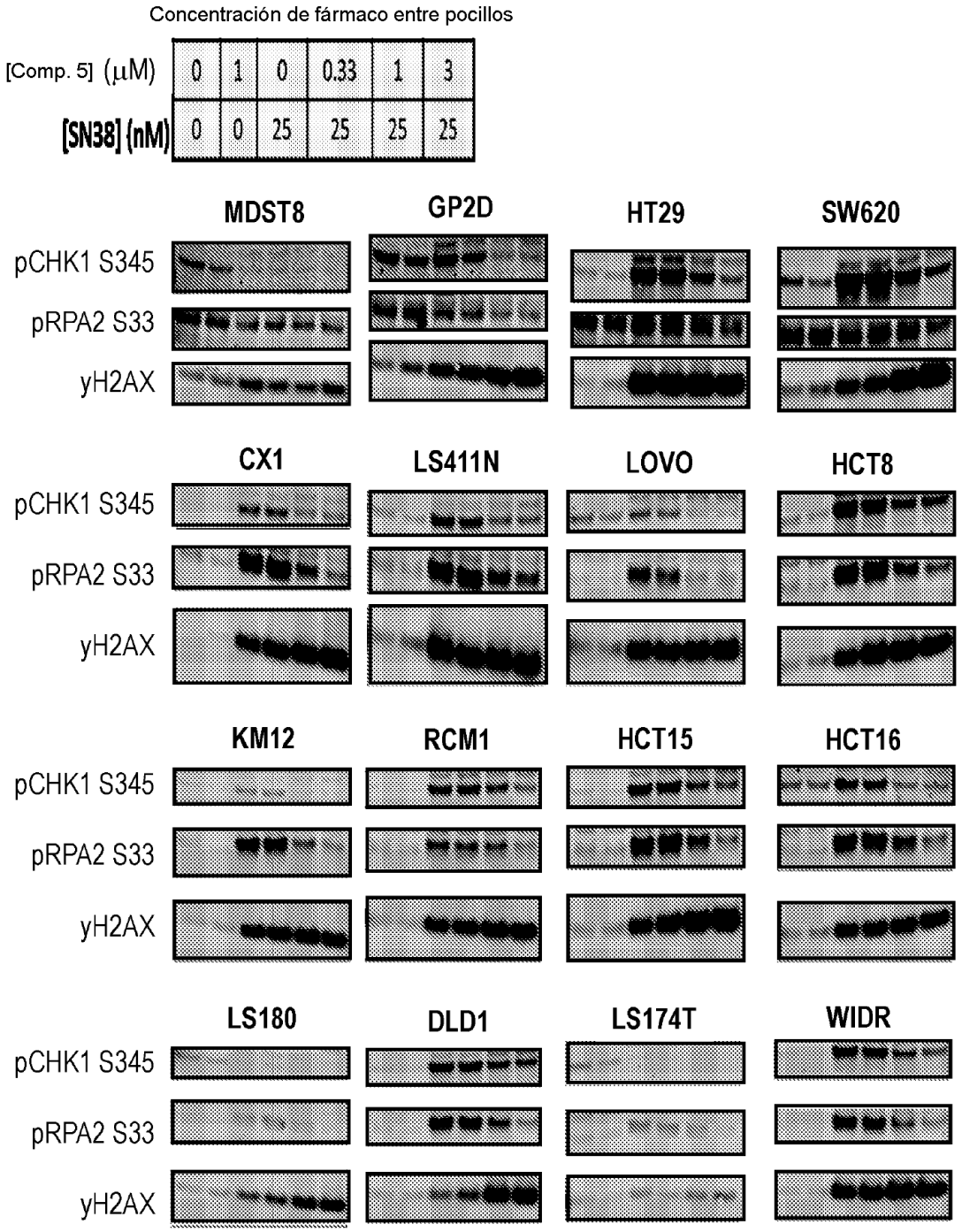

Concentración de fármaco entre pocillos
[Comp. 5] (μM) 0 1 0 0.33 1 3
[SN38] (nM) 0 0 25 25 25 25
MDST8
GP2D
HT29
SW620
pCHK1 S345
pRPA2 S33
yH2AX
CX1
LS411N
LOVO
HCT8
KM12
RCM1
HCT15
HCT16
LS180
DLD1
LS174T
WIDR

Fig. 51

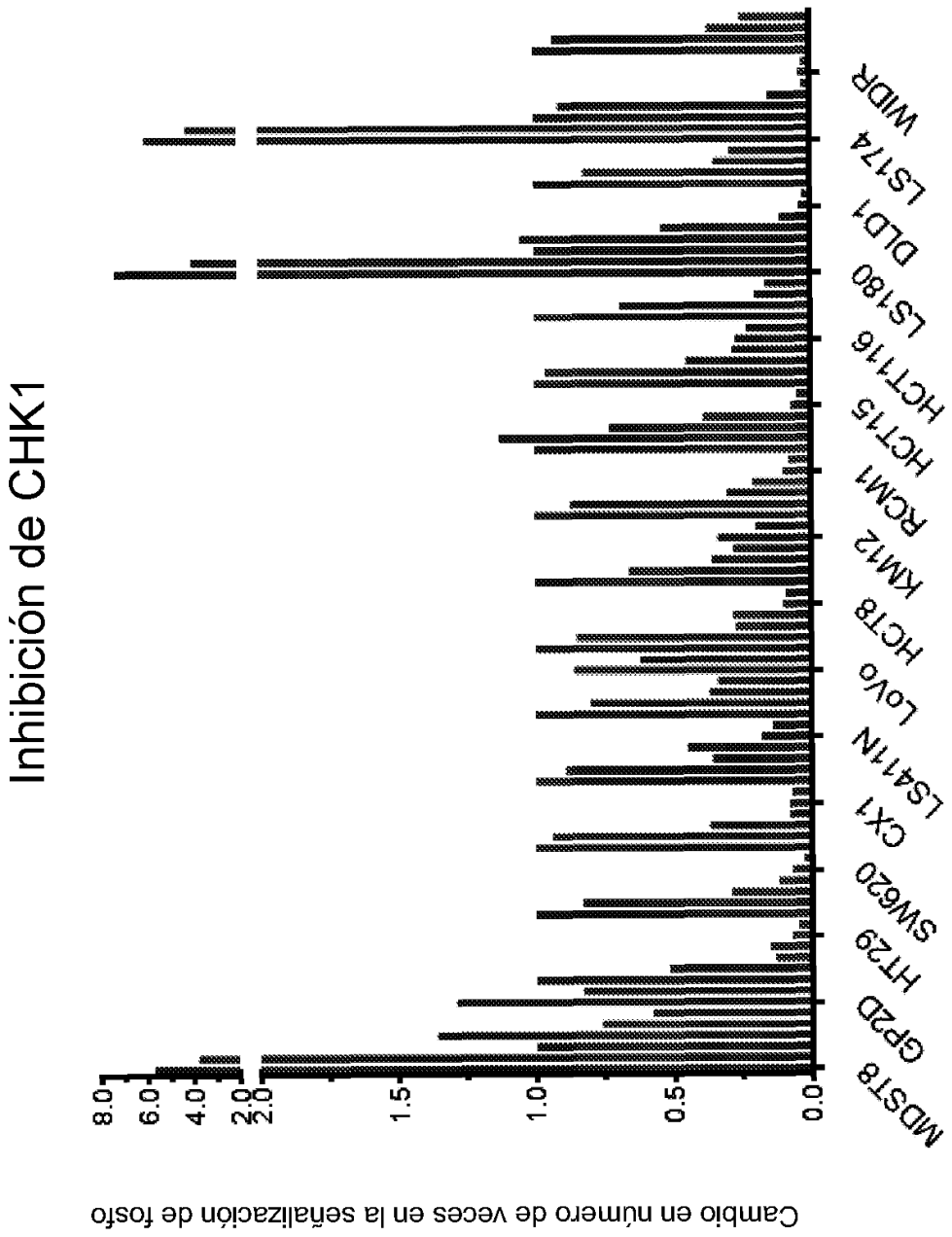

Inhibición de CHK1
Cambio en número de veces en la señalización de fosfo
8.0
6.0
4.0
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MDST8
GP2D
HT29
SW620
CX1
LS411N
LoVo
HCT8
KM12
RCM1
HCT15
HCT116
LS180
DLD1
LS174
WIDR

Fig. 52

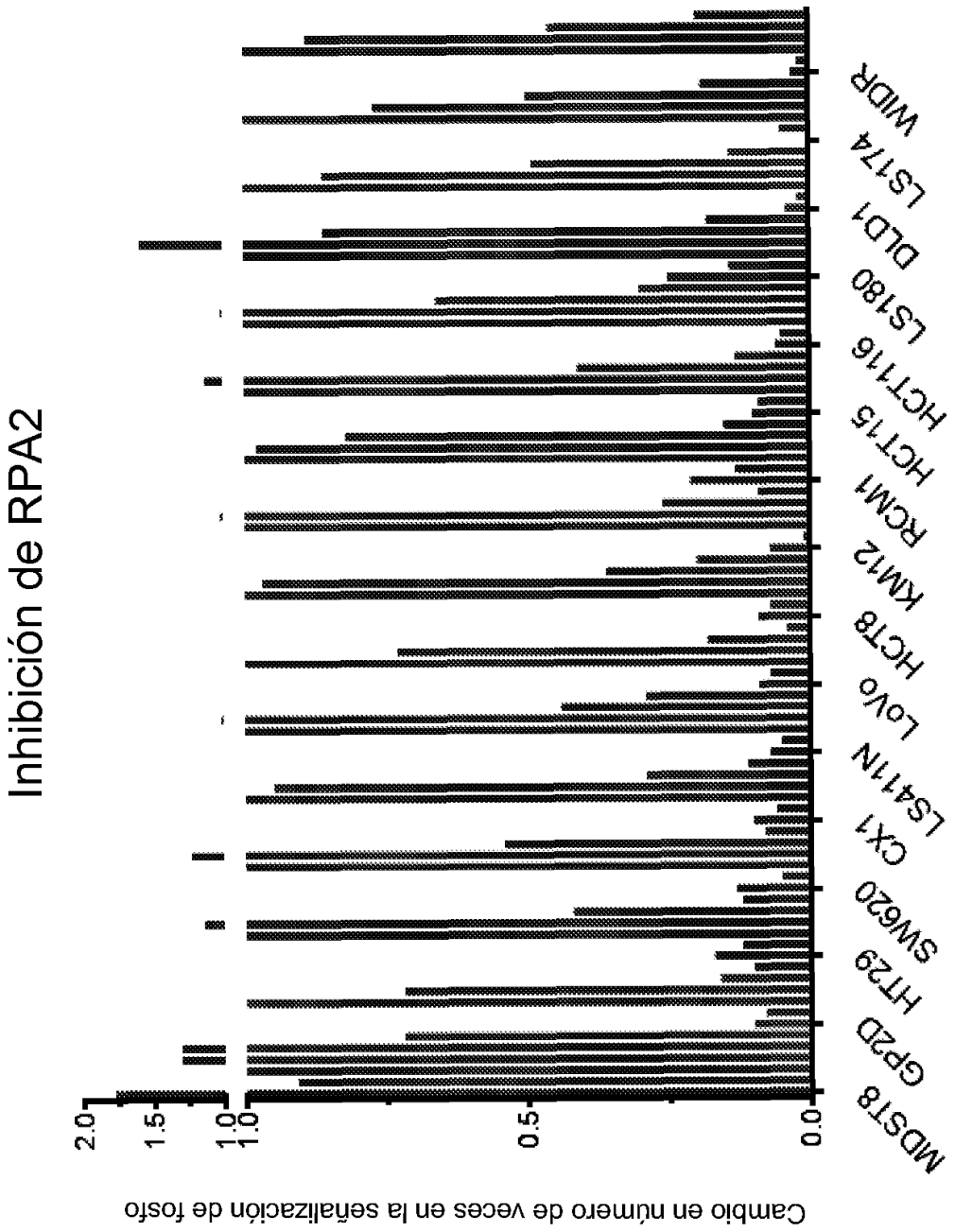

Inhibición de RPA2
Cambio en número de veces en la señalización de fosfo
2.0
1.5
1.0
1.0
0.5
0.0
MDST8
GP2D
HT29
SW620
CX1
LS411N
LoVo
HCT8
KM12
RCM1
HCT15
HCT116
LS180
DLD1
LS174
WIDR

Fig. 53

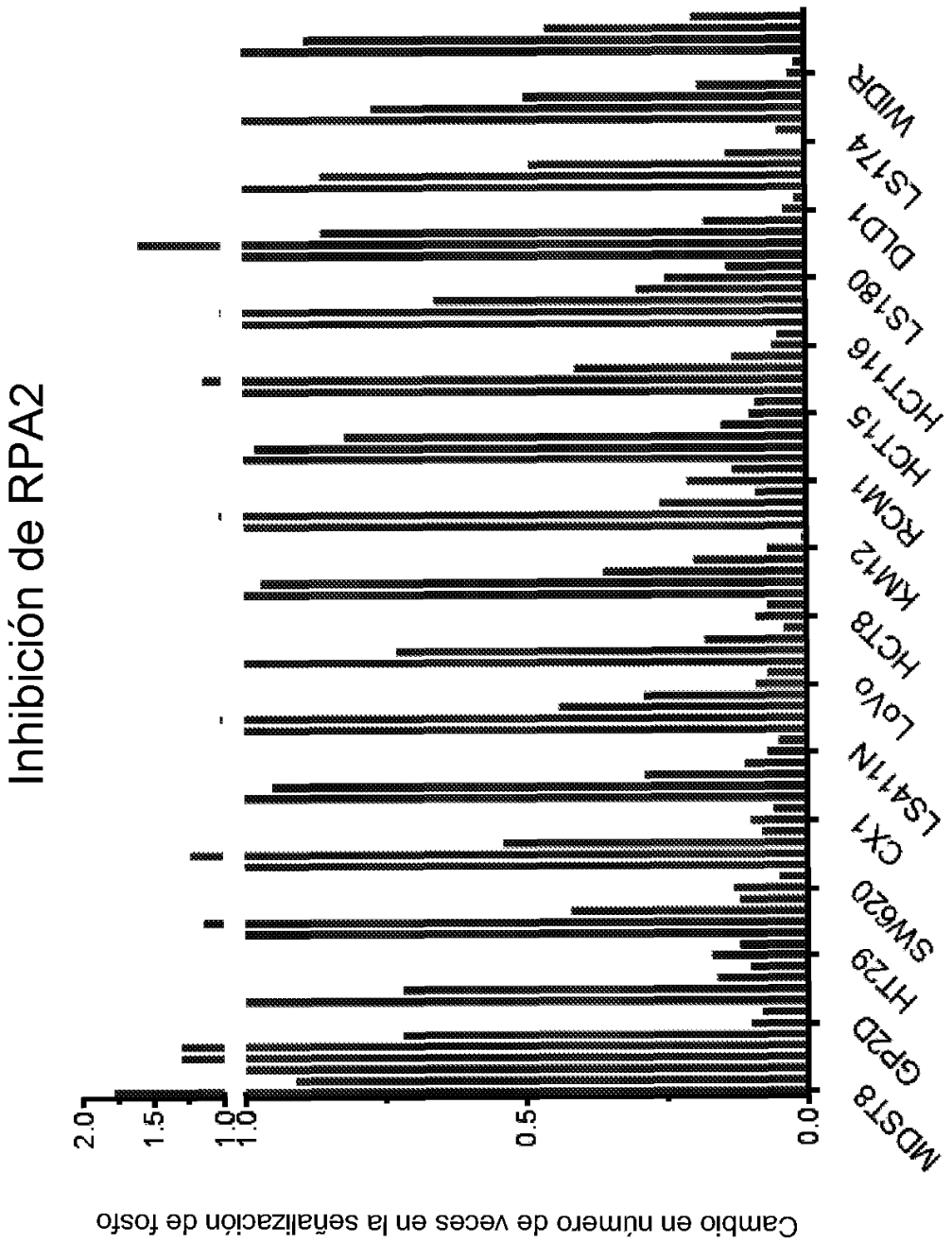

Inhibición de RPA2
Cambio en número de veces en la señalización de fosfo
2.0
1.5
1.0
1.0
0.5
0.0
MDST8
GP2D
HT29
SW620
CX1
LS411N
LoVo
HCT8
KM12
RCM1
HCT15
HCT116
LS180
DLD1
LS174
WIDR

Fig. 54