

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 263**

51 Int. Cl.:

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

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2017** **E 21182826 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024** **EP 3936153**

54 Título: **Inhibición de la proteína relacionada con ataxia telangiectasia y 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:
14.02.2025

73 Titular/es:

CELATOR PHARMACEUTICALS, INC. (100.00%)
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

ES 2 997 263 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Descripción

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

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/277.262, presentada el 11 de enero de 2016, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/420.258, presentada el 10 de noviembre de 2016 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº 62/444.172, presentada el 9 de enero de 2017.

Campo

La presente divulgación se refiere a compuestos y procedimientos relacionados para inhibir la proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3 (ATR), incluidos procedimientos y compuestos útiles para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

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

Se ha demostrado que la interrupción de la función de ATR (por ejemplo, mediante delección génica) 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 del estómago y del endometrio, y provocan un aumento de la sensibilidad a la radiación ionizante y la supresión de puntos de control del ciclo celular. La ATR es esencial para la viabilidad de las células somáticas, y se ha demostrado que la eliminación de la ATR da como resultado la pérdida de respuestas de puntos de control de daños y la muerte celular. Véase Cortez et al., *Science* 294: 1713-1716 (2001). La ATR también es esencial para la estabilidad de sitios frágiles, y una baja expresión de ATR en pacientes con síndrome de Seckel da como resultado un aumento de la rotura cromosómica después del estrés por replicación. Véase Casper et al., *Am. J. Hum. Genet* 75: 654-660 (2004). El complejo de 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 la activación de la cascada de señalización de CHK1. Véase Zou et al., *Science* 300:1542-1548 (2003). La ATR, al igual que su quinasa de punto de control relacionada ATM, fosforila RAD17 de forma temprana 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 la ATR es particularmente esencial en el embrión de mamífero temprano, para detectar la replicación incompleta del ADN y prevenir una catástrofe mitótica.

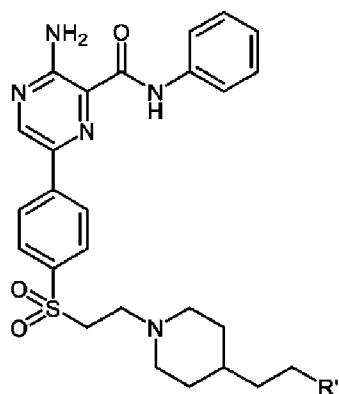
Sin embargo, aunque los agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN y la terapia con radiación ionizante (IR) han proporcionado beneficios terapéuticos iniciales a pacientes con cáncer, las terapias existentes han perdido eficacia clínica (por ejemplo, debido a respuestas de reparación de ADN de células tumorales). Los efectos *in vivo* de un inhibidor de ATR y un agente que daña el ADN han demostrado ser prometedores en el tratamiento selectivo del cáncer en comparación con las células normales, en particular en el tratamiento de células tumorales deficientes en el control del punto de control G1 (que puede depender más de la ATR para la supervivencia). El documento US8912198 describe compuestos útiles como inhibidores de la proteína quinasa ATR.

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).

Sumario

Los solicitantes han descubierto compuestos químicos novedosos útiles para la inhibición de la quinasa relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ATR) y el tratamiento del cáncer, y formulaciones liposómicas de determinados inhibidores de la proteína quinasa ATR que tienen propiedades deseables (por ejemplo, semivida prolongada en la circulación sanguínea y eficacia en el tratamiento de tumores). Las invenciones se basan en parte en el descubrimiento de determinados compuestos novedosos para la inhibición de la proteína quinasa ATR, así como semividas plasmáticas prolongadas y una eficacia antitumoral mejorada de determinadas formulaciones liposómicas de compuestos inhibidores de la proteína quinasa ATR.

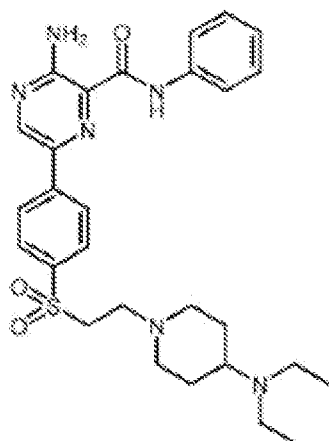
En una primera forma de realización se proporciona un compuesto de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(Ia),

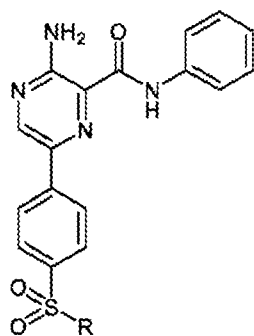
en la que R' es un resto alquilamino que comprende una amina sustituida con alquilo terciaria que tiene un pKa de 9,5 o superior.

En una segunda forma de realización se proporciona un compuesto de la fórmula del Compuesto 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(Compuesto 6).

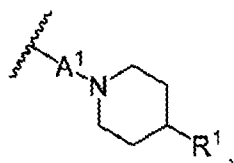
En una tercera forma de realización se proporciona una composición liposómica que comprende un inhibidor de la proteína quinasa ATR de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



(I),

en la que R es:

i)

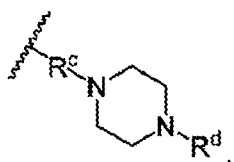


5 en la que A¹ o bien está ausente o bien es alquilo C₁-C₄, y R¹ es alquilo C₁-C₄amino;

ii) -N(H)(alquilo C₁-C₄)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C_i-C₄;

10 iii) -(G)-NR^aR^b; en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄; y G es alquilo C₁-C₄, en el que G puede estar opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₄; o

iv)



15 en la que R^c y R^d son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄.

En las reivindicaciones adjuntas se exponen formas de realización adicionales de la invención.

20 Descripción de las figuras

La figura 1 es un primer esquema de reacción química útil en la fabricación de determinados compuestos divulgados en el presente documento.

25 La figura 2 es un segundo esquema de reacción química útil en la fabricación de determinados compuestos divulgados en el presente documento.

La figura 3 es un tercer esquema de reacción química útil en la fabricación de determinados compuestos divulgados en el presente documento.

30 La figura 4 es un cuarto esquema de reacción química útil en la fabricación de determinados compuestos divulgados en el presente documento.

35 La figura 5 es un gráfico que muestra la farmacocinética en sangre de inhibidores de ATR liposómicos, tal como se describe en el ejemplo 8.

La figura 6 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto MS751 de cuello uterino, tal como se describe en el ejemplo 9A.

40 La figura 7 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto C33A de cuello uterino, tal como se describe en el ejemplo 9A.

La figura 8 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto C33A de cuello uterino, según el ejemplo 9A.

45 La figura 9 es un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto A liposómico en combinación con MM-398 en MS751 de cuello uterino, según el ejemplo 9A.

50 La figura 10A y la figura 10B es cada una un gráfico que muestra la eficacia del Compuesto 5 liposómico en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones NCI-H2170 (figura 10A) o DMS-114 (figura 10B), tal como se describe en el ejemplo 10.

55 La figura 11A y la figura 11B es cada una un gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer que representan la eficacia del Compuesto 5 liposómico en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 (figura 11A) y DMS-114 (figura 11B), tal como se describe en el ejemplo 10.

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

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

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

La figura 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 figura 15 es un gráfico que muestra valores de cambio de CI_{50} medidos en la línea celular Sum190PT (cáncer de mama triple negativo, TNBC) para el inhibidor de proteína quinasa ATR Compuesto 6 del ejemplo 2, con y sin diversas concentraciones de Compuesto B.

La figura 16A es un gráfico que muestra valores de cambio de CI_{50} de una combinación de inhibidor de proteína quinasa ATR Compuesto 6 del ejemplo 2, medidos en la línea celular de cáncer TNBC MDA-MB-453.

La figura 16B es un gráfico que muestra valores de cambio de CI_{50} de una combinación de inhibidor de proteína quinasa ATR Compuesto A, medidos en la línea celular de cáncer TNBC MDA-MB-453.

La figura 17 es un análisis por inmunotransferencia Western obtenido de células de cáncer de pulmón DMS-114 expuestas a gemcitabina [16 nM] o inhibidor de ATR (Compuesto A o Compuesto 5 [1 μ M]) solos o en combinación *in vitro*.

La figura 18A-B es el ensayo de muerte y crecimiento celular realizado mediante la combinación del Compuesto A y gemcitabina a diversas concentraciones en células U2OS. Los resultados se comparan de nuevo con una predicción del crecimiento y la muerte celular con la combinación de los dos compuestos (figura 18A). El número de células vivas y apoptóticas también se determina a concentraciones establecidas de Compuesto A (1 μ M) y gemcitabina (0,04 μ M) en células USO2 (figura 18B).

La figura 19 muestra el Compuesto A analizado solo y en combinación con SN38 a concentraciones establecidas (1 μ M y 0,2 μ M, respectivamente) en diversas líneas celulares de cáncer de pulmón (células NCI-H520 y NCI-H596) y U2OS, con la cantidad de células supervisadas a lo largo del tiempo.

La figura 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 figuras 21A-C muestra los efectos de la combinación del Compuesto A o el Compuesto 5 con gemcitabina. La figura 21A es un mapa de calor que ilustra el efecto de la combinación del Compuesto A o el Compuesto 5 con gemcitabina a diversas concentraciones en líneas celulares U2OS, H358 y A549. Se muestran imágenes de microscopía de las células tratadas con concentraciones establecidas de Compuesto 5 y gemcitabina o Compuesto A y gemcitabina en las células (figura 21B). También se muestran ensayos de proliferación de células USO2 y H358 con concentraciones establecidas (figura 21C).

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

La figura 23 muestra valores de CI_{50} (μ M) en varias líneas celulares usando una concentración establecida de gemcitabina con diversas concentraciones del Compuesto A o el Compuesto 5.

La figura 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 figuras 25A-B muestran diversos inhibidores de ATR sometidos a ensayo para determinar su capacidad para inhibir ATR (en la diana) y ATM (fuera de la diana). La inhibición se notifica como CI_{50} en nM (figura 25A). También se someten a ensayo quinasas "fuera de la diana" adicionales con el Compuesto A o el Compuesto 5 (figura 25B).

Las figuras 26A-F muestran resultados en la diana con el Compuesto A o el Compuesto 5 en células de cáncer de pulmón A549 (figuras 26A-B), células de cáncer de pulmón H23 (figuras 26C-D) y células DMS-

114 (figuras 26E-F). La fosforilación de CHK1S345, una lectura de la inhibición de ATR, se mide mediante inmunotransferencia Western. Cada compuesto se usa también con una concentración fija de gemcitabina.

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

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

La figura 29 muestra modelos de xenoinjerto de pulmón DMS-114 usados para medir los efectos de Ls-Compuesto A o de Ls-Compuesto 5 en combinación con MM398. Se usa una dosis establecida de MM398 (5 mpk) con dos dosis diferentes del Compuesto A o el Compuesto 5 (20 mpk u 80 mpk). Los efectos del tratamiento se analizan mediante la medición de los niveles de fosforilación de CHK1S345.

La figura 30A-C ilustra los efectos del Ls-Compuesto A con MM398 en la línea celular SUM-149. Los efectos del tratamiento se evalúan mediante la medición de los niveles fosforilados de RPA2 (figura 30A), DNAPK, CHK1 e γ H2AX (figura 30B). El Ls-Compuesto 5 también se somete a ensayo sin la combinación de MM398 (figura 30C).

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

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

La figura 33 muestra niveles basales de diversos marcadores PD asociados con la ruta de respuesta al daño al ADN, cuantificados mediante inmunotransferencia Western en un panel de líneas celulares.

La figura 34 muestra un esquema que ilustra cómo se calcula la puntuación integral para cada pocillo en el ensayo de viabilidad celular dinámica.

La figura 35 muestra la correlación de la expresión basal de la proteína MRE11 (cuantificada mediante inmunotransferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, entre líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

La figura 36 muestra la correlación de la expresión basal de la proteína ATM (cuantificada mediante inmunotransferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, entre líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

La figura 37 muestra la correlación de la expresión basal de la proteína NBS (cuantificada mediante inmunotransferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, entre líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

La figura 38 muestra la correlación de la expresión basal de la proteína NBS (cuantificada mediante inmunotransferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, entre líneas celulares de cáncer de pulmón funcionalmente alteradas con p53 expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

La figura 39 muestra la correlación de la expresión basal de la proteína NBS (cuantificada mediante inmunotransferencia Western) y la puntuación integral, una medida de la viabilidad celular dinámica, entre líneas celulares de cáncer de pulmón funcionalmente alteradas con p53 expuestas al inhibidor de ATR Compuesto 5 y/o SN38.

Las figuras 40A-F muestran las veces de cambio en marcadores farmacodinámicos de la línea celular de cáncer NCIH1299 después de la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

Las figuras 40A-F muestran las veces de cambio en marcadores farmacodinámicos de la línea celular de cáncer NCIH460 después de la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

Las figuras 42A-F muestran las veces de cambio en marcadores farmacodinámicos de la línea celular de cáncer DMS114 después de la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

Las figuras 43A-F muestran las veces de cambio en marcadores farmacodinámicos de la línea celular de cáncer HCC70 después de la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

Las figuras 44A-F muestran las veces de cambio en marcadores farmacodinámicos de la línea celular de cáncer MDAMB468 después de la exposición a la inhibición de ATR y/o SN38.

La figura 45 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer A549 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 46 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer NCIH23 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 47 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer DMS114 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 48 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer U20S después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 49 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer NCIH460 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 50 muestra inmunotransferencias Western de marcadores farmacodinámicos en la línea celular de cáncer HCC827 después de 6 o 18 horas de exposición a la inhibición de ATR y/o gemcitabina.

La figura 51 muestra inmunotransferencias 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.

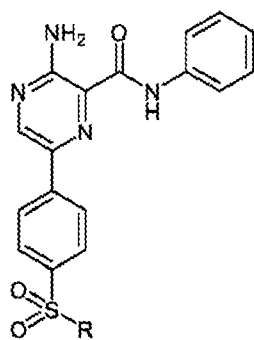
La figura 52 muestra la cuantificación normalizada de niveles de Chk1 fosforilado en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al Compuesto 5 y/o SN38 (la señal para cada línea celular se normaliza a la señal en presencia de SN38 solo).

La figura 53 muestra la cuantificación normalizada de niveles de RPA2 fosforilado 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).

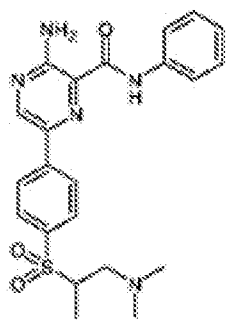
La figura 54 muestra la cuantificación normalizada de niveles de γ H2AX en un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal después de 18 horas de exposición al compuesto 5 y/o SN38 (la señal para cada línea celular se normaliza a la señal en presencia de SN38 solo).

Descripción detallada

Los compuestos novedosos para inhibir la proteína quinasa ATR se describen mediante la fórmula (I):

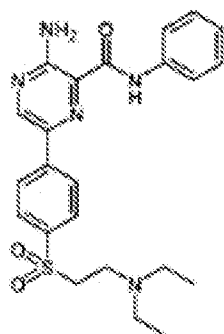


o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que R es un resto que comprende una amina con un pK_a superior a 7,0 (preferentemente superior a 8,0, y de la forma más preferida al menos aproximadamente 9,5), seleccionado para que proporcione una semivida en plasma de al menos aproximadamente 5 horas en ratones (obtenida según el ejemplo 7). Preferentemente, R incluye un resto alquilo sustituido con amina con 4-12 carbonos. R puede seleccionarse de modo que incluya solo una combinación de grupos de amina sustituida terciaria y de alquilo hidrogenado. R incluye además preferentemente una amina sustituida con alquilo terciaria que tiene un pK_a de al menos 7, pero de la forma más preferida de al menos aproximadamente 9,5 (por ejemplo, un pK_a de aproximadamente 9,5-10,5). Los ejemplos de compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyen los Compuestos 1-6 (véanse los ejemplos 1-6):



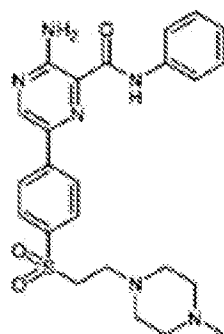
Compuesto 1

PM: 439,53



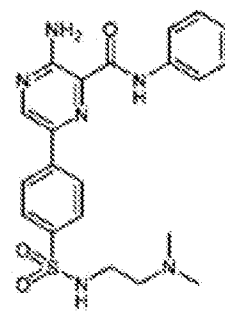
Compuesto 2

PM: 453,56



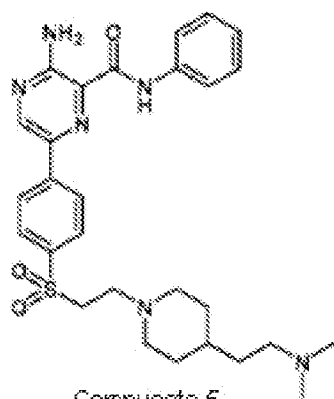
Compuesto 3

PM: 480,59



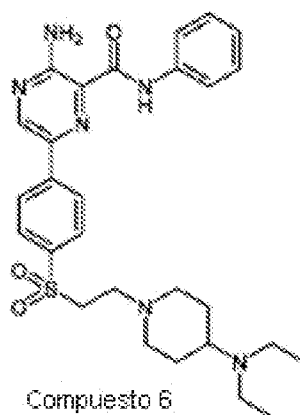
Compuesto 4

PM: 440,52



Compuesto 5

PM: 536,70

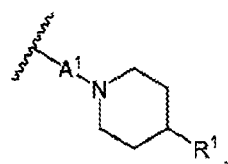


Compuesto 6

PM: 536,70

- 5 Los compuestos de fórmula (I) incluyen preferentemente uno o más restos de amina terciaria en R seleccionados para proporcionar la inhibición deseada de ATR y/o características de formación y estabilidad de liposomas. En algunos ejemplos, R es un resto heterocíclico que comprende un primer nitrógeno terciario sustituido, preferentemente 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:

10



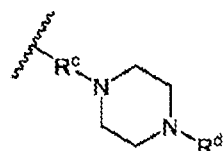
15

en la que A¹ o bien está ausente o bien es un alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₄ (preferentemente -(CH₂)₂-), y R¹ es alquilamino inferior (por ejemplo, C₁-C₄). En un ejemplo, R¹ es (alquil C₁-C₄)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄, por ejemplo R¹ es -(CH₂)₂-N(CH₃)(CH₃). En otro ejemplo, R¹ es NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄, R¹ es -N(CH₂CH₃)(CH₂CH₃).

20

En otro ejemplo de la fórmula (I), R es -N(H)(alquil C₁-C₄)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄, o R es -(G)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄, en el que G es alquilo C₁-C₄, y en el que G puede estar además sustituido con alquilo C₁-C₄.

En otro ejemplo de la fórmula (I), R puede ser un resto de la fórmula:

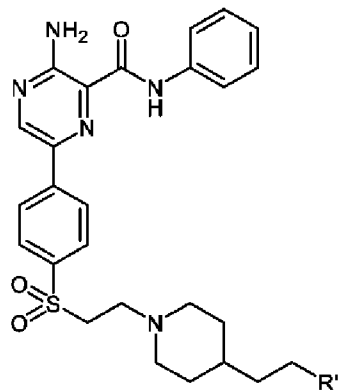


25

en la que R^c y R^d son cada uno independientemente alquilo 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), en formas de realización de la invención, tiene la estructura química de la 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 aproximadamente 9,5 o superior:



(Ia).

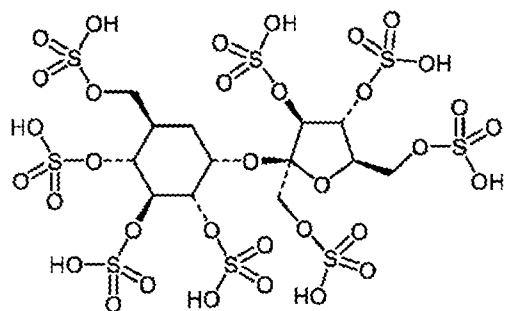
Los ejemplos de compuestos de fórmula (Ia) incluyen el compuesto 5 divulgado en el presente documento (por ejemplo, ejemplo 1). En una forma de realización de fórmula (Ia), R' es NR^aR^b , en la que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C_1 - C_4 .

Las formulaciones liposómicas de compuestos inhibidores de la proteína quinasa ATR (por ejemplo, tal como se describen en el ejemplo 7) pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas deseables tales como una semivida en plasma aumentada de 5 horas o más en el modelo de ratón descrito en el ejemplo 8. Los liposomas comprenden normalmente vesículas que contienen una o más bicapas lipídicas que encierran un interior acuoso. Las composiciones liposómicas incluyen generalmente liposomas en un medio, tal como un fluido acuoso exterior al liposoma. Los lípidos liposómicos pueden incluir componentes lipídicos anfífilicos que, al entrar en contacto con el medio acuoso, forman espontáneamente membranas bicapa, tales como fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidilcolinas. Los liposomas también pueden incluir componentes que rigidizan la membrana, tales como esteroides, por ejemplo, colesterol. En algunos casos, los liposomas también incluyen lípidos conjugados con polímeros hidrófilos, tales como derivados de lípido-polietilenglicol (PEG) que pueden reducir la tendencia de los liposomas a agregarse y presentan además otros efectos beneficiosos.

La formulación liposómica 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 unilamellar formada 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 preferentemente uno o más fosfolípidos, seleccionándose la relación de los fosfolípido(s) con respecto al colesterol para que proporcione una cantidad deseada de rigidez en la membrana liposómica mientras se mantiene una cantidad suficientemente reducida de pérdida del compuesto de fórmula (I) desde el liposoma.

Los liposomas tienen generalmente un tamaño en un intervalo micrométrico o submicrométrico y son bien conocidos por su capacidad para transportar sustancias farmacéuticas, incluidos fármacos anticancerosos, tales como irinotecán, y para cambiar sus propiedades farmacéuticas de diversas maneras beneficiosas. Los procedimientos para preparar y caracterizar composiciones liposómicas farmacéuticas son conocidos en el sector (véase, por ejemplo, Lasic D. Liposomes: From physics to applications, Elsevier, Ámsterdam 1993; G. Goriadis (ed.), Liposome Technology, 3ª edición, vol. 1-3, CRC Press, Boca Raton, 2006; Hong et al., patente de Estados Unidos N° 8.147.867).

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



El sucrososfato también se denomina octasulfato de sacarosa o sucrooctasulfato (SOS). Los procedimientos para preparar sucrososfato en forma de diversas sales, por ejemplo, sales de amonio, sodio o potasio, son bien conocidos en el sector (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 4.990.610).

Los liposomas inhibidores de proteína quinasa 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 proteína quinasa ATR (por ejemplo, Compuesto A o un compuesto de fórmula (I)) en el liposoma a medida que la TEA abandona el liposoma. Por ejemplo, los liposomas inhibidores de proteína quinasa ATR pueden prepararse mediante un procedimiento que incluye las etapas de (a) preparar un liposoma que contiene trietilamina (TEA) como una sal de trietilamonio de sucrososfato (TEA-SOS), y (b) posteriormente poner en contacto el liposoma de TEA-SOS con irinotecán en condiciones eficaces para que el irinotecán ingrese en el liposoma y permita que una cantidad correspondiente de TEA abandone el liposoma (agotando o reduciendo de este modo el gradiente de concentración de TEA en el liposoma resultante).

La primera etapa puede incluir la formación del liposoma que contiene TEA-sucrososfato mediante la hidratación y la dispersión de los lípidos liposómicos en la solución de TEA sucrososfato. Esto se puede realizar, por ejemplo, disolviendo los lípidos, incluidos HSPC y colesterol, en etanol calentado, y dispersando la solución lipídica disuelta y calentada en la solución acuosa de TEA-sucrososfato a una temperatura superior a la temperatura de transición (T_m) del lípido liposómico, por ejemplo, 60 °C o superior. La dispersión lipídica puede adoptar la forma de liposomas que tienen el tamaño promedio de 75-125 nm (tal como 80-120 nm, o en algunas formas de realización, 90-115 nm), mediante extrusión a través de membranas de policarbonato con surcos grabados con el tamaño de poro definido, por ejemplo, 100 nm. El TEA-sucrososfato puede incluir al menos 8 equivalentes molares de TEA por cada equivalente molar de sucrososfato para obtener una solución que puede tener una concentración de aproximadamente 0,40-0,50 N, y un pH (por ejemplo, aproximadamente 6,5) que se selecciona de modo que se evite la degradación inaceptable del fosfolípido liposómico durante las etapas de dispersión y extrusión (por ejemplo, un pH seleccionado para minimizar la degradación del fosfolípido liposómico durante estas etapas). A continuación, el TEA-SOS no atrapado se puede eliminar de la dispersión liposómica, por ejemplo, mediante diálisis, cromatografía en gel, intercambio iónico o ultrafiltración antes de la encapsulación del fármaco. Los liposomas resultantes pueden contener el inhibidor de proteína quinasa ATR sucrososfato. Estos liposomas inhibidores de ATR pueden estabilizarse cargando suficiente fármaco en los liposomas para reducir la cantidad de TEA en la composición liposómica resultante a un nivel que dé como resultado un nivel inferior a un nivel máximo dado de formación de liso-PC después de 180 días a 4 °C, o inferior a un nivel máximo dado de tasa de acumulación de liso-PC en la composición liposómica durante el almacenamiento en un refrigerador a aproximadamente 4 °C, o, más en general, a 5 ± 3 °C, medido, por ejemplo, en mg/ml/mes, o el % de conversión de PC en un liso-PC en una unidad de tiempo, tal como, el % en moles de liso-PC/mes. A continuación, la TEA intercambiada desde los liposomas al medio externo durante el proceso de carga, junto con cualquier inhibidor de ATR no atrapado, se retira generalmente de los liposomas mediante cualquier proceso conocido adecuado (por ejemplo, mediante cromatografía en gel, diálisis, diafiltración, intercambio iónico o ultrafiltración). El medio externo de los liposomas puede intercambiarse por un fluido isotónico inyectable (por ejemplo, solución isotónica de cloruro sódico), tamponado a un pH deseado.

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

Con referencia a las figuras 6-9 y el ejemplo 9, se analizó una formulación liposómica 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 liposómica de irinotecán MM398 (ejemplo 9B). Se observó un mayor volumen tumoral con el transcurso del tiempo para la formulación de Compuesto A liposómico 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 liposómica 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 liposómico solo.

Con referencia a las figuras 10A-10B y las figuras 11A-11B, una formulación liposómica del inhibidor de ATR Compuesto 5 de fórmula (I) y fórmula (Ia) (el compuesto del ejemplo 1 formulado como un liposoma tal como se describe en el ejemplo 7) se analizó frente a dos líneas celulares de cáncer de pulmón en un modelo de xenoinjerto de ratón (ejemplo 10), solo y en combinación con la formulación liposómica de irinotecán MM398 (ejemplo 9B). Con referencia a la figura 10A y la figura 10B, la administración de la formulación liposómica del Compuesto 5 redujo el volumen tumoral en cada línea celular sometida a ensayo en comparación con el experimento de control en el ejemplo 10, la combinación de MM398 y la composición liposómica del Compuesto 5 del ejemplo 7 redujo el volumen tumoral en el modelo de ratón hasta un grado mayor que cualquier compuesto administrado independientemente del otro. De manera similar, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier presentadas en el ejemplo 10 (figura 11A y figura 11B) muestran un aumento de la supervivencia en el ensayo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de ratón cuando se administró una combinación del liposoma de irinotecán MM398 del ejemplo 9B junto con la formulación liposómica del Compuesto 5 del ejemplo 7 usando dos líneas celulares diferentes.

Con referencia a la figura 12A y la figura 12B, la tolerabilidad de diversas formulaciones liposómicas de compuestos inhibidores de la proteína quinasa ATR se evaluó en el ejemplo 10. Con referencia a la figura 12A, la disminución en el peso corporal del ratón analizado en el modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 fue menor con el transcurso del tiempo para la formulación liposómica del Compuesto 5 (ejemplo 7), en comparación con el liposoma de irinotecán MM398 (ejemplo 9B), el control o la combinación de la formulación liposómica del Compuesto 5 junto con MM398. Con referencia a la figura 12B, la disminución en el peso corporal del ratón analizada en el modelo de xenoinjerto de ratón DMS-114 fue inferior con el transcurso del tiempo para la combinación de la formulación liposómica del Compuesto 5 junto con MM398, en comparación con la formulación liposómica del Compuesto 5 (ejemplo 7), o el liposoma de irinotecán MM398 (ejemplo 9B) administrados independientemente.

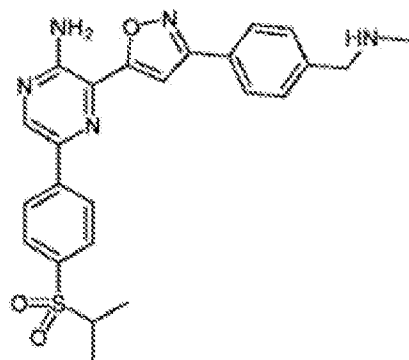
Con referencia a la figura 13A y la figura 13B, la administración de una combinación del liposoma de irinotecán MM398 (ejemplo 9B) con la formulación liposómica del inhibidor de la proteína quinasa ATR Compuesto 5 dio como resultado la mayor reducción en el volumen tumoral tanto en las líneas celulares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

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran algunas formas de realización de la invención y ejemplos de la divulgación. Los ejemplos y preparaciones siguientes se proporcionan para permitir a los expertos en la técnica entender más claramente y poner en práctica estas y otras formas de realización de la presente invención y ejemplos de la divulgación. El objeto comparativo está marcado con *.

El péptido ATR puede expresarse y aislarse usando una diversidad de procedimientos conocidos por la literatura (véase, por ejemplo, Ünsal-Kagmaz et al, PNAS 99: 10, páginas 6673-6678, 14 de mayo de 2002; véase también Kumagai et al. Cell 124, páginas 943-955, 10 de marzo de 2006; Ünsal-Kacmaz et al. Molecular and Cellular Biology, febrero de 2004, páginas 1292-1300; y Hall-Jackson et al. Oncogene 1999, 18, 6707-6713).

El compuesto comparativo A puede obtenerse mediante los procedimientos divulgados (por ejemplo) en la publicación WO2010/071827A1 (publicada el 24 de junio de 2010). La estructura del Compuesto A es la siguiente:

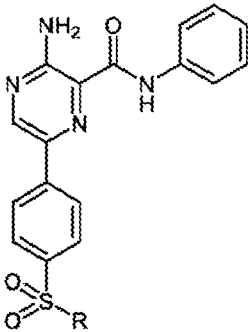
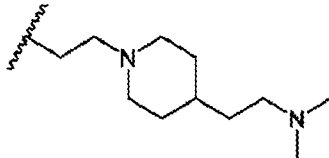
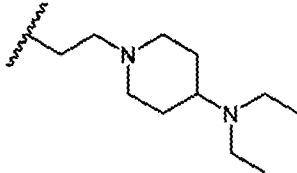
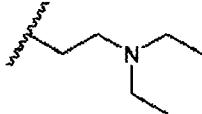
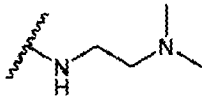
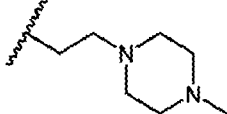
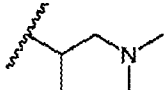


Compuesto A*.

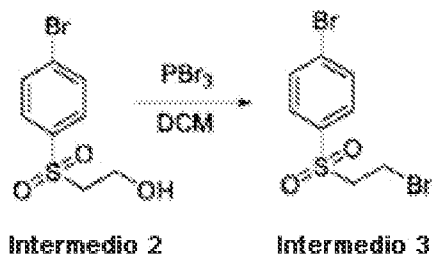
Se pueden preparar varios compuestos de fórmula (I) tal como se describe en el presente documento y se resume en la tabla siguiente.

Tabla 1: Compuestos seleccionados y compuestos comparativos (marcados con *) de fórmula (I)

5

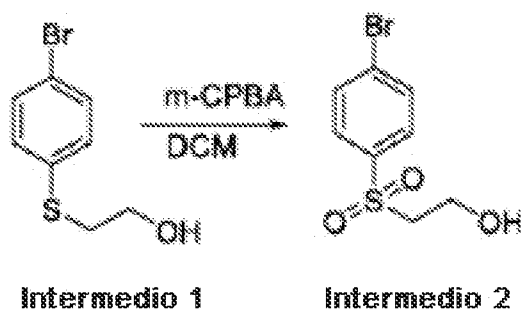
 (I)		
Compuesto	R	Ejemplo
Compuesto 5		1
Compuesto 6		2
Compuesto 2*		3
Compuesto 4*		4
Compuesto 3*		5
Compuesto 1*		6

Los ejemplos 1, 2, 3 y 6 se prepararon en un acoplamiento cruzado de Suzuki de un solo recipiente usando éster borónico generado *in situ* tal como se muestra en el esquema 1 en la figura 1. Con referencia a la figura 1, la síntesis del Intermedio 3: 1-bromo-4-(2-bromoetilsulfonyl)benzeno se puede obtener tal como se describe a continuación.



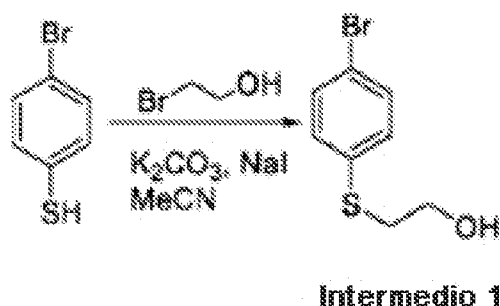
A una solución del Intermedio 2 (35 g, 133 mmol) en DCM (400 ml) se añadió PBr_3 (40 g, 146 mmol) a 0 °C gota a gota. Después, la mezcla se agitó a ta durante la noche. Se añadió agua (15 ml) para inactivar la reacción. Después, el producto resultante se lavó con agua (120 ml) y salmuera (120 ml). La fase orgánica se concentró para proporcionar 20 g de 3 bruto en forma de un aceite de color amarillo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Con referencia a la figura 1, la síntesis del Intermedio 2 puede realizarse tal como se describe a continuación:



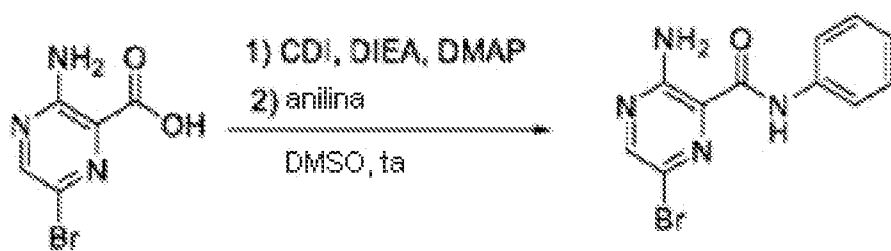
A una solución del Intermedio 1 (45 g, 194 mmol) en DCM (500 ml) se añadió m-CPBA (134 g, 776 mmol) a ta en varios lotes. Después, la mezcla se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y se añadió DCM (500 ml) para lavar el sólido. El filtrado se lavó con NaOH (1 M, 300 ml x 3) y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

Con referencia a la figura 1, la síntesis del Intermedio 1 puede realizarse tal como se describe a continuación:



A una solución de 4-bromobenzenotiol (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. Después de la adición, la mezcla se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 45 g de 1 (81%) en forma de un aceite de color amarillo claro.

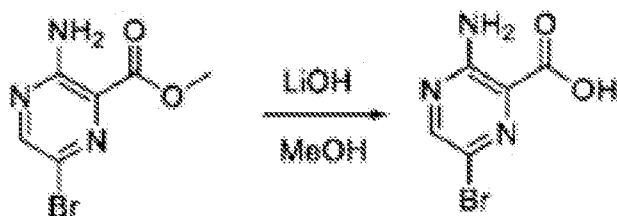
El Bloque B puede prepararse de acuerdo con el esquema 2 en la figura 2. Con referencia a la figura 2, la síntesis del Bloque B se puede realizar tal como se describe a continuación.

**Intermedio 6****Bloque B**

A una solución del Intermedio 6 (6,0 g, 27,4 mmol) en DMSO (30 ml) se añadieron CDI (8,9 g, 54,8 mmol), DIPEA (3,8 g, 30,1 mmol) y DMAP (0,17 g, 1,37 mmol). La solución se agitó a ta durante 4 horas. Se añadió anilina (2,5 g, 27,4 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante una 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 %) en forma de un sólido de color amarillo.

CL-EM (M+1): 293.2; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.28 (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).

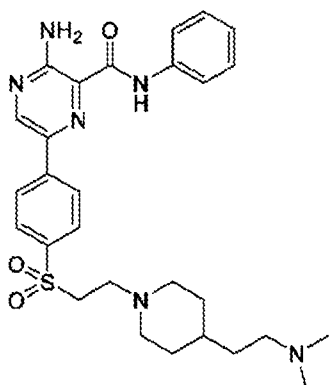
Con referencia de nuevo a la figura 2, la síntesis del Intermedio 6 puede realizarse tal como se describe a continuación:

**Intermedio 6**

A la solución de 3-amino-6-bromopirazin-2-carboxilato de metilo (10,0 g 43,1 mmol) en MeOH (70 ml) se añadió una solución de LiOH (9,0 g, 215 mmol) en agua (70 ml). La mezcla se agitó a 90 °C 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 proporcionar 7,4 g de 6 (79%) en forma de un sólido de color amarillo.

CL-EM (M+1): 218.0; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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-fenilpirazin-2-carboxamida)



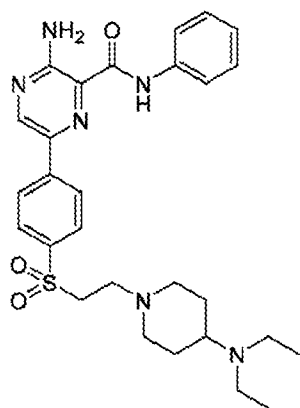
Masa exacta: 536,26; Peso molecular: 536,70; Compuesto 5; Más básico; 143 mg; Rendimiento 8,2%; pK_a 10,00.

A una solución 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 después se añadió $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (53 mg, 0,0648 mmol), de nuevo se desgasificó y la reacción se calentó a 90 °C durante 2 horas en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se enfrió después a temperatura ambiente y se añadió 3-amino-

6-bromo-N-fenilpirazin-2-carboxamida (Bloque B), K_2CO_3 2 M (1 ml) y se desgasificó y se purgó con nitrógeno. Se añadió el $Pd(PPh_3)_4$ (75 mg, 0,0648 mmol). La reacción se calentó a $100^\circ C$ durante 4 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo y se lavó con salmuera tres veces y la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Tras la eliminación del disolvente en el evaporador rotatorio, se obtuvo un producto bruto residual oleoso oscuro y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (sistema de cromatografía ultrarrápida Reveleris) usando metanol al 0-15% en diclorometano como eluyente. El producto deseado se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo (149 mg, rendimiento del 43%). MS (M+H)⁺ 537; ^1H 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 Orbitrap de cuadrupolo híbrido Thermo Scientific™ Q Exactive™): Calculado para $C_{28}H_{36}N_6O_3S$ + Protón (1,00728) = 537,2642; m/z teórico de ion de carga única: 537,2642; Hallado: 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)

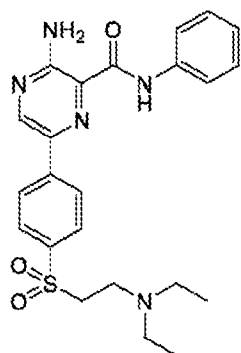


Masa exacta: 536,26; Peso molecular: 536,70; Compuesto 6; Más básico; 53 mg; Rendimiento 11,1%; pK_a 9,81.

El ejemplo 2 se preparó de una manera similar usando el Bloque A2 (1-(2-((4-bromofenil)sulfonil)etil)-N,N-dietilpiperidin-4-amina), se obtuvo un sólido de color amarillo (52 mg, rendimiento del 24%). MS (M+H)⁺ 537; ^1H 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).

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

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

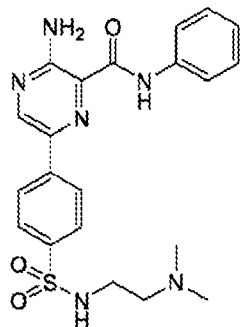


Masa exacta: 453,18; Peso molecular: 453,56; Compuesto 2; Menos básico; 98 mg; Rendimiento 7,7%; pK_a 7,46.

El compuesto del ejemplo 3 se preparó de una manera similar usando el intermedio Bloque A3, 2-((4-bromofenil)sulfonyl)-N,N-dietiletan-1-amina, se obtuvo un sólido de color amarillo (98 mg, rendimiento del 11%). MS (M+H)⁺ 454; ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): 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)sulfonyl)-N,N-dietiletan-1-amina) se preparó de una manera similar usando la 4-dietilamina correspondiente. Se obtuvo un aceite incoloro (1,42 g, 73% de rendimiento), EM (M+H)⁺ 320, 322

Ejemplo 4: Síntesis del compuesto comparativo 4* (3-amino-6-(4-((2-(dimetilamino)etil)-λ²-azanil)sulfonyl)fenil)-N-fenilpirazin-2-carboxamida)

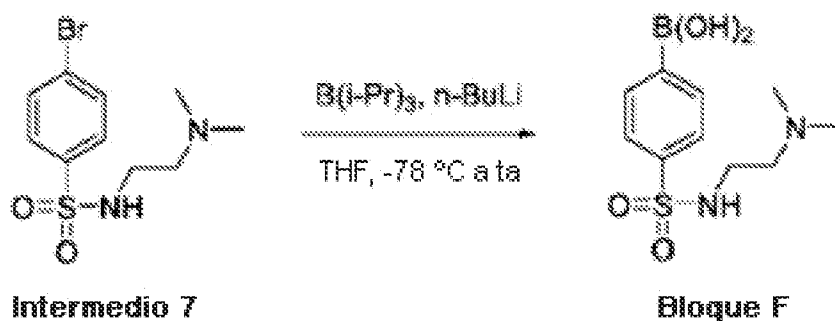


Masa exacta: 439,16; Peso molecular: 439,51; Compuesto 4; pKa 8,36.

El Compuesto 4 puede prepararse tal como se muestra en el esquema 3 en la figura 3. A una mezcla de Bloque B (150 mg, 0,51 mmol), Bloque F (153 mg, 0,56 mmol) y Na₂CO₃ (216 mg, 2,0 mmol) en tolueno/etanol/agua (2 ml/2 ml/2 ml) se añadió Pd(dppf)Cl₂ (30 mg). La mezcla se agitó a 75 °C en atmósfera de argón durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar 100 mg de TM4 (45%) en forma de un sólido de color blanco.

CL-EM (M+1): 441.4; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 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).

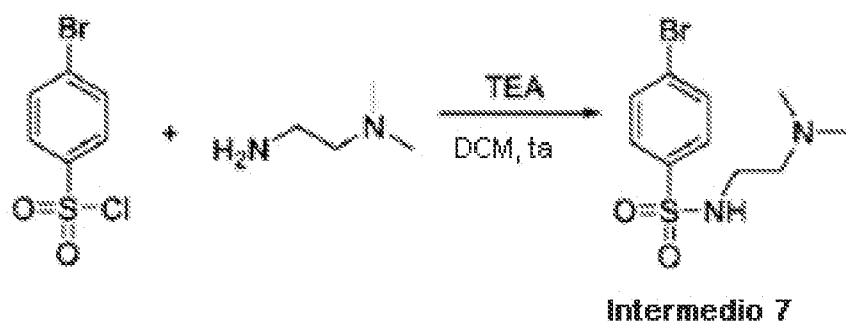
Con referencia de nuevo al esquema 3 en la figura 3, la síntesis del Bloque F se puede realizar tal como se describe a continuación.



A una solución del Intermedio 7 (10,0 g, 32,6 mmol) en THF (200 ml) a -78 °C en una 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 -78 °C durante 2 horas y a continuación a ta durante otras 16 horas. Se añadió agua para inactivar la reacción. La mezcla se concentró a sequedad. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar 5,2 g de Bloque F (59%) en forma de un sólido de color blanco.

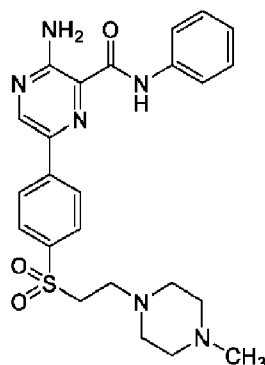
CL-EM (M+1): 273.4; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.90-7.45 (m, 4H), 2.91 (s, 2H), 2.69 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.03 (s, 6H).

Con referencia de nuevo al esquema 3 en la figura 3, la síntesis del Intermedio 7 se puede realizar tal como se describe a continuación.



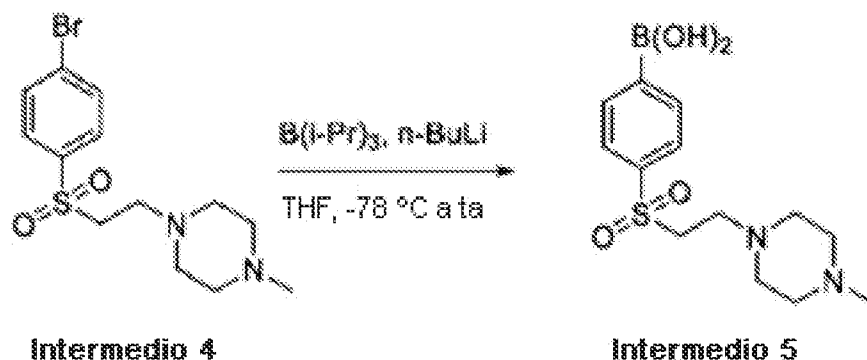
A una solución de cloruro de 4-bromobenceno-1-sulfonilo (20 g, 78,3 mmol) en DCM (300 ml) a 0 °C se añadió TEA (22 ml, 158 mmol), seguido de N,N'-dimetiletano-1,2-diamina (8,3 g, 94,0 mmol). La solución resultante se agitó a ta durante 1 hora y después se diluyó con DCM (300 ml). La solución se lavó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

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



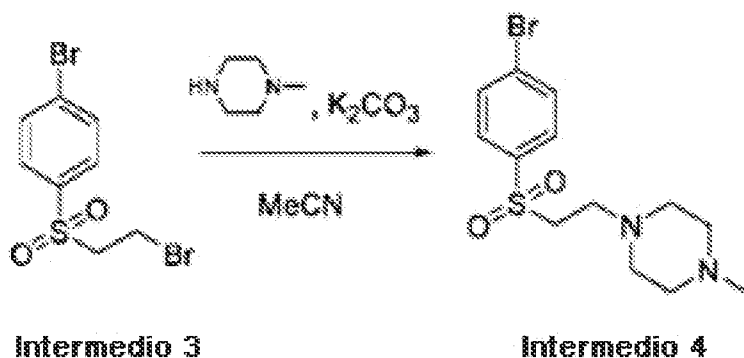
Masa exacta: 480,19; Peso molecular: 480,59; Compuesto 3; pK_a 7,73.

El compuesto del ejemplo 5 puede obtenerse mediante el esquema 4 mostrado en la figura 4. El Intermedio 5 del esquema 4 se puede obtener tal como se describe a continuación.



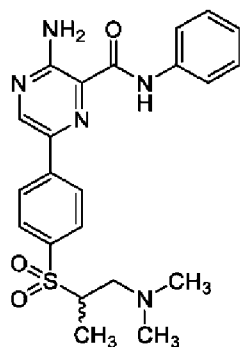
A una solución del Intermedio 4 (1,7 g, 5,0 mmol) en THF (30 ml) a -78 °C en una atmósfera de argón se añadió B(i-Pr)₃ (4,7 g, 25 mmol). Después se añadió gota a gota n-BuLi (2,5 M, 10 ml). La mezcla se agitó a -78 °C durante 2 horas y a continuación a ta durante otras 16 horas. Se añadió agua para inactivar la reacción. La mezcla se concentró a sequedad. El residuo se purificó por HPLC preparativa para proporcionar 300 mg de 5 (19%) en forma de un sólido de color blanco.

Con referencia de nuevo a la figura 4, el Intermedio 4 del esquema 4 se puede obtener tal como se describe a continuación.



A una solución 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 a sequedad. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice para proporcionar 15 g de 4 (71%) en forma de un sólido pálido.

Ejemplo 6: Síntesis del compuesto comparativo 1* (3-amino-6-(4-((1-(dimetilamino)propan-2-il)sulfonyl)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 proporcionado en J. Med. Chem. 2011, 54, 2320 (materiales complementarios) excepto que se usó 1-bromo-4-(2-bromoetilsulfonyl)benzene. Se obtuvo un sólido de color amarillo (427 mg, rendimiento 11%). MS (M+H)⁺ 440; ¹H 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 trietilamonio SOS atrapadas y carga de ATRi en el liposoma.

El octasulfato de sacarosa sódico (peso equivalente 144,8) es una sal de sodio de derivado de sacarosa en la que todos los grupos hidroxilo han formado ésteres de ácido sulfúrico. Se disolvieron sesenta gramos de sal de sodio de octasulfato de sacarosa (SOS) en 150 ml de agua desionizada y se calentaron con agitación (con remolino) de un baño de agua a 50 °C. La solución se hizo pasar a través de una columna rellena con perlas de resina de intercambio catiónico de copolímero de poliestireno divinilbenceno sulfonado (Dowex 50Wx8-malla 100-200, Dow Chemical Co.). La columna se pre-equilibró 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 flujo de salida mostrara una conductividad <1 μ S/cm. El eluyente se supervisó usando un detector de conductividad. Se recogió la fracción de SOS correspondiente al pico de conductividad y se valoró inmediatamente con solución de trietilamina pura (TEA) a pH 6-6,5. La solución se analizó para determinar el sodio residual por potenciometría usando un electrodo sensible al sodio y para determinar la concentración de SOS usando un refractómetro. La solución que presenta un sodio residual inferior al 0,25% se diluyó con agua desionizada hasta una concentración final de SOS 1,1 M y después se filtró de forma estéril usando un filtro Steri-Top de 0,22 μ m de Millipore.

Se adquirió colesterol (Col) de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala, Estados Unidos, y se obtuvieron fosfocolina de soja hidrogenada (HSPC) y metoxi-poli(etilenglicol)-1,2-diestearoil-sn-glicerilo (PEG2000-DSG) de Lipoid GmbH, Ludwigshafen Alemania.

Se disolvieron conjuntamente Col, HSPC y PEG2000-DSG en etanol al 100% (200-proof, Sigma N° de cat: 459828) a una relación molar de 3:2:0,15 a 65 °C. La solución de TEA-SOS (10 veces el volumen de etanol añadido) se mezcló con la solución lipídica a 60-65 °C y se agitó a esta temperatura hasta que se formó una suspensión lechosa homogénea de vesículas multilamelares. Esta suspensión se extruyó 3 veces a través de 5 filtros con surcos grabados de policarbonato apilados (Corning Nucleopore) con un tamaño de poro de 100 nm usando un extrusor a presión de argón (Lipex Biomembranes) a 60-65 °C, y los liposomas unilamelares resultantes se enfriaron rápidamente en hielo y después se almacenaron a 4-6 °C antes de su uso. Se midió la concentración de fosfolípidos mediante un ensayo de fosfato y el diámetro de partícula se registró en un Malvern Nanosizer.

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

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

La mezcla liposoma-fármaco se incubó con agitación ocasional durante 30 minutos a 65 °C. La mezcla de incubación se enfrió rápidamente y se incubó durante 10 minutos a 0 °C, después se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. El fármaco no encapsulado se eliminó mediante cromatografía en gel en Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia) eluido con tampón HBS-6.5 (ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazino)-etilsulfónico (HEPES 5 mM), NaCl 144 mM, pH 6,5). Las fracciones de liposomas eluidas en el volumen vacío se combinaron, se esterilizaron por filtración de 0,2 micrómetros y se almacenaron a 4-6 °C antes de su uso. Los liposomas se caracterizaron por concentración de lípidos, concentración de fármaco y tamaño de partícula (tabla 2). Todos los inhibidores de ATR mostraron buena eficacia de carga excepto el compuesto 1, que en una relación de fármaco con respecto a lípido superior a 400 g/mol formó agregados y precipitó.

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

Ejemplo 8: Descripción general del estudio PK de ATRi liposómico				
Inhibidor de ATR	Relación fármaco/lípido antes de la carga	Relación fármaco/lípido después de la carga	Eficacia de la carga (%)	Tamaño de los liposomas, (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 pudo cargarse. Formó agregados y precipitó		
	379	369	98	122 ± 24

La figura 5 es un gráfico que muestra la farmacocinética en sangre de inhibidores de ATR liposómicos. Se prepararon formulaciones liposómicas de inhibidores de ATR tal 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 de edad (Charles River) (peso corporal de aproximadamente 25 g). Se recogieron muestras de sangre en tubos de heparina de litio mediante sangrado de la vena safena en puntos temporales de 0,08, 1,5, 4, 8 y 24 h. 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 acético al 1% en metanol (Ac al 1%/MeOH) durante al menos 2 horas a -80 °C. Las proteínas plasmáticas se centrifugaron mediante centrifugación a 15000 rpm durante 20 min. A continuación, se transfirieron 75 µl de sobrenadante a viales de HPLC (Thermo Scientific, N° de cat. C4011-LV1) y se añadieron 75 µl adicionales de Ac/MeOH al 1%. El contenido de fármaco se analizó por HPLC, midiéndose cada muestra por duplicado. Los datos se expresaron como el % de dosis inyectada representado frente al tiempo posterior a la inyección. Tal como se muestra en la figura 5, la formulación liposómica del Compuesto 1, el Compuesto 3 y el Compuesto 2 eran inestables en la circulación, no pudiendo detectarse el Compuesto 1 y el Compuesto 3 liposómicos por análisis de HPLC en el punto temporal de 24 horas y el Compuesto 2 liposómico ya en el punto temporal de 8 horas. Dos formulaciones

liposómicas, el Compuesto 6 y el Compuesto 5, tienen buena longevidad en circulación con más del 16% de la dosis inyectada inicial después de 24 horas. La tabla 2 a continuación resume las curvas de PK en sangre. El Compuesto 6 y el Compuesto 5 liposómicos muestran las mayores semividas en plasma en comparación con otros ejemplos liposómicos.

5

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de inhibidores de ATR liposómicos

Fármaco	C _{máx} (mg/ml)	AUC (mg/ml*h)	V _d (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

10

La figura 6 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto MS571 de cuello uterino, tal como se describe en el ejemplo 9A.

15

La figura 7 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto C33A de cuello uterino, tal como se describe en el ejemplo 9A.

La figura 8 es un gráfico que muestra la eficacia antitumoral del Compuesto A liposómico en combinaciones con MM-398 en modelo de xenoinjerto C33A de cuello uterino, según el ejemplo 9A.

20

La figura 9 es un gráfico que muestra la tolerabilidad del Compuesto A liposómico en combinación con MM-398 en MS751 de cuello uterino, según el ejemplo 9A.

25

La eficacia antitumoral de liposomas cargados con un inhibidor de ATR Compuesto A (Ls-Compuesto A) en combinaciones con MM-398 (irinotecán liposómico) se estudió en el modelo de línea celular MS751, C33A y SiHa de cuello uterino humano. Las células se obtuvieron de la Colección estadounidense de cultivos tipo (American Type Culture Collection) (Rockville, MD) y se propagaron en medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G y 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina a 37°C, CO₂ al 5%, tal como recomienda el proveedor. Se obtuvieron ratones desnudos macho atímicos homocigóticos NCR nu/nu (4-5 semanas de edad, peso de al menos 16 g) de Charles River. Se inoculó a los ratones por vía subcutánea en el flanco derecho 0,1 ml de la suspensión que contenía 5×10^6 células suspendidas en PBS complementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 150 mm³ y 350 mm³, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los animales se clasificaron según el tamaño tumoral, y se dividieron en 6 categorías de tamaño tumoral decreciente. 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 tumorales estuvieran igualmente representados.

30

35

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

40

45

$$\text{Volumen tumoral} = ((\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2) / 2$$

50

Para evaluar la toxicidad relacionada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces por semana. Los animales se observaron durante 60 días después de la inoculación del tumor. Cuando los tumores en el grupo alcanzaron el 10% del peso corporal del ratón, los animales del grupo se sacrificaron. Los volúmenes tumorales promedio a través de los grupos se representaron juntos y se compararon a lo largo del tiempo. Tal como se muestra en las figuras 6, 7 y 8, la combinación del inhibidor de ATR Compuesto A liposómico con MM-398 tiene un efecto

antitumoral significativamente más fuerte en comparación con MM-398 y el Compuesto A liposómico solo en los tres modelos de xenoinjerto. La toxicidad relacionada con el tratamiento se evaluó mediante la dinámica del peso corporal de los animales (figura 9). Ninguno de los grupos reveló una toxicidad significativa. El peso de los animales en todos los grupos tratados fue comparable al grupo de control y aumentó de forma constante. Por lo tanto, la formulación liposómica del inhibidor de ATR Compuesto A mostró un aumento de la actividad antitumoral en los modelos tumorales estudiados sin un aumento apreciable en la toxicidad.

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

El MM398 usado en el ejemplo 9A y en cualquier parte del presente documento es un liposoma de irinotecán que puede prepararse en un procedimiento de múltiples etapas. En primer lugar, los lípidos se disuelven en etanol caliente. Los lípidos pueden incluir DSPC, colesterol y MPEG-2000-DSPE combinados en una relación molar de 3:2:0,015. Preferentemente, los liposomas pueden encapsular el octasulfato de sacarosa (SOS) de irinotecán encapsulado en una vesícula que consiste en DSPC, colesterol y MPEG-2000-DSPE combinados en una relación molar de 3:2:0,015. La solución de etanol-lípido resultante se dispersa en un medio acuoso que contiene amina sustituida y polianión en condiciones eficaces para formar un liposoma esencialmente unilamelar con un tamaño apropiado (por ejemplo, 80-120 nm) que contiene la amina sustituida (en forma de amonio) y el polianión encapsulado dentro de una vesícula formada a partir de los lípidos disueltos. La dispersión se puede realizar, por ejemplo, mezclando la solución etanólica de lípido con la solución acuosa que contiene una amina sustituida y un polianión a una temperatura superior a la temperatura de transición del lípido, por ejemplo, 60-70 °C, y extruyendo la suspensión lipídica hidratada resultante (liposomas multilamelares) a presión a través de uno o más filtros de membrana con surcos grabados, por ejemplo, policarbonato, con un 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, TEASOS) a una concentración de aproximadamente 0,4-0,5 N. A continuación se retira la totalidad o sustancialmente la totalidad de TEA o 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 ingrese en el liposoma como intercambio con la TEA que abandona el liposoma. Las condiciones pueden incluir una o más condiciones seleccionadas del grupo que consiste en: añadir el agente osmótico (por ejemplo, dextrosa al 5%) al medio externo liposómico para equilibrar la osmolalidad de la solución de TEA-SOS atrapada y/o evitar la rotura 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 lípido durante la etapa de carga, y aumentar la temperatura por encima de la temperatura de transición de los lípidos liposómicos (por ejemplo, hasta 60-70 °C) para acelerar el intercambio transmembrana de TEA e irinotecán. La carga de irinotecán por intercambio con la TEA en el liposoma continúa preferentemente hasta que toda o sustancialmente toda la TEA se elimine del liposoma, agotando así su gradiente de concentración en el liposoma. Preferentemente, el proceso de carga de liposomas de irinotecán continúa hasta que la relación de equivalentes en gramos de irinotecán con respecto a sucrooctasulfato es de al menos 0,9, al menos 0,95, 0,98, 0,99 o 1,0 (o varía entre aproximadamente 0,9-1,0, 0,95-1,0, 0,98-1,0 o 0,99-1,0). Preferentemente, el proceso de carga de liposomas de irinotecán continúa hasta que al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o más de la TEA se elimine del interior del liposoma. El irinotecán puede formar sucrosulfato de irinotecán dentro del liposoma, tal como irinotecán y octasulfato de sacarosa en una relación molar de aproximadamente 8:1. A continuación, se eliminan el irinotecán y la TEA extraliposómicos restantes para obtener el liposoma de irinotecán usando, por ejemplo, cromatografía en gel (exclusión por tamaño), diálisis, intercambio iónico o procedimientos de ultrafiltración. El medio externo liposómico se reemplaza con un fluido inyectable, farmacológicamente aceptable, por ejemplo, solución salina isotónica tamponada. Finalmente, la composición liposómica se esteriliza, por ejemplo, mediante filtración de 0,2 micrómetros, se dispensa en viales de dosis, se etiqueta y se almacena, por ejemplo, tras refrigeración a 2-8 °C, hasta su uso. El medio externo liposómico puede reemplazarse por fluido farmacológicamente aceptable al mismo tiempo que se eliminan el irinotecán y la TEA extraliposómicos restantes. El pH extraliposómico 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 4 °C a lo largo de 180 días), por ejemplo, preparando la composición a un pH de aproximadamente 6,5-8,0, o cualquier valor del pH adecuado entre los mismos (incluidos, por ejemplo, 7,0-8,0, y 7,25).

Se pesaron DSPC, colesterol (Col) 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 partes alícuotas (A-D). Cada muestra se evaporó a sequedad usando un evaporador rotatorio a 60 °C. El cloroformo residual se eliminó de los lípidos mediante disposición al vacío (180 µtorr) a temperatura ambiente durante 12 h. Los lípidos secados se disolvieron en etanol a 60 °C, y se añadió TEASOS precalentado de concentración apropiada de modo que el contenido final de alcohol fuera del 10% (v/v). La concentración de lípido fue 75 mM. La dispersión lipídica se extruyó a aproximadamente 65 °C a través de 2 membranas de policarbonato de 0,1 µm apiladas (Nucleopore) 10 veces usando una extrusora de tambor térmico 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 tamaño. En primer lugar, la resina DOWEX IRA 910 se trató con NaOH 1 N, seguido de 3 lavados con agua desionizada y seguido después de 3 lavados con HCl 3 N, y después múltiples lavados con agua. Los liposomas se hicieron pasar a través de la resina preparada, y la conductividad de las fracciones eluidas se

medió usando un medidor de conductividad de celda de flujo (Pharmacia, Upsalla, Suecia). Las fracciones se consideraron aceptables para una purificación adicional si la conductividad era inferior a 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El eluato de liposomas se aplicó después a una columna Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrada con agua desionizada, y se midió la conductividad de la fracción de liposomas recogida (generalmente inferior a 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$). La isotonicidad a través de la membrana se logró mediante la adición de solución de dextrosa al 40% a una concentración final del 5% (p/p) y se añadió el tampón (Hepes) a partir de una solución madre (0,5 M, pH 6,5) a una concentración final de 10 mM.

Se preparó una solución madre de irinotecán disolviendo irinotecán • HCl trihidratado en polvo en agua desionizada hasta 15 mg/ml de irinotecán-HCl anhidro, teniendo en cuenta el contenido de agua y los niveles de impurezas obtenidos a partir del certificado de análisis de cada lote. La carga de fármaco se inició mediante la adición de irinotecán a 500 g/mol de fosfolípido liposómico y calentamiento a $60 \pm 0,1$ °C durante 30 min en un baño de agua caliente. Las soluciones se enfriaron rápidamente tras retirarlas del baño de agua por inmersión en agua enfriada con hielo. El fármaco extraliposómico se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, usando columnas Sephadex G75 equilibradas y eluidas con solución salina tamponada con Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, pH 6,5). Las muestras se analizaron para determinar el irinotecán mediante HPLC y el fosfato mediante el procedimiento de Bartlett (véase Determinación de fosfato).

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

El ONIVYDE es un liposoma estabilizado en almacenamiento que tiene un pH de aproximadamente 7,25. El producto ONIVYDE contiene sucrosfato de irinotecán encapsulado en un liposoma, obtenido a partir de un material de partida de clorhidrato de irinotecán trihidratado. El nombre químico del irinotecán es (S)-4,11-dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo 1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-9-il-[1,4'bipiperidina]-1'-carboxilato. La dosificación de ONIVYDE puede calcularse con respecto a la cantidad equivalente de material de partida de clorhidrato de irinotecán trihidratado usada para preparar los liposomas de irinotecán, o con respecto a la cantidad de irinotecán en el liposoma. Hay aproximadamente 866 mg de irinotecán por gramo de clorhidrato de irinotecán trihidratado. Por ejemplo, una dosis de ONIVYDE de 80 mg con respecto a la cantidad de material de partida de clorhidrato de irinotecán trihidratado contiene realmente aproximadamente $0,866 \times (80 \text{ mg})$ de irinotecán en el producto final (es decir, una dosis de 80 mg/m² de ONIVYDE con respecto al peso de material de partida de clorhidrato de irinotecán es equivalente a aproximadamente 70 mg/m² de irinotecán en el producto final). El ONIVYDE es una dispersión liposómica isotónica opaca, estéril, 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 bicapa lipídica unilamelar, de aproximadamente 110 nm de diámetro, que encapsula un espacio acuoso que contiene irinotecán en un estado gelificado o precipitado como la sal de octasulfato de sacarosa. La vesícula está compuesta por 6,81 mg/ml de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 2,22 mg/ml de colesterol y 0,12 mg/ml de polietilenglicol terminado en metoxi (PM 2000)-diestearoilfosfatidil etanolamina (MPEG-2000-DSPE) 0,12 mg/ml. Cada ml también contiene 4,05 mg/ml de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES) como tampón y 8,42 mg/ml de cloruro sódico como reactivo de isotonicidad. Cada vial de ONIVYDE contiene 43 mg/10 ml de base libre de irinotecán en forma de una dispersión liposómica 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 aproximadamente 70 mg/m² de irinotecán, proporcionando una cantidad de irinotecán equivalente a 80 mg/m² de clorhidrato de irinotecán trihidratado, y menos de aproximadamente el 20% de liso-PC.]. La forma de dosificación unitaria puede ser una formulación intravenosa que tiene un volumen total de aproximadamente 500 ml. El ONIVYDE se prepara para su administración diluyendo la dispersión liposómica isotónica del vial de la forma siguiente: se retira el volumen calculado de ONIVYDE del vial. Se diluye el ONIVYDE en 500 ml de inyección de dextrosa al 5%, USP o inyección de cloruro de sodio al 0,9%, USP y se mezcla la solución diluida mediante inversión suave; se protege la solución diluida de la luz y se administra la solución diluida en el espacio de 4 horas tras su preparación cuando se almacena a temperatura ambiente o en el espacio de 24 horas tras su preparación cuando se almacena en condiciones refrigeradas [2°C a 8°C (36°F a 46°F)].

El ONIVYDE (inyección de liposomas de irinotecán) está indicado, en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina, para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma metastásico del páncreas que ha progresado tras una terapia basada en gemcitabina. El ONIVYDE se administra antes de leucovorina y fluorouracilo. La dosis recomendada de ONIVYDE es de 70 mg/m² de irinotecán administrado mediante infusión intravenosa a lo largo de 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 de 50 mg/m² de irinotecán administrado mediante infusión intravenosa a lo largo de 90 minutos. La dosis de ONIVYDE puede aumentarse a 70 mg/m², según se tolere en ciclos posteriores. No hay dosis recomendada de ONIVYDE para pacientes con bilirrubina en suero por encima del límite superior de lo normal. Se infunde ONIVYDE en forma de una solución diluida por vía intravenosa a lo largo de 90 minutos.

Los regímenes de tratamiento adecuados incluyen 70 mg/m² de ONIVYDE con (1+d forma racémica) 400 mg/m² de leucovorina (o 200 mg/m² de la forma l activa de leucovorina) y 2.400 mg/m² de fluorouracilo a lo largo de 46 horas cada 2 semanas (ONIVYDE/5-FU/LV; n = 117), 100 mg/m² de ONIVYDE cada 3 semanas (n = 147), o 200 mg/m² de leucovorina y 2000 mg/m² de fluorouracilo a lo largo de 24 horas semanalmente 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 figura 10A y la figura 10B es cada una un gráfico que muestra la eficacia del Compuesto 5 liposómico en combinación con MM-398 en modelos de xenoinjerto de ratones NCI-H2170 (figura 10A) o DMS-114 (figura 10B), tal como se describe en el ejemplo 10.

La figura 11A y la figura 11B es cada una un gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que representan la eficacia del Compuesto 5 liposómico en combinación con MM-398 en un modelo de xenoinjerto de ratón NCI-H2170 (figura 11A) y DMS-114 (figura 11B), tal como se describe en el ejemplo 10.

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

La eficacia antitumoral de liposomas cargados con un inhibidor de ATR Compuesto 5 en combinaciones con MM-398 (irinotecán liposómico) se estudió en el modelo de líneas celulares pulmonares humanas NCI-H2170 (carcinoma de células escamosas de pulmón) y DMS-114 (carcinoma de pulmón de células pequeñas).

Las células se obtuvieron de la Colección estadounidense de cultivos tipo (American Type Culture Collection) (Rockville, MD) y se propagaron en medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G y 50 µg/ml de sulfato de estreptomycin a 37°C, CO₂ al 5%, tal como recomienda el proveedor. Se obtuvieron ratones desnudos macho atímicos homocigóticos NCR nu/nu (4-5 semanas de edad, peso de al menos 16 g) de Charles River. Se inoculó a los ratones por vía subcutánea en el flanco derecho 0,1 ml de la suspensión que contenía 5×10^6 células suspendidas en PBS complementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 150 mm³ y 350 mm³, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los animales se clasificaron según el tamaño tumoral, y se dividieron en 6 categorías de tamaño tumoral decreciente. 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 tumorales 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 (solución salina tamponada con HEPES, pH 6,5); 2) MM-398 a una dosis de 5 mg/kg por inyección; 3) Compuesto liposómico 5 a una dosis de 80 mg/kg por inyección; 4) MM-398 seguido de inyecciones de Compuesto liposómico 5 con un intervalo de 24 h. Se prepararon liposomas para inyecciones tal como se describe en el ejemplo 7. El MM-398 se describe en el ejemplo 9B.

El peso del animal y el tamaño tumoral se supervisaron dos veces por semana. La progresión del tumor se supervisó mediante palpación y mediciones con calibre de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces a la semana. Los tamaños tumorales se determinaron dos veces por semana a partir de las mediciones con calibre usando la fórmula:

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

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

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

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

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

La eficacia antitumoral de liposomas cargados con un inhibidor de ATR Compuesto 5 en combinaciones con MM-398 (irinotecán liposómico) se comparó con la formulación liposómica del Compuesto A en el modelo de xenoinjerto de líneas celulares pulmonares humanas Calu-6 y COLO-699.

Las células se obtuvieron de la Colección estadounidense de cultivos tipo (American Type Culture Collection) (Rockville, MD) y se propagaron en medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G y 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina a 37°C, CO₂ al 5% tal como recomienda el proveedor. Se obtuvieron ratones desnudos macho atímicos homocigóticos NCR nu/nu (4-5 semanas de edad, peso de al menos 16 g) de Charles River. Se inoculó a los ratones por vía subcutánea en el flanco derecho 0,1 ml de la suspensión que contenía 5×10^6 células suspendidas en PBS complementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 150 mm³ y 350 mm³, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los animales se clasificaron según el tamaño tumoral, y se dividieron en 6 categorías de tamaño tumoral decreciente. 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 tumorales 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 (solución salina tamponada con HEPES, pH 6,5); 2) MM-398 a una dosis de 10 o 20 mg/kg por inyección; 3) Compuesto liposómico 5 a una dosis de 80 mg/kg por inyección; 4) Compuesto liposómico A a una dosis de 80 mg/kg por inyección 5) MM-398 seguido de inyecciones de Compuesto 5 liposómico con un intervalo de 24 h. 6) MM-398 seguido de inyecciones de Compuesto A liposómico con un intervalo de 24 h. Se prepararon liposomas para inyecciones tal como se describe en el ejemplo 7.

El peso del animal y el tamaño tumoral se supervisaron dos veces por semana. La progresión del tumor se supervisó mediante palpación y mediciones con calibre de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces por semana. Los tamaños tumorales se determinaron dos veces por semana a partir de las mediciones con calibre usando la fórmula:

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

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

Ejemplo 12: Estudio de cribado de combinación de fármaco libre

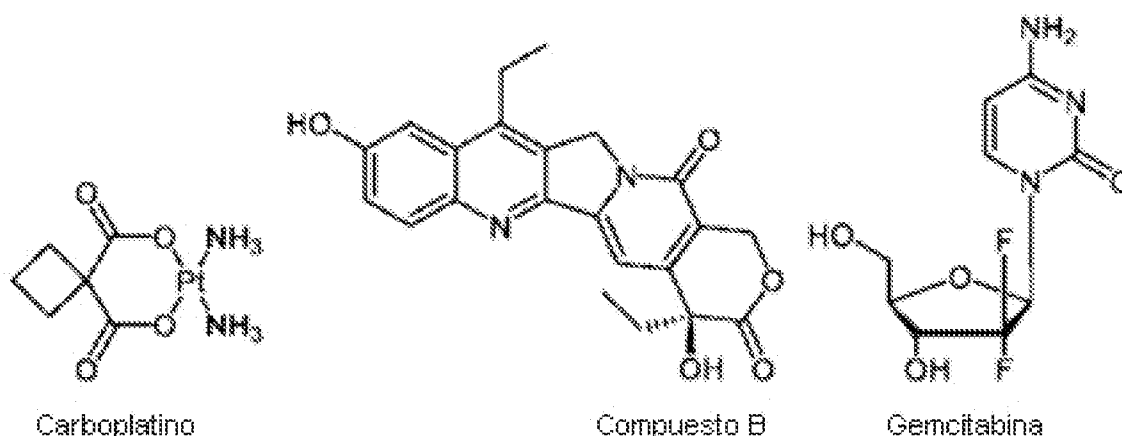
La figura 14A es un gráfico que ilustra la destrucción celular con monoterapia *in vitro* del Compuesto 6 y el Compuesto 5 en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón. El Compuesto 5 es más eficaz con una CI₅₀ ~3 (= 100,5) veces menor que el Compuesto 6. La figura 14B es un gráfico que muestra el efecto del Compuesto 5 frente al Compuesto 6 en combinación con tres agentes quimioterapéuticos (Carboplatino, Gemcitabina, Compuesto B). La figura compara el CI₅₀ en log (µM) de la combinación de los agentes quimioterapéuticos con 1 µg/ml del Compuesto 6 o del Compuesto 5. La adición del Compuesto 5 a los agentes quimioterapéuticos fue más potente (CI₅₀ inferior) que el Compuesto 6 en todos los agentes citotóxicos sometidos a ensayo y en todas las líneas celulares excepto una.

La figura 15 es un gráfico que muestra el cambio de CI₅₀ de la combinación (ejemplo 2 + Compuesto B) en la línea celular Sum190PT (TNBC).

La figura 16A y la figura 16B son gráficos que muestran una comparación de los cambios de CI₅₀ 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 por luminiscencia CELLTITER-GLO (Promega) con placas de fondo transparente blancas de 384 pocillos Corning N° de cat. 3707. Las células se plaquearon (1000 células/pocillo) en formato de 384 pocillos y se dejaron incubar a 37 °C durante 24 horas. Se añadieron fármacos de monoterapia en el punto temporal de 24 horas y después se dejaron incubar a 37 °C durante 24 horas. En el punto temporal de 48 horas, se retiraron los fármacos del medio, se lavaron con PBS y se añadió medio reciente. A continuación, las células se dejaron incubar a 37 °C durante 72 horas. Para estudios de combinación, las células se expusieron a carboplatino o Compuesto B o gemcitabina durante 24 horas, después se retiró el agente quimioterapéutico y las células se expusieron al compuesto secundario (inhibidor de ATR) durante 24 horas. Las células se cultivaron en medio nuevo durante 48 horas adicionales.



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

5 **Análisis de datos:**

Los datos se analizaron usando un algoritmo propio desarrollado con el uso de Matlab (Mathworks, Natick MA). En resumen, se calcularon los valores medios de luminiscencia de CTG promedio para 4 pocillos replicados. 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 con respecto a un pocillo no tratado de control. La concentración de fármaco en micromoles (μM) se transformó logarítmicamente antes del ajuste a una curva logística de 4 parámetros.

$$y = b + \frac{(a-b)}{(1 + 10^{(CI50 - C) \cdot pendiente})}$$

En la que C : concentración de fármaco, y : valor de CTG normalizado, a : asíntota superior (representa la destrucción celular máxima), b : asíntota inferior (restringida a 0,8-1,2), $CI50$, pendiente: pendiente de curva logística.

Se realizó el control de calidad de datos para garantizar que el intervalo de concentración es óptimo según estas reglas: (1) si la concentración más baja destruye más del 70% de las células, el intervalo de concentración se considera demasiado potente (2) si la concentración más alta destruye menos del 30% de las células, el intervalo de concentración se considera bajo o la línea celular es demasiado resistente. Adicionalmente, se evaluó la bondad del ajuste usando R^2 y $R^2 < 0,9$ se marca como un ajuste deficiente.

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 realizó una determinación de CE_{50} para el conjunto suministrado de compuestos contra la quinasa ATR/ATRIP(h) usando una concentración lineal de enzima en el ensayo ATR/ATRIP HTRF de Eurofins utilizando p53 de longitud completa marcado con GST como sustrato.

Se determinó la actividad de ATR/ATRIP(h) a una concentración de ATP dentro de 15 μM de K_m en 9 concentraciones de compuesto con diluciones semilogarítmicas a partir de 10 μM . La fosforilación de ATR/ATRIP de p53 en Ser15 se midió mediante la formación de un complejo de transferencia de energía que consiste en un anticuerpo p53 anti-fosfo Ser15 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.

Se diluyó previamente ATR/ATRIP(h) en HEPES 25 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,01%, glicerol al 1%, DTT 5 mM, 1 mg/ml de BSA y se sometió a ensayo en HEPES 25 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,01%, glicerol al 1%, MnCh 10 mM usando GST,cMyc p53-(hu,FL) 30 nM como sustrato. 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 de 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 CE_{50} se determinaron usando GRAPHPAD PRISM.

Los datos expresados como el % de actividad de control se representaron frente a la concentración de inhibidor, y se ajustaron a una logística de cuatro parámetros usando GRAPHPAD PRISM. Se muestran gráficos para cada

compuesto junto con los datos en el informe de Excel adjunto. A continuación se muestra un resumen de las potencias de los compuestos.

Tabla 4

Compuesto ID	Quinasa	ATP μM	CE_{50}^* nM	Superior	Inferior	Pendiente	r2
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 estimados de CI_{50} son los siguientes (obtenidos utilizando STANDARD KINASEPROFILE):

Tabla 5

Compuesto	Quinasa	CI_{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 ATR total y fosfo con análisis por inmunotransferencia Western

Con referencia a la figura 17: Se expusieron células de cáncer de pulmón DMS-114 a gemcitabina [16 nM] o inhibidor de ATR (Compuesto A o Compuesto 5 [1 μM]) solos o en combinación *in vitro*. Se generaron lisados de proteínas de células completas después de 1, 3, 6 y 24 horas usando un tampón de lisis celular que contenía SDS al 2% y se almacenaron a -80 °C hasta que se recogieron todas las muestras y se ejecutaron conjuntamente al mismo tiempo para el análisis por inmunotransferencia Western. Las siguientes proteínas y fosfoproteínas de interés se detectaron mediante anticuerpos adquiridos de Cell Signaling Technology (véase la parte de procedimientos y materiales a continuación): ATR total y fosfo-(S428), fosfo-CHK1 (S317 y S345), γH2AX , beta-actina.

Resultados en la figura 17: La señal de ATR total y fosfo se reduce fuertemente con el transcurso del tiempo con la adición de cualquiera de los dos inhibidores de ATR (Compuesto A y Compuesto 5) y no en el control o el tratamiento con gemcitabina sola (compárense, por ejemplo, los carriles 1, 2 con 3, 4 o 5, 6 a las 24 horas). En respuesta a la gemcitabina, la señalización de fosfo-CHK1 (S317 y S345) aumenta significativamente a lo largo del periodo 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 posterior por medio 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 se supone que da lugar a la detención del ciclo celular y la reparación del daño en el ADN, induce la muerte celular por acumulación de daño en el ADN. El aumento en la señal de γH2AX puede observarse como un sustituto para la medición del aumento de la toxicidad y la acumulación de daño en el ADN.

Cultivo celular

Se cultivaron U2OS y todas las demás células en (RPMI) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos. Se generaron líneas celulares NuLight Red compatibles con formación de imágenes y el transcurso del tiempo tal como recomienda Essen Bioscience Inc. usando partículas lentivirales, infección y protocolos de selección de puromicina.

Anticuerpos y inmunotransferencias Western

Todos los anticuerpos específicos de diana y de fosfo se adquirieron de Cell Signaling y/o Epitomics y se usaron a diluciones 1:1000. En la tabla 6 está disponible una lista de todos los anticuerpos. Se usaron protocolos de inmunotransferencia Western e inmunohistoquímica basados en anticuerpos estándar. En resumen, se usó tampón de lisis celular basado en SDS al 2% para recoger el lisado de células completas para inmunotransferencia Western. Se adquirieron anticuerpos secundarios y protocolos de tinción y se siguieron con respecto a LiCor Biosciences y/o BD Bioscience.

Tabla 6

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

Protocolo de lisis de células completas

Las células se cultivaron y se trataron en una báscula de discos de 6 cm. Para recoger las células, se retiró el medio y se reemplazó rápidamente por PBS enfriado con hielo. Después, el PBS se reemplazó por 250 µl de tampón de lisis con SDS al 2%. Después de cinco minutos de incubación, las células lisadas se rasparon y se cargaron en una columna de centrifugación de microcentrífuga homogeneizadora de lisados celulares (QIAquick, Qiagen, Nº de cat. 79656). El filtrado se cargó después en una columna de filtro centrífugo de 0,2 µm (Nanosep MF 0,2_m, Pall, Nº de cat. ODM02C34). Después, los lisados se almacenaron a -80 °C.

El tampón de lisis que contenía 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 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: Cribado de panel de quinasas amplio (359)

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

Tabla 8

Quinasa	Compuesto 5 (M)	Log Cl ₅₀	Quinasa	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

Quinasa	Compuesto 5 (M)	Log CI ₅₀	Quinasa	nM
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

Ejemplo 17: Datos usando el Compuesto A como comparador.

Se realizó un ensayo de crecimiento y muerte celular combinando el Compuesto A y gemcitabina a diversas concentraciones en células U2OS. Los resultados se compararon de nuevo con una predicción del crecimiento y muerte celular con la combinación de los dos compuestos (figura 18A). La cantidad de células vivas y apoptóticas también se determinó en las concentraciones establecidas de compuesto A (1 μ M) y gemcitabina (0,04 μ M) en células USO2 (figura 18B). Los resultados muestran que la combinación de Compuesto A y gemcitabina es mejor para favorecer la muerte celular que cualquier compuesto solo.

El compuesto A también se analizó solo y en combinación con SN38 a concentraciones establecidas (1 μ M y 0,2 μ M, respectivamente) en varias líneas celulares de cáncer de pulmón (células NCI-H520 y NCI-H596) y U2OS, con la cantidad de células supervisadas a lo largo del tiempo. Los resultados indican que la combinación es más eficaz para mantener o reducir la cantidad de células a lo largo del tiempo que el Compuesto A o SN38 aislados (figura 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. El ensayo *in vitro* muestra una reducción en la cantidad de células con el transcurso del tiempo con la combinación en comparación con cualquier compuesto solo (figura 20).

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

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

El Compuesto A o el Compuesto 5 se usaron en combinación con SN38 en células A549. El crecimiento celular se midió a lo largo del tiempo y en un intervalo de concentraciones. Se resalta la curva de crecimiento a la concentración óptima de Compuesto/SN38 (figura 22A). La proliferación relativa de células A549 se midió con el Compuesto A o el Compuesto 5 solos en un intervalo de concentraciones (figura 22B).

Los valores de CI₅₀ se determinaron en varias líneas celulares usando una concentración establecida de gemcitabina con concentraciones variables de Compuesto A o Compuesto 5 (figura 23).

En la figura 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 analizaron varios inhibidores de ATR para determinar su capacidad para inhibir ATR (en la diana) y ATM (fuera de la diana). La inhibición se notifica como CI_{50} en nM (figura 25A). Se analizaron quinasas "fuera de la diana" adicionales también con el Compuesto A o el Compuesto 5 (figura 25B).

- 5 Se realizó un ensayo en la diana con el Compuesto A o el Compuesto 5 en células de cáncer de pulmón A549 (figura 26A-B), células de cáncer de pulmón H23 (figuras 26C-D) y células DMS-114 (figuras 26E-F). La fosforilación de CHK1S345, una lectura de la inhibición de ATR, se midió mediante inmunotransferencia Western. Cada compuesto se usó también con una concentración fija de gemcitabina.
- 10 Se realizaron estudios adicionales en la diana 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 analizaron y se midieron varios parámetros de actividad en la diana mediante inmunotransferencia Western (figura 27A-B)
- 15 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 (figura 28). Un mayor porcentaje de células se detiene en la fase G2 cuando se recibe la combinación de fármacos en comparación con los controles.

20 **Ejemplo 20: Comparación de formulaciones liposómicas del Compuesto A y el Compuesto 5 combinados con MM398.**

Se usaron modelos de xenoinjerto pulmonar DMS-114 para medir los efectos de Ls-Compuesto A o de 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 analizaron midiendo los niveles de fosforilación de CHK1S345 (figura 29).

Los efectos del Ls-Compuesto A con MM398 también se analizaron en la línea celular SUM-149. Los efectos del tratamiento se analizaron midiendo los niveles fosforilados de RPA2, DNAPK, CHK1 y γ H2AX. El Ls-Compuesto 5 también se analizó sin la combinación de MM398 (figura 30A-C).

30 **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 liposomas cargados con un inhibidor de ATR Compuesto 5 en combinaciones con MM-398 (irinotecán liposómico) se estudió en el modelo de línea celular SUM-149 humana (cáncer de mama triple negativo).

Las células se obtuvieron de la Colección estadounidense de cultivos tipo (American Type Culture Collection) (Rockville, MD) y se propagaron en medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina G y 50 μ g/ml de sulfato de estreptomycin a 37 °C, CO_2 al 5% tal como recomienda el proveedor. Se obtuvieron ratones desnudos macho atímicos homocigóticos NCR nu/nu (4-5 semanas de edad, peso de al menos 16 g) de Charles River. Se inoculó a los ratones por vía subcutánea en el flanco derecho 0,1 ml de la suspensión que contenía 10^7 células suspendidas en PBS complementado con Matrigel al 30%. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 150 mm^3 y 350 mm^3 , los animales se asignaron a los grupos de tratamiento de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los animales se clasificaron según el tamaño tumoral, y se dividieron en 6 categorías de tamaño tumoral decreciente. 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 tumorales 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 (solución salina tamponada con HEPES, pH 6,5); 2) MM-398 a una dosis de 5 mg/kg por inyección; 3) Compuesto liposómico 5 a una dosis de 80 mg/kg por inyección; 4) MM-398 seguido de inyecciones de Compuesto 5 liposómico con un intervalo de 24 h; 5)) MM-398 seguido de inyecciones de inhibidor de ATR Compuesto A libre no encapsulado. Se prepararon liposomas para inyecciones tal como se describe en el ejemplo 10.

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

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

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

Tal como se demuestra en la figura 31, el inhibidor de ATR Compuesto 5 liposómico mejoró significativamente la eficacia antitumoral de MM-398 en el modelo de xenoinjerto. El tratamiento combinado del inhibidor de ATR liposómico y MM-398 no afectó al peso corporal de los animales (figura 32).

5 Ejemplo 22: Perfilado de líneas celulares y comparación con datos de Incucyte

Se perfiló un panel de líneas celulares marcadas fluorescentemente para diversas proteínas implicadas en la ruta de daño al ADN. Las líneas celulares de cáncer parentales se transdujeron con un lentivirus NuLight Red y se seleccionaron con puromicina. Se midieron y se cuantificaron los niveles basales de proteína mediante análisis por inmunotransferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal del marcador de 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 Compuesto 5 y al tratamiento combinado con quimioterapia. La puntuación integral se puede calcular de la siguiente manera:

Con referencia a las figuras 33 y 34, se sembraron líneas celulares 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 fármaco 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 computó una puntuación integral específica de la línea celular promediando las cuatro puntuaciones más grandes a lo largo de la matriz de dosis.

Con referencia a las figuras 35 y 36, se observó que en líneas celulares de cáncer de pulmón expuestas al Compuesto 5 y SN38, los niveles basales de proteína MRE11 y los niveles basales de ATM se correlacionaron significativamente con las puntuaciones integrales de la línea celular. En células de cáncer de pulmón que tienen un trasfondo comprometido por p53 y se expusieron al Compuesto 5 y SN38, la puntuación integral se correlaciona con los niveles de proteína NBS, MRE11 y RAD50. Las células "comprometidas por p53" son aquellas que tienen niveles basales de proteína p53 distintos de cero (en la mayor parte de las células, los niveles de p53 son solo visibles en las inmunotransferencias Western después del tratamiento). (Véanse la figura 37, la figura 38 y la figura 39).

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

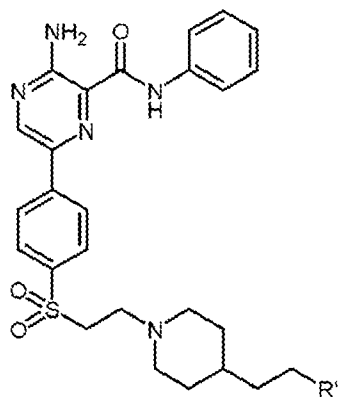
Con referencia a las figuras 40-44: Los marcadores farmacodinámicos pChk1, pRPA2, pATR, pDNAPK, pChk2 y yH2AX se cuantificaron mediante inmunotransferencia Western después de que las líneas celulares de cáncer se expusieran a diversas dosis del Compuesto 5 o el Compuesto A en combinación con SN38. Se sembraron células HCC70, DMS 114, MDAMB468, NCIH1299 y NCIH460 en placas de 12 pocillos, se dejaron incubar durante la noche y después se expusieron a SN38 y/o el inhibidor de ATR. Después de 24 horas de exposición al fármaco, las células se lisaron para la inmunotransferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal del marcador de PD se normalizó a la señal de beta actina.

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

Con referencia a las figuras 45-50: Se perfilaron seis líneas celulares marcadas fluorescentemente para diversas proteínas implicadas en la ruta de daño al ADN después de la exposición a un inhibidor de ATR y/o gemcitabina. Las líneas celulares de cáncer parentales se transdujeron con un lentivirus NuLight Red y se seleccionaron con puromicina. Los marcadores farmacodinámicos pChk1, pATR y yH2AX se cuantificaron mediante inmunotransferencia Western después de que las líneas celulares de cáncer se expusieran a diversas dosis del Compuesto 5 o el Compuesto A en combinación con gemcitabina 16 nM. Se sembraron células A549, NCIH23, DMS114, U2OS, HCC827 y NCIH460 en placas de 12 pocillos, se dejaron incubar durante la noche y después se expusieron a SN38 y/o el inhibidor de ATR. Después de 6 o 18 horas de exposición al fármaco, las células se lisaron para la transferencia Western. Cuando se realizó la cuantificación, la señal del marcador de PD se normalizó a la señal de beta actina.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

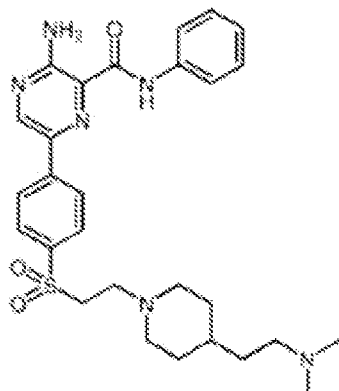


(Ia).

en la que R' es un resto alquilamino que comprende una amina sustituida con alquilo terciaria que tiene un pKa de 9,5 o superior.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R' es NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄.

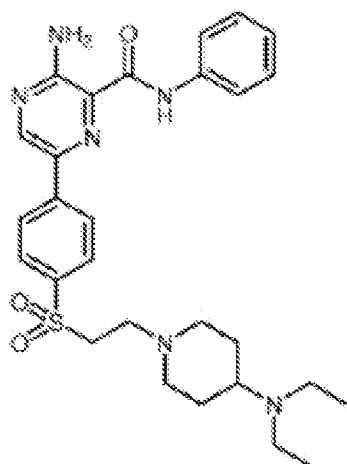
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene la fórmula del Compuesto 5:



(Compuesto 5).

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

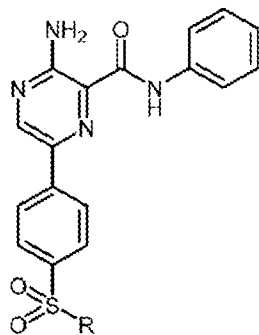
4. Un compuesto de la fórmula del Compuesto 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



(Compuesto 6).

5. Una composición liposómica que comprende un inhibidor de proteína quinasa ATR de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5

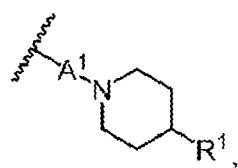


(I),

en la que R es:

i)

10

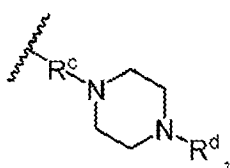


en la que A¹ o bien está ausente o bien es alquilo C₁-C₄, y R¹ es alquil C₁-C₄amino;

ii) -N(H)(alquilo C₁-C₄)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄;

15 iii) -(G)-NR^aR^b, en el que R^a y R^b son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄; y G es alquilo C₁-C₄, en el que G puede estar opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₄; o

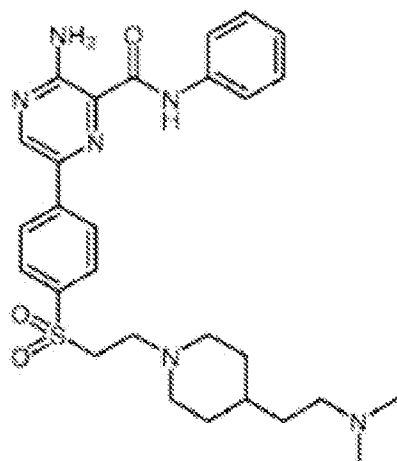
iv)



20

en la que R^c y R^d son cada uno independientemente alquilo C₁-C₄.

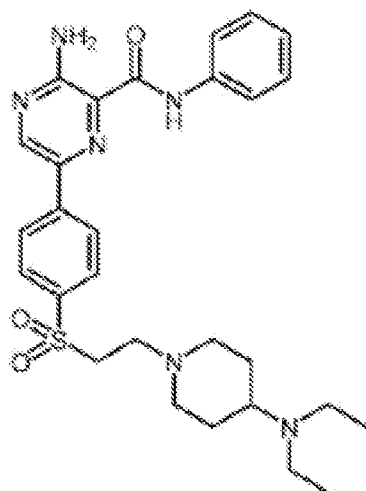
6. La composición liposómica de la reivindicación 4, en la que el compuesto es el Compuesto 5:



(Compuesto 5),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 7. La composición liposómica de la reivindicación 4, en la que el compuesto es el Compuesto 6:



(Compuesto 6),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 8. La composición liposómica de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el liposoma comprende un fosfolípido y colesterol.
- 15 9. La composición liposómica de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el liposoma comprende un derivado lipídico de polietilenglicol (PEG) y colesterol.
10. La composición liposómica de la reivindicación 8, en la que el liposoma comprende además metoxi-poli(etilenglicol)-1,2-diestearoil-sn-glicerilo (PEG2000-DSG).
- 20 11. La composición liposómica de la reivindicación 10, en la que el liposoma comprende HSPC, colesterol y PEG2000-DSG en una relación molar de 3:2:0,15.
12. La composición liposómica de la reivindicación 5, en la que R es un resto que comprende una amina con un pKa superior a 7,0.
- 25 13. La composición liposómica de la reivindicación 5, en la que R es un resto que comprende una amina con un pKa superior a 8,0.

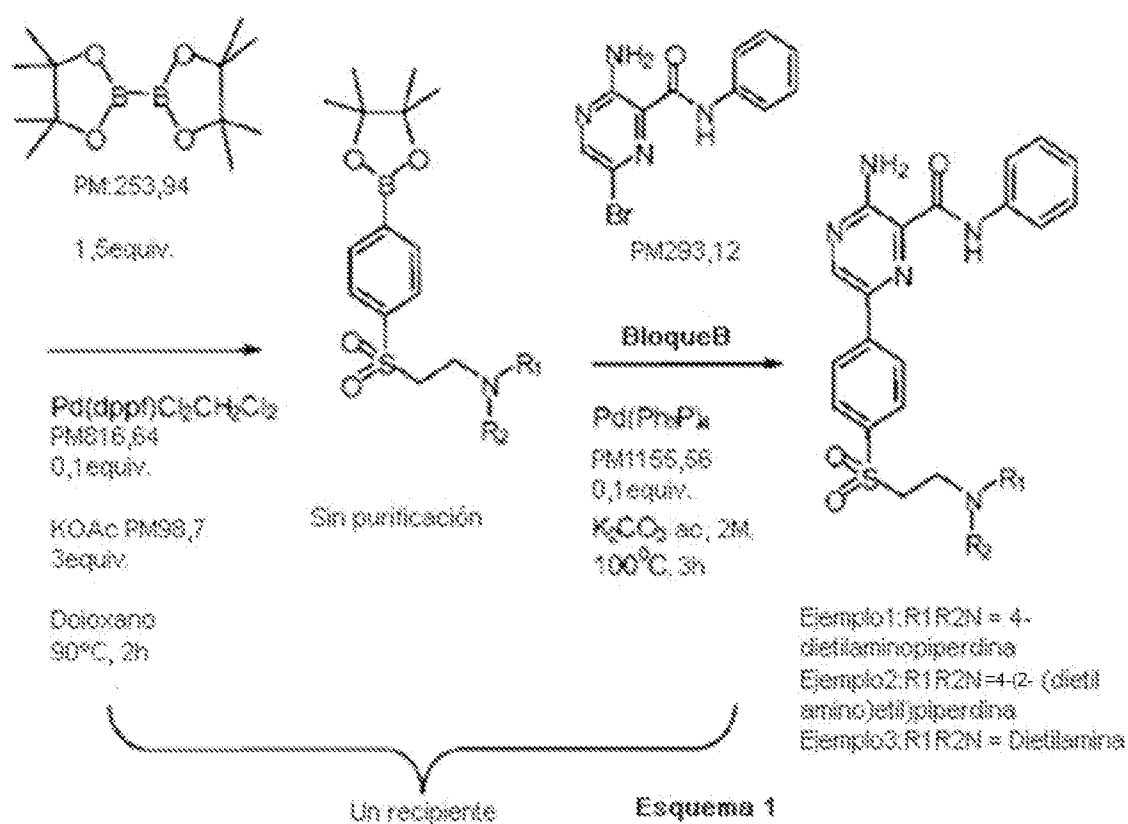
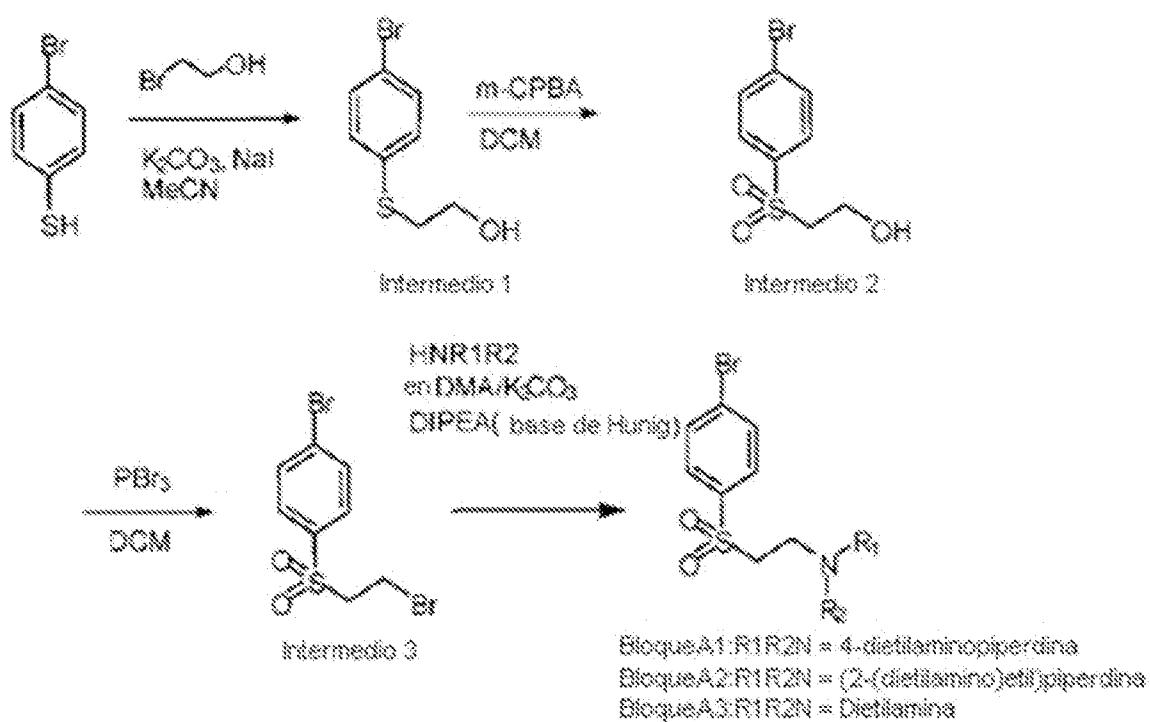
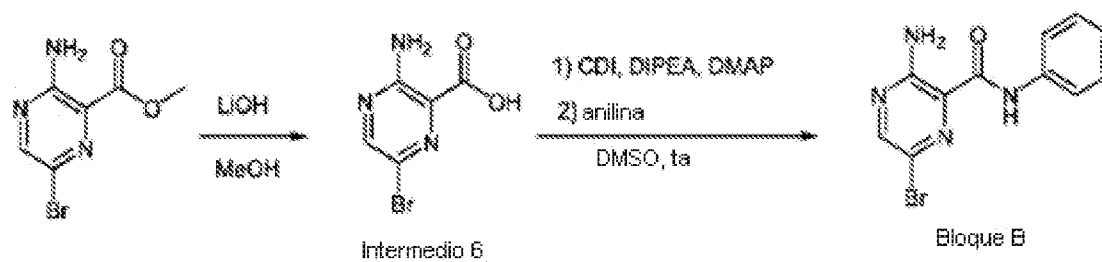
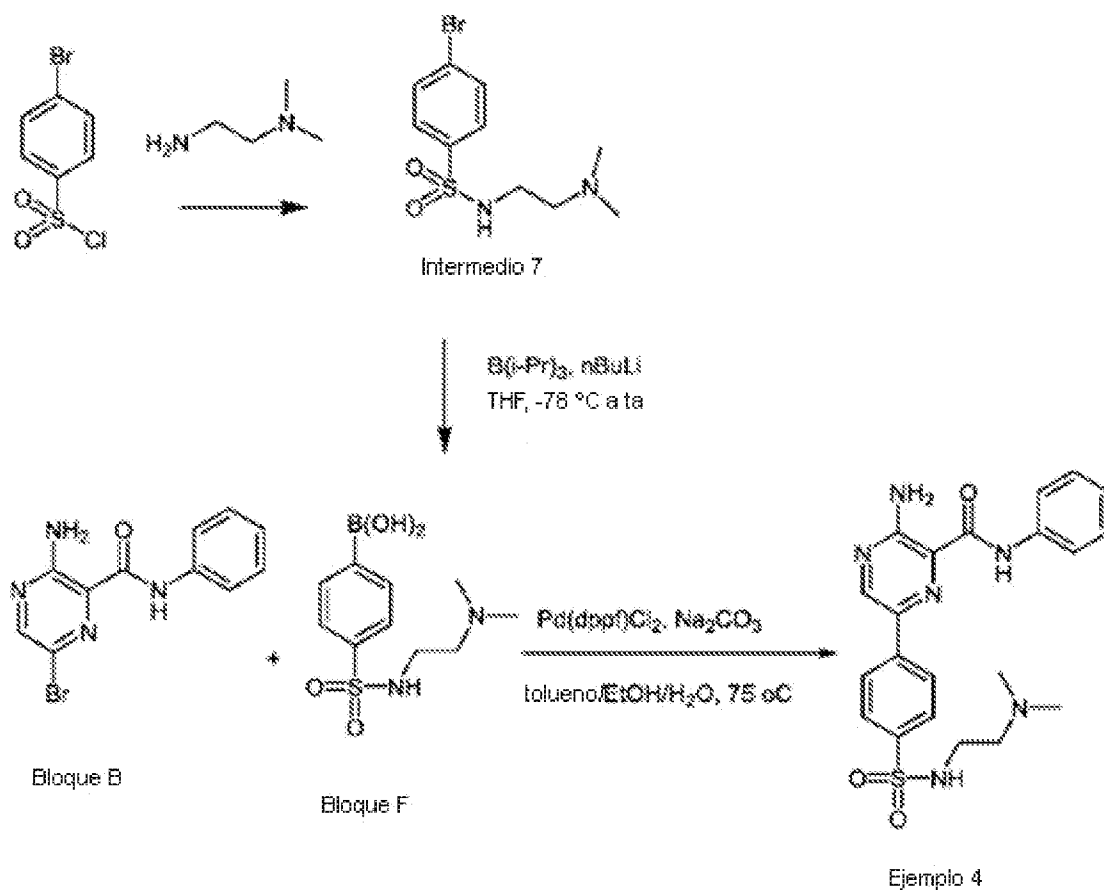
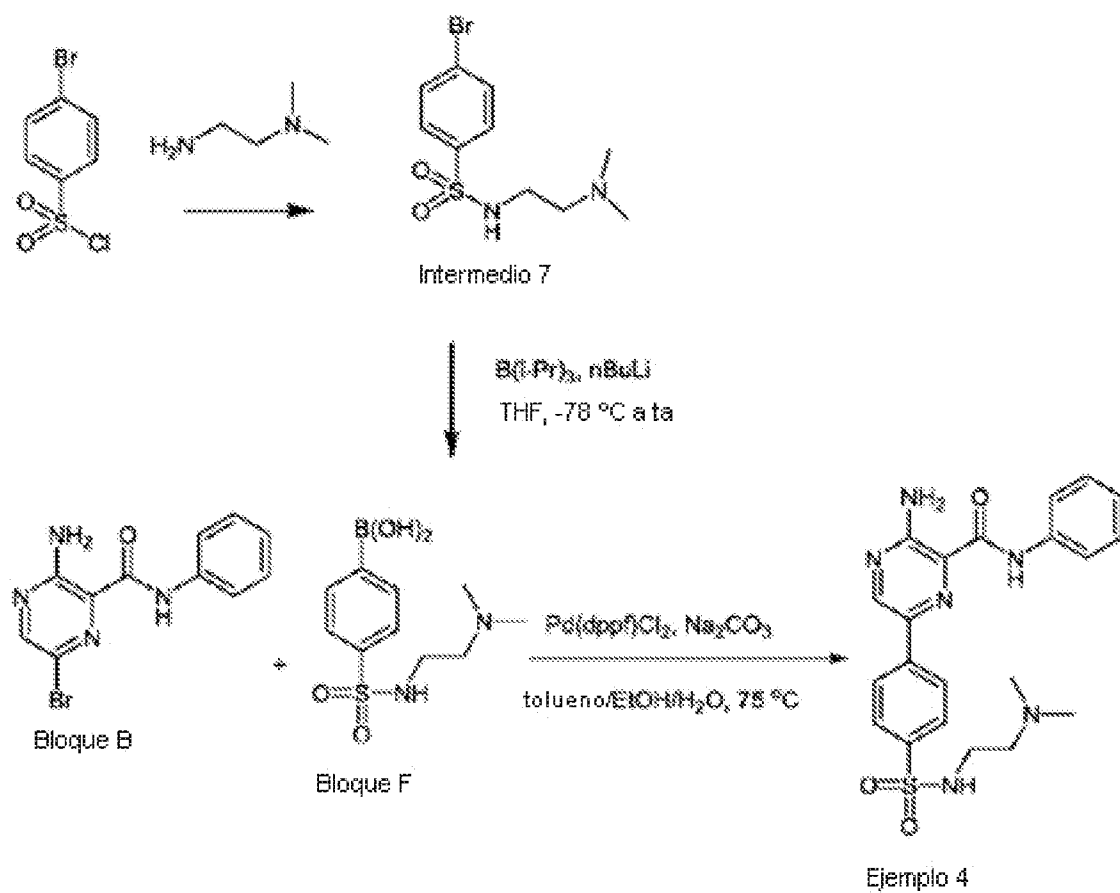
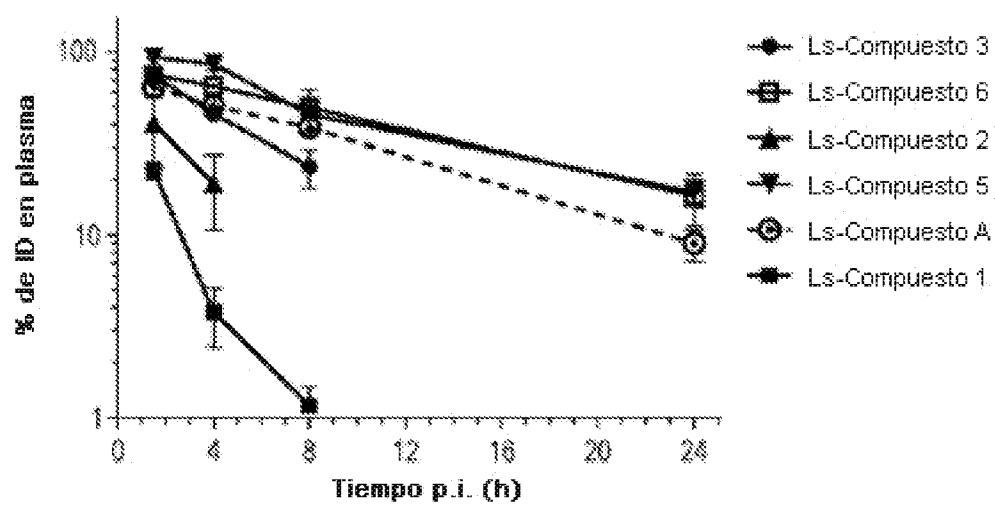


Fig. 1

Esquema 2

**Fig. 2****Fig. 3**

**Fig. 4****Fig. 5**

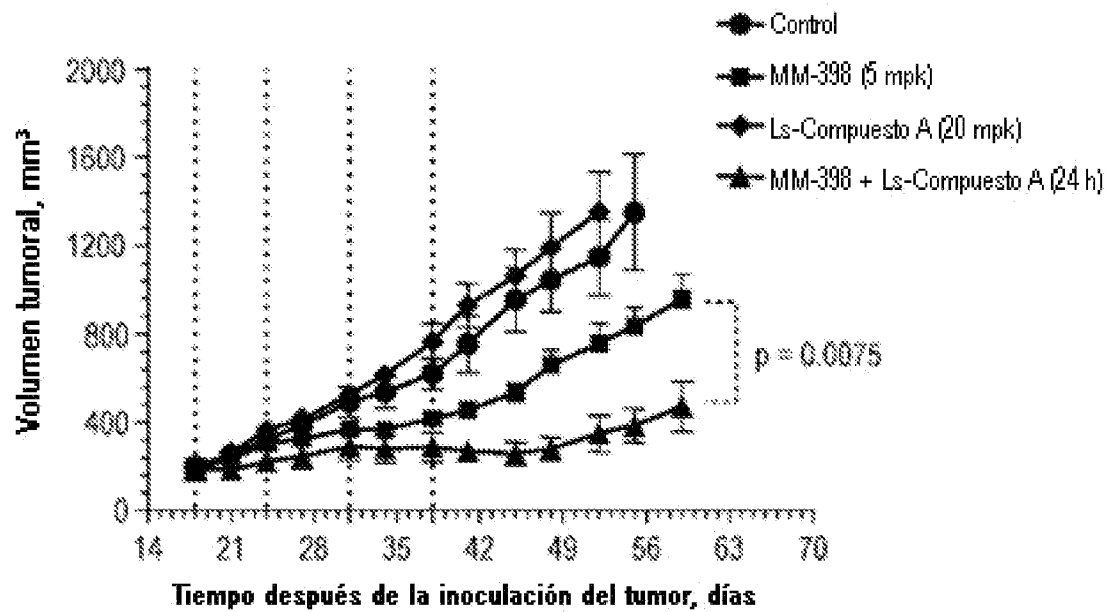


Fig. 6

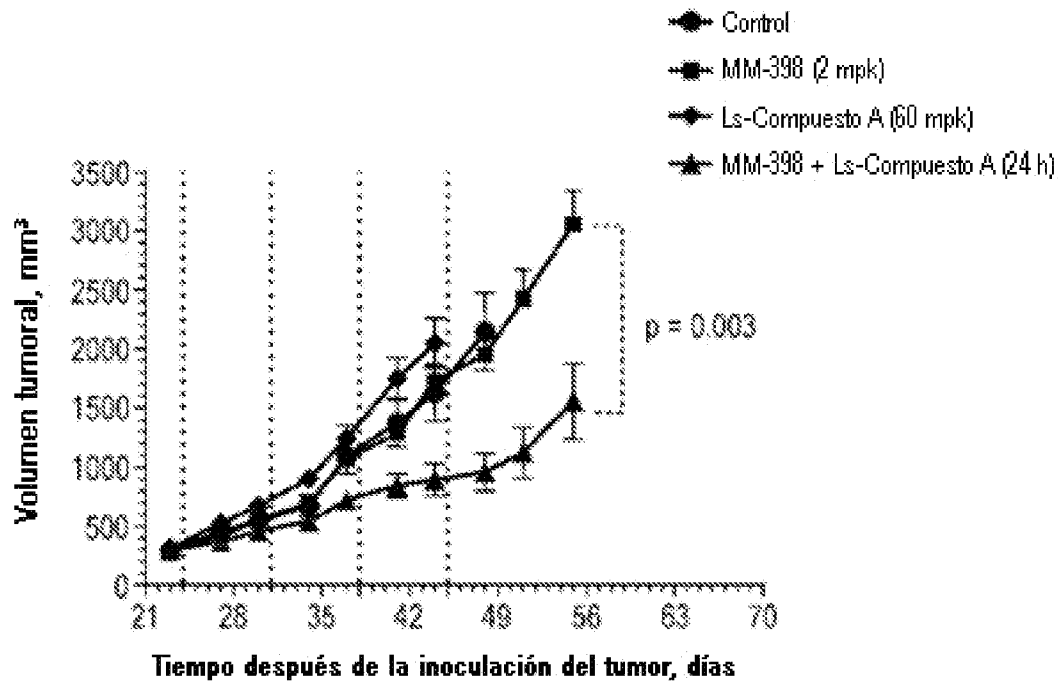
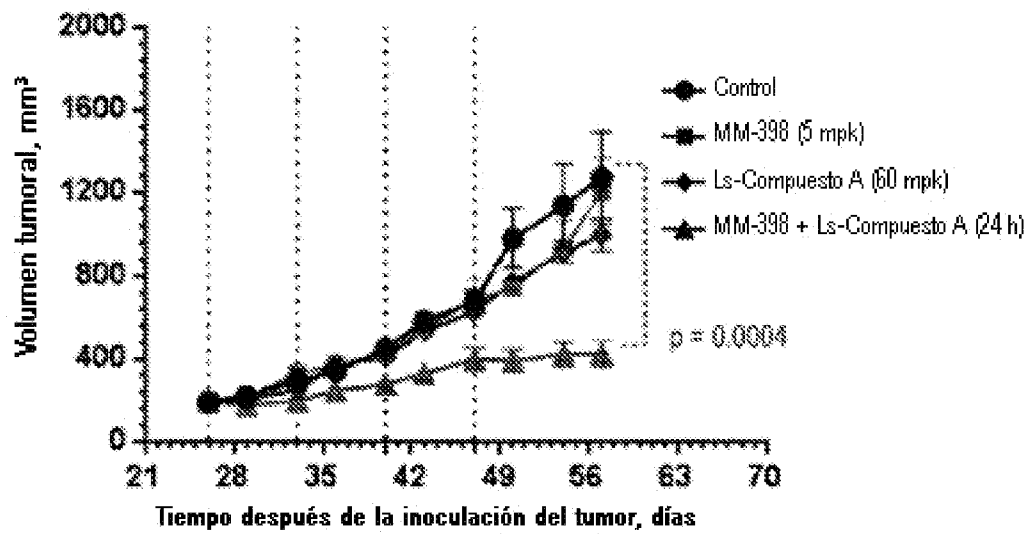
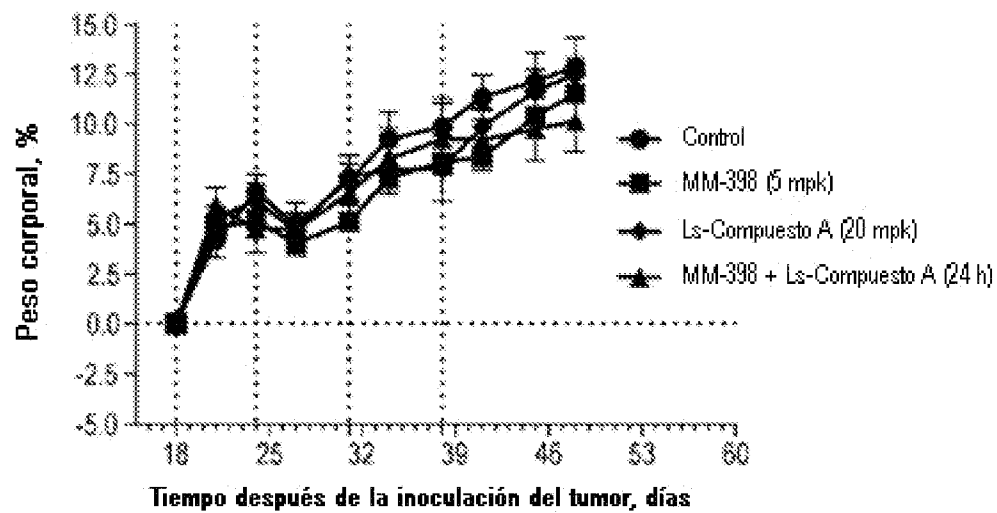


Fig. 7

*Fig. 8**Fig. 9*

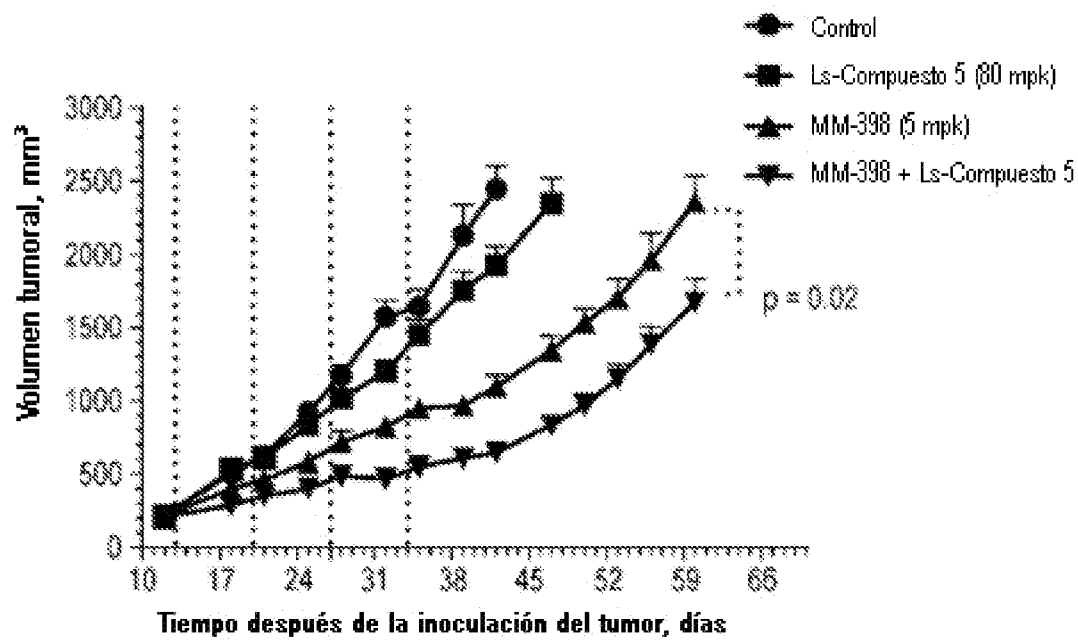


Fig. 10A

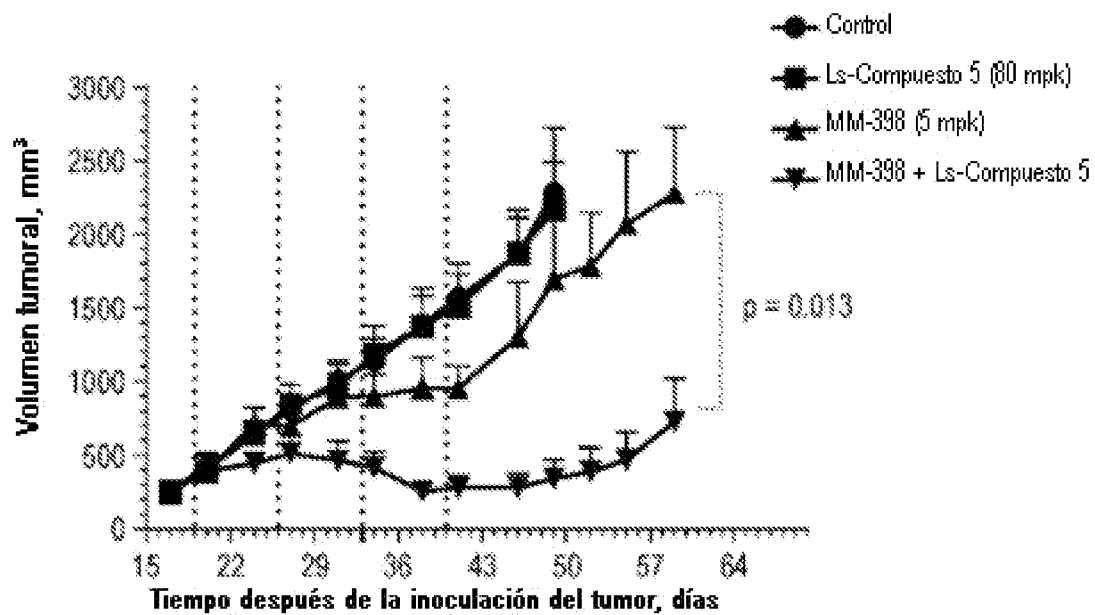


Fig. 10B

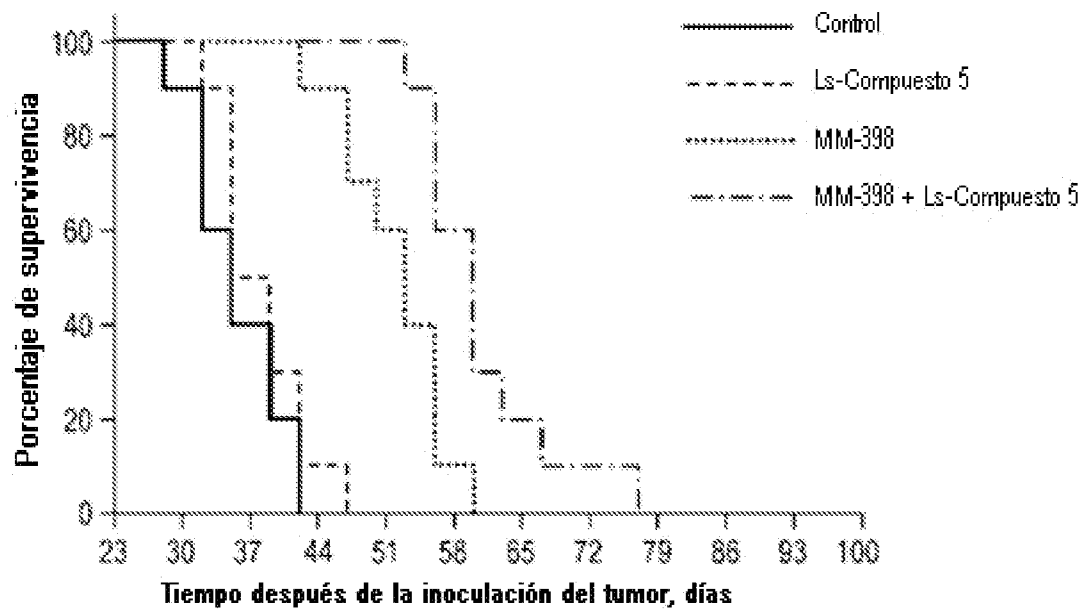


Fig. 11A

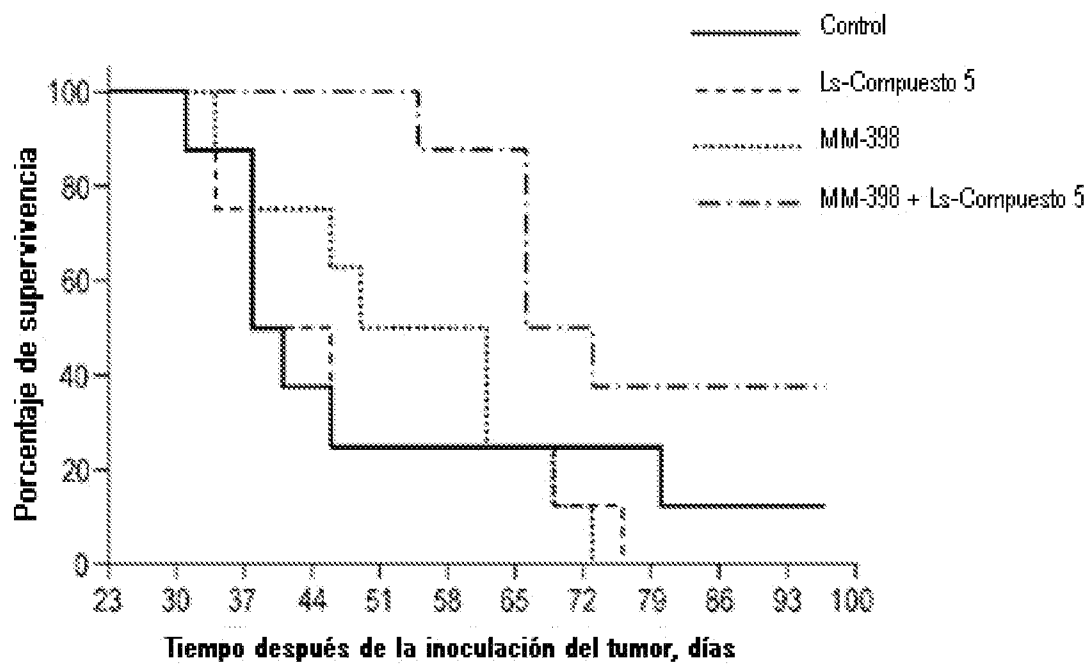


Fig. 11B

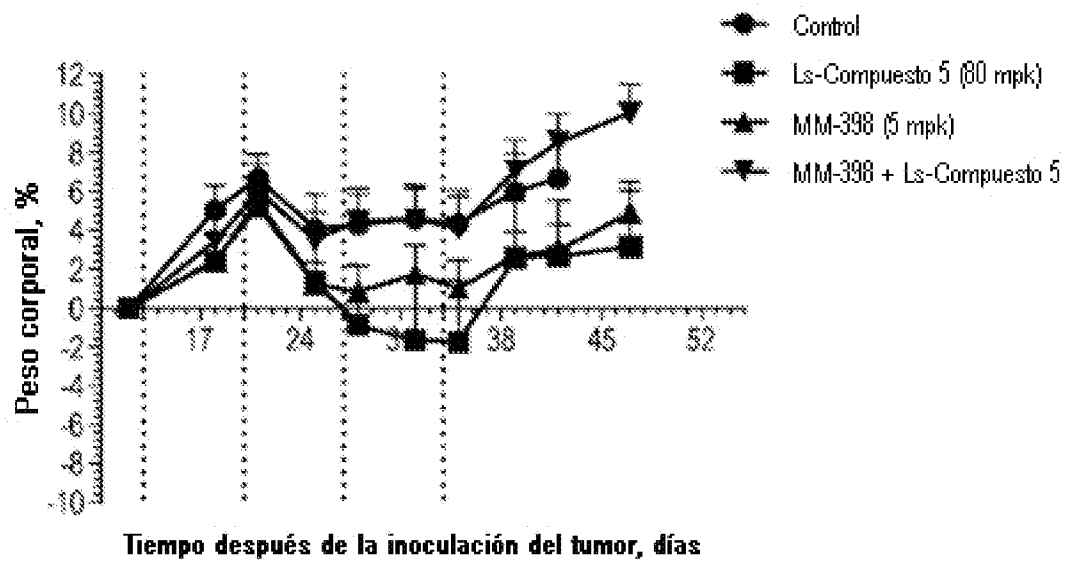


Fig. 12A

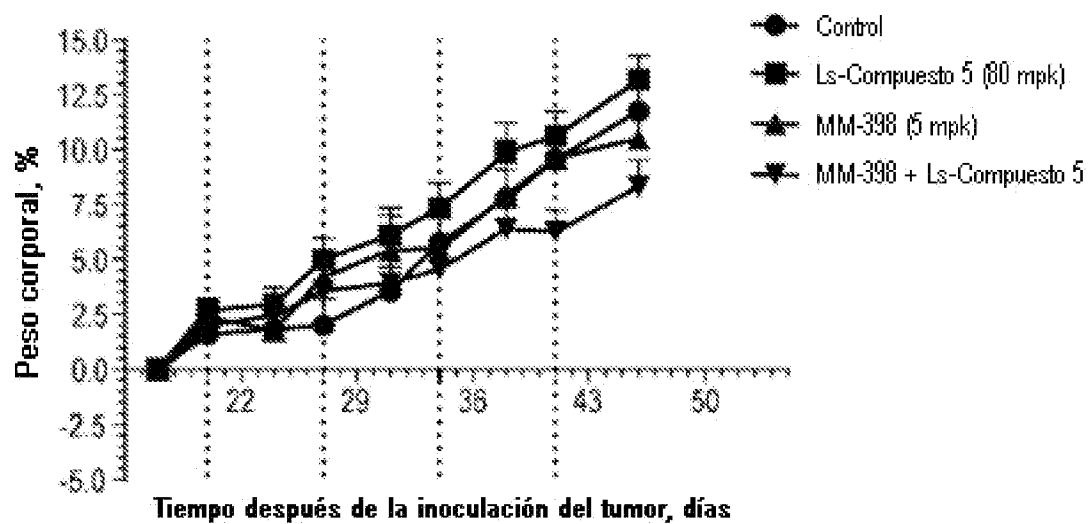


Fig. 12B

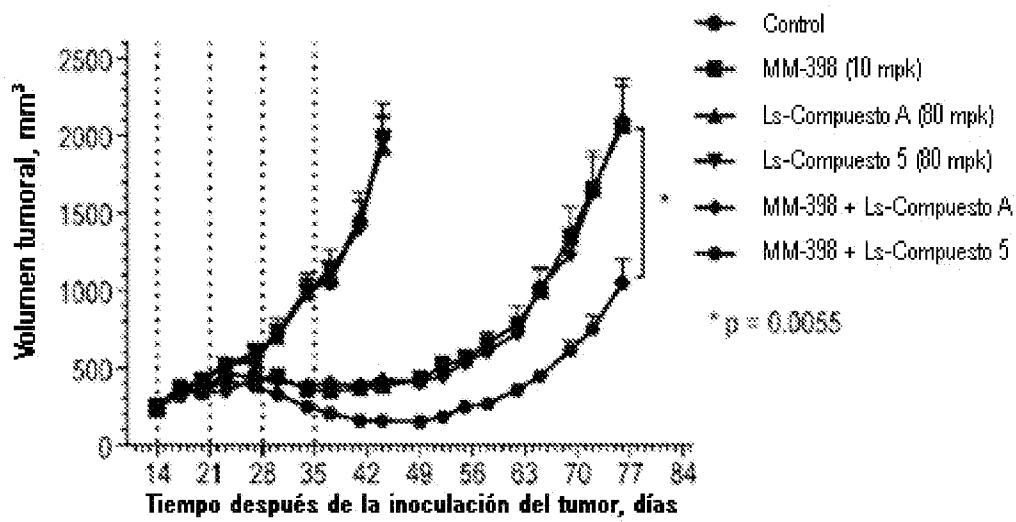


Fig. 13A

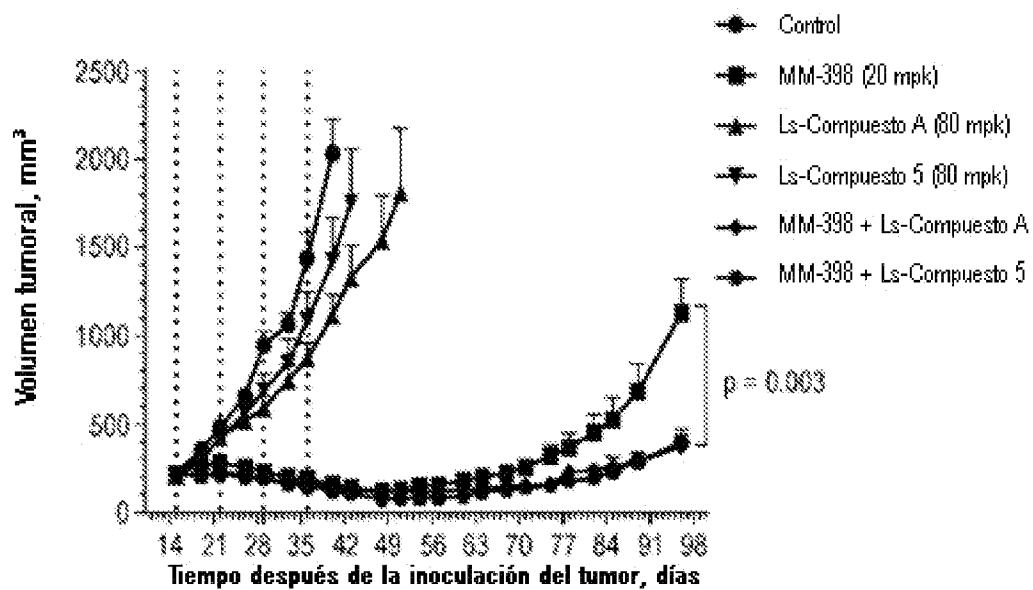


Fig. 13B

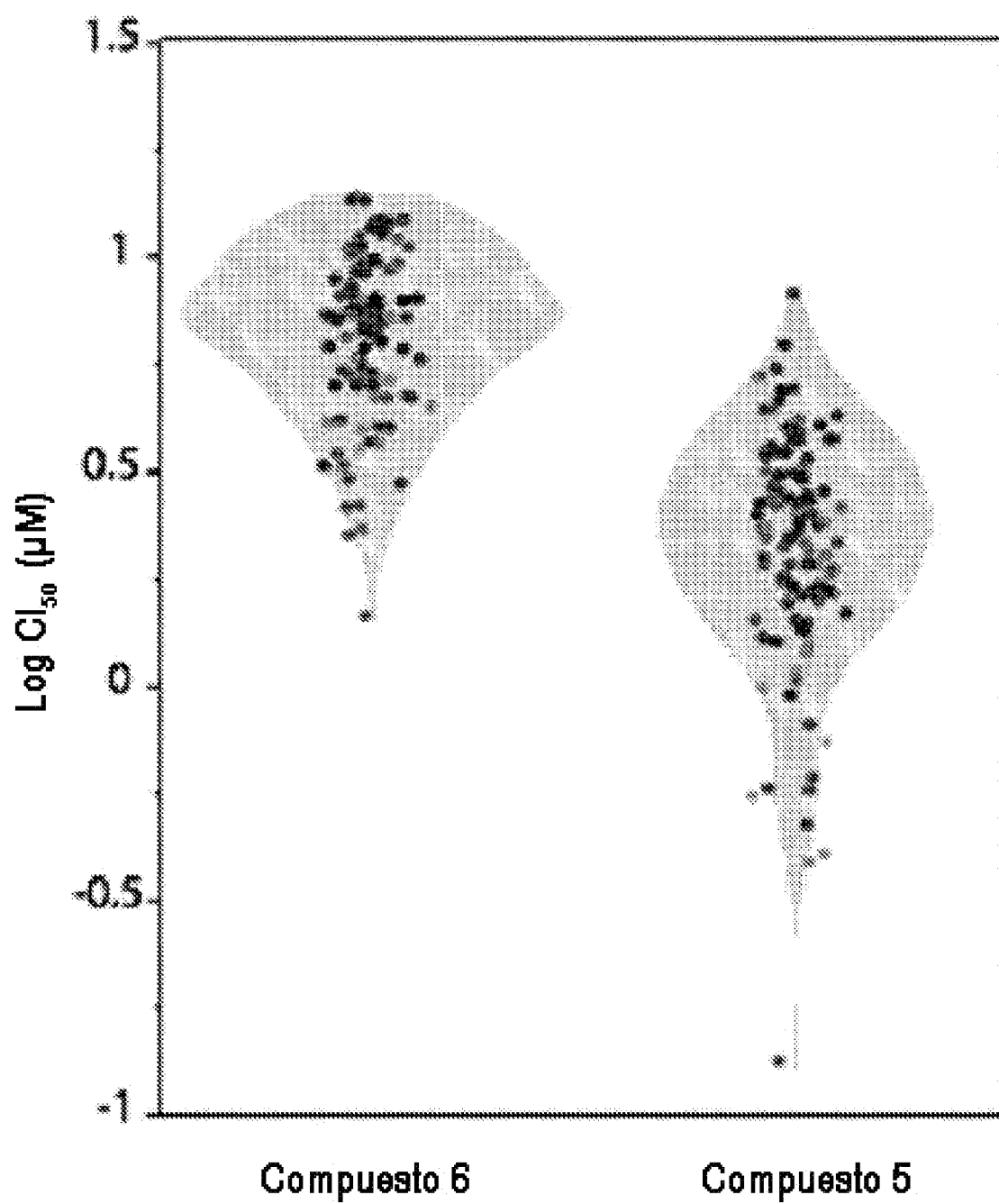


Fig. 14A

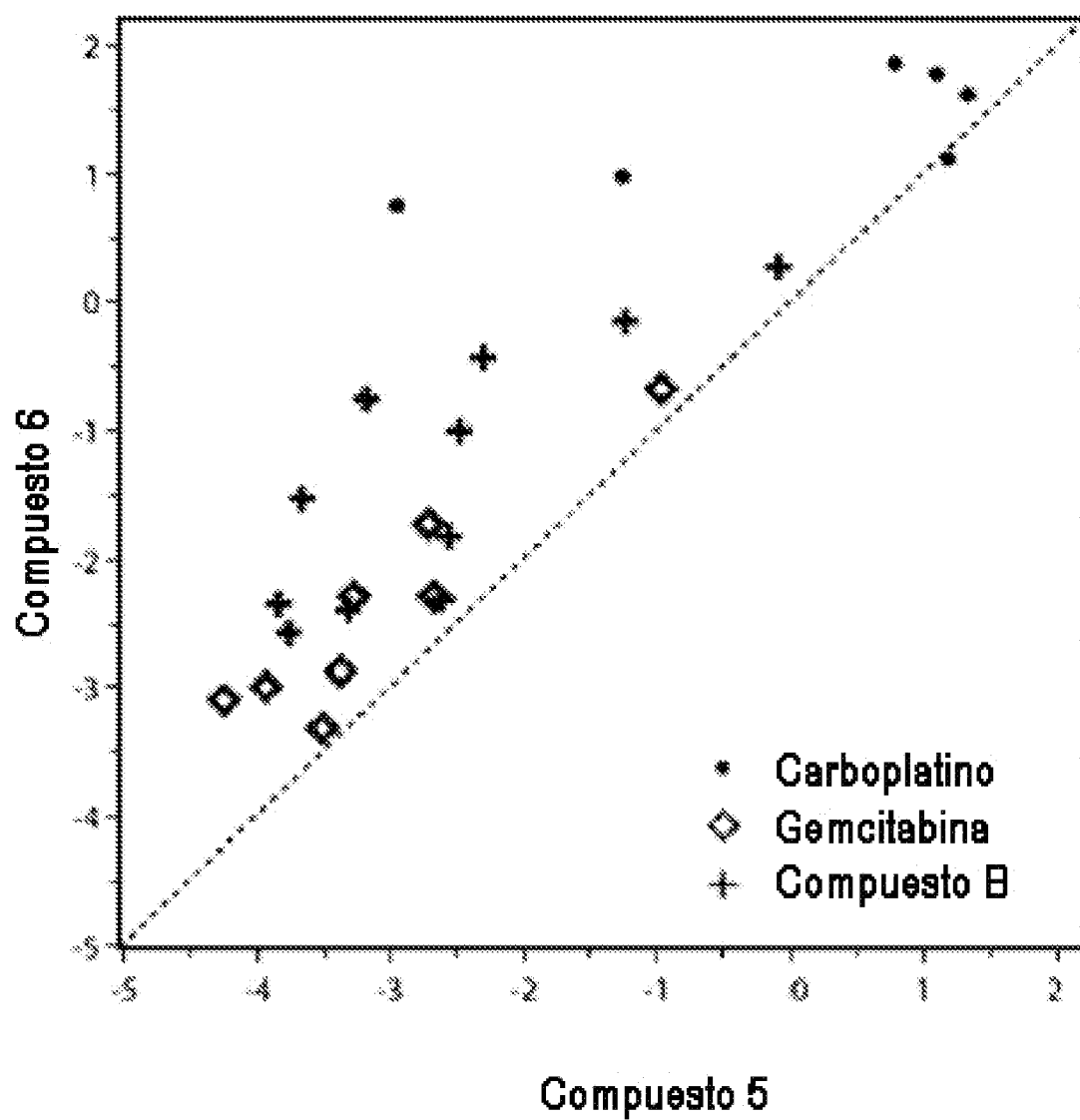
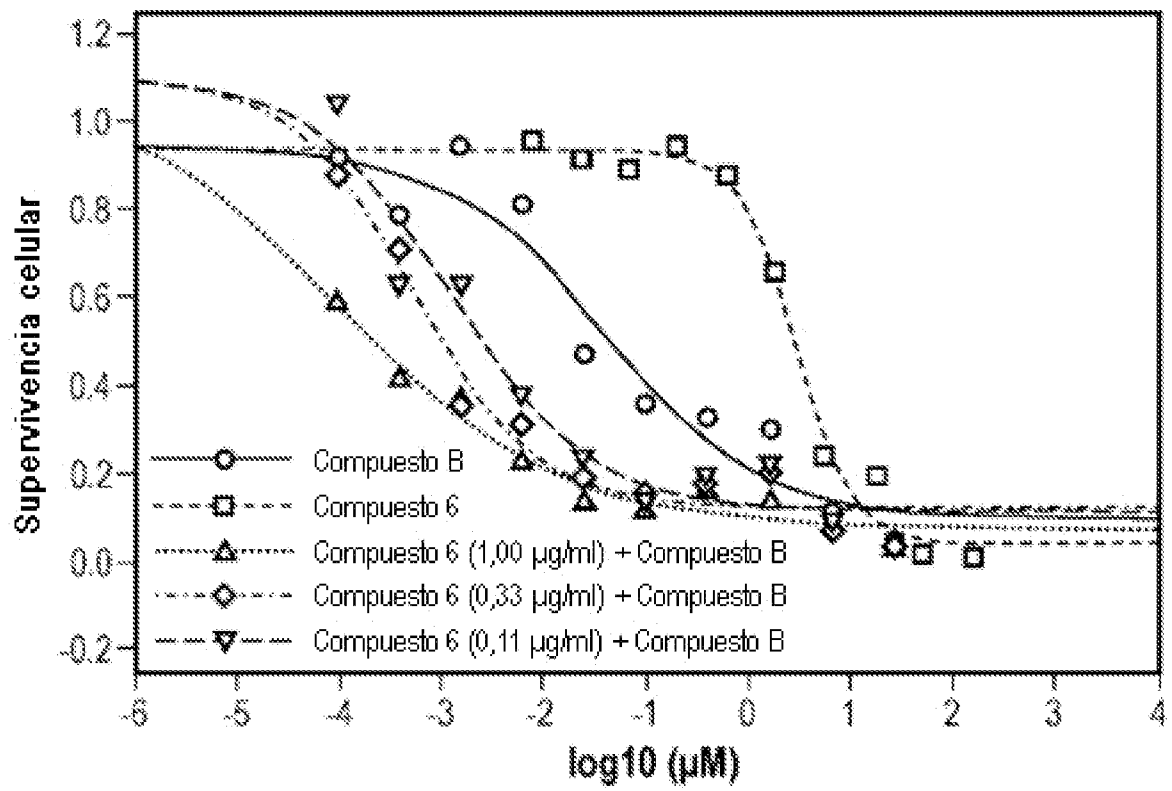
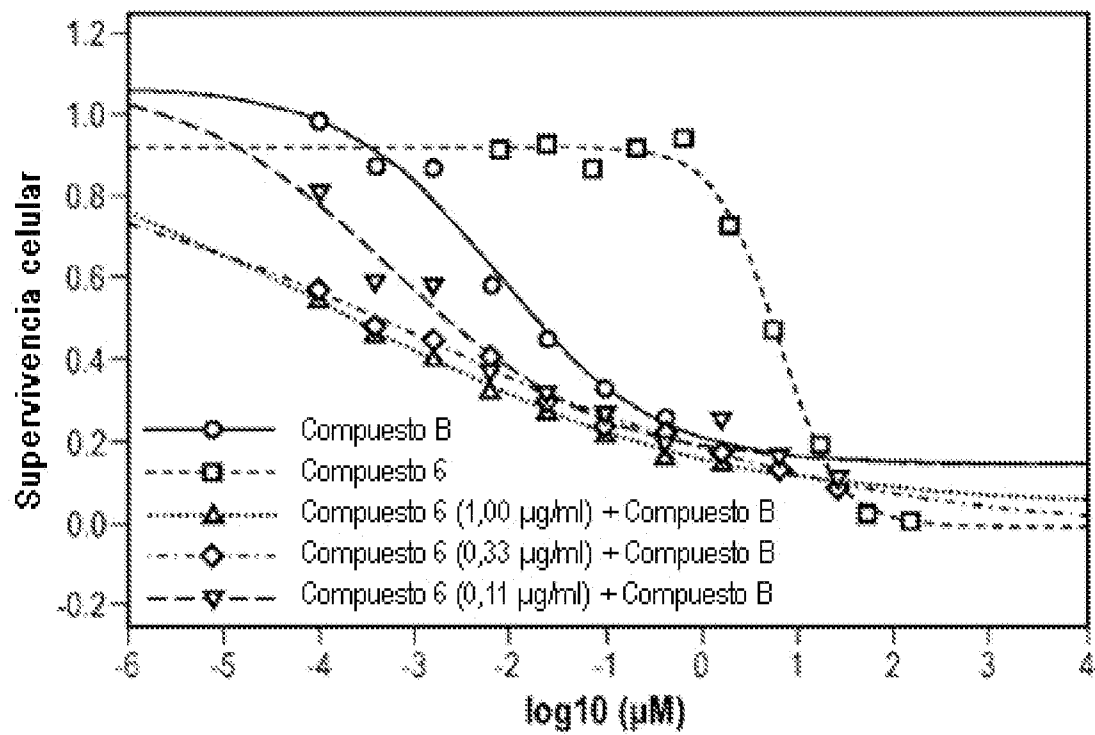
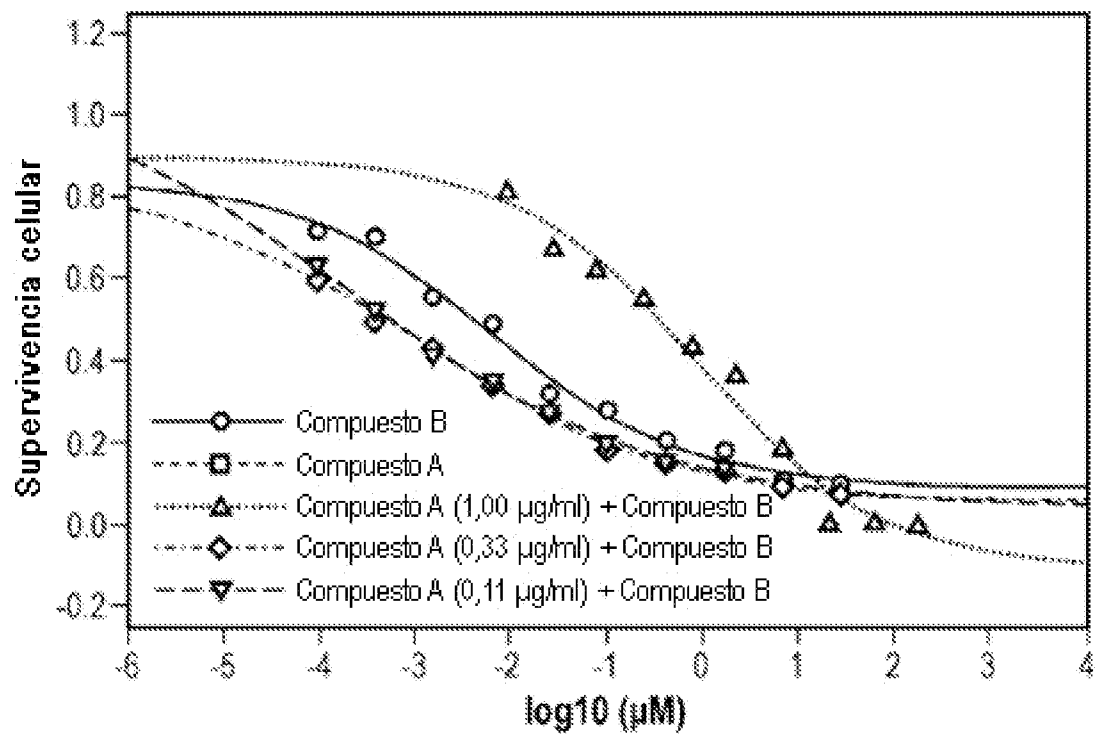


Fig. 14B

**Fig. 15**

**Fig. 16A****Fig. 16B**

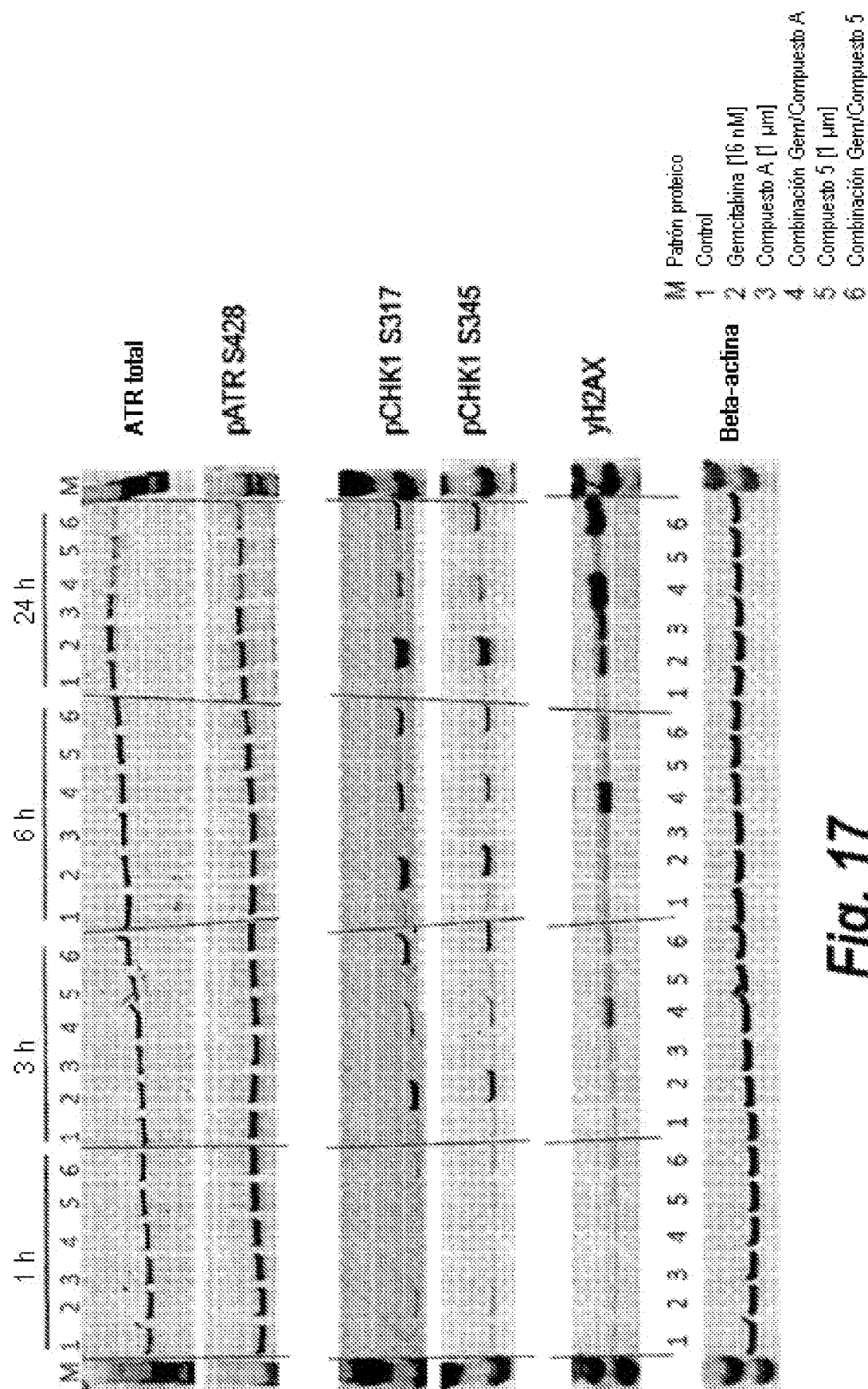


Fig. 17

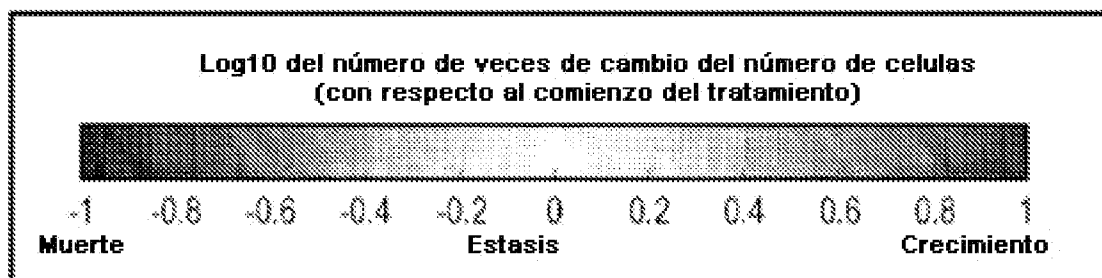
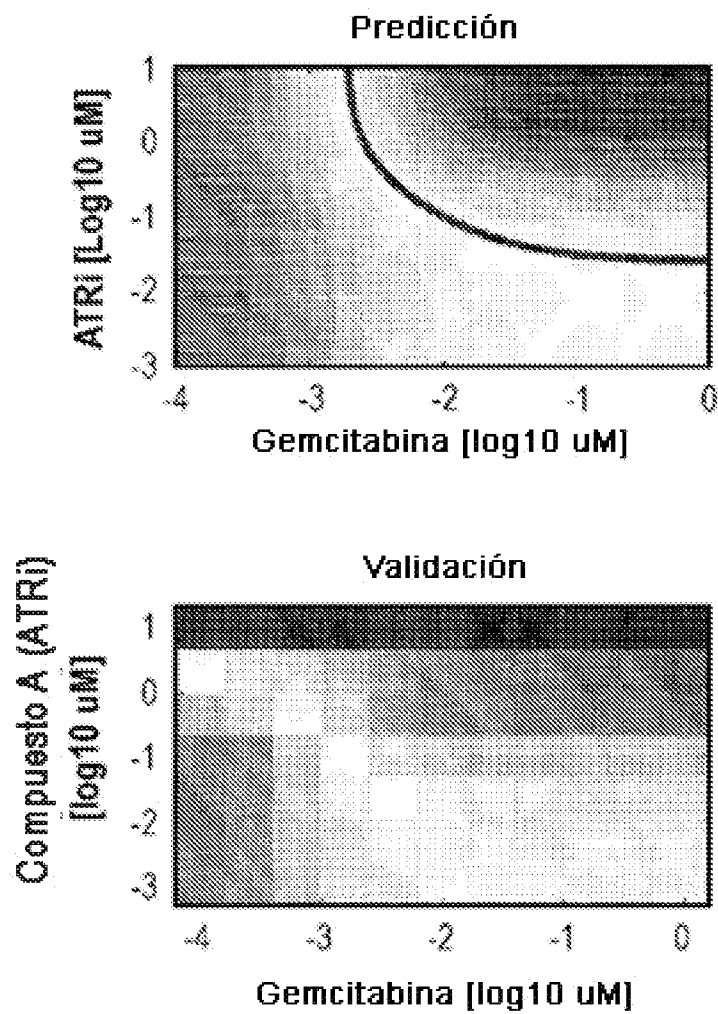
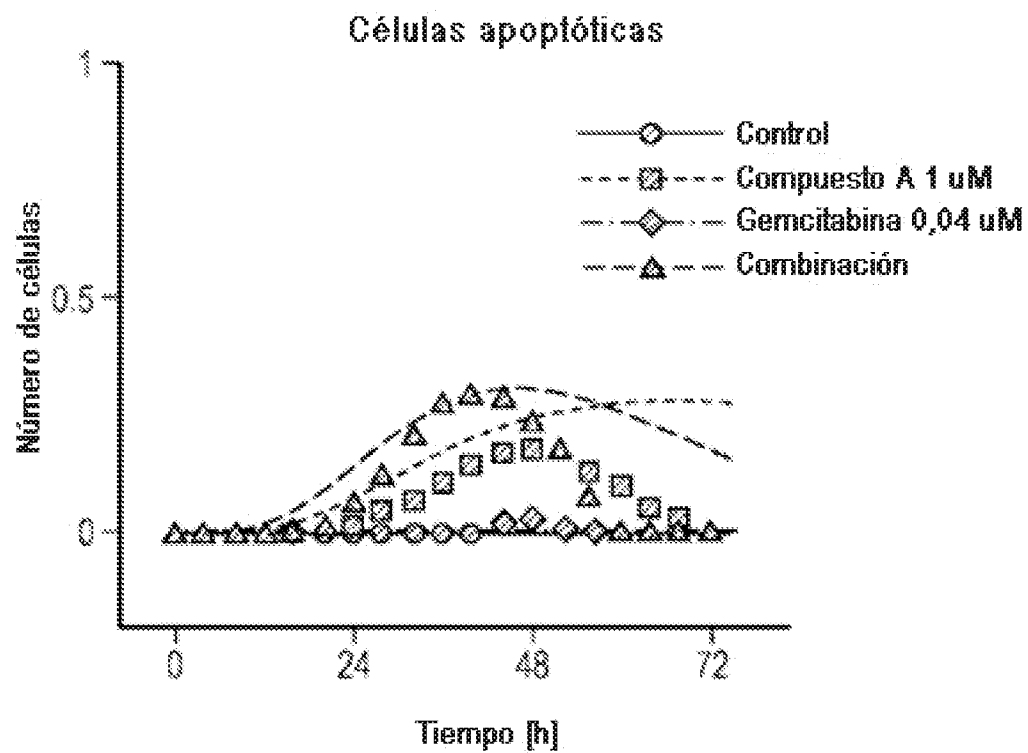
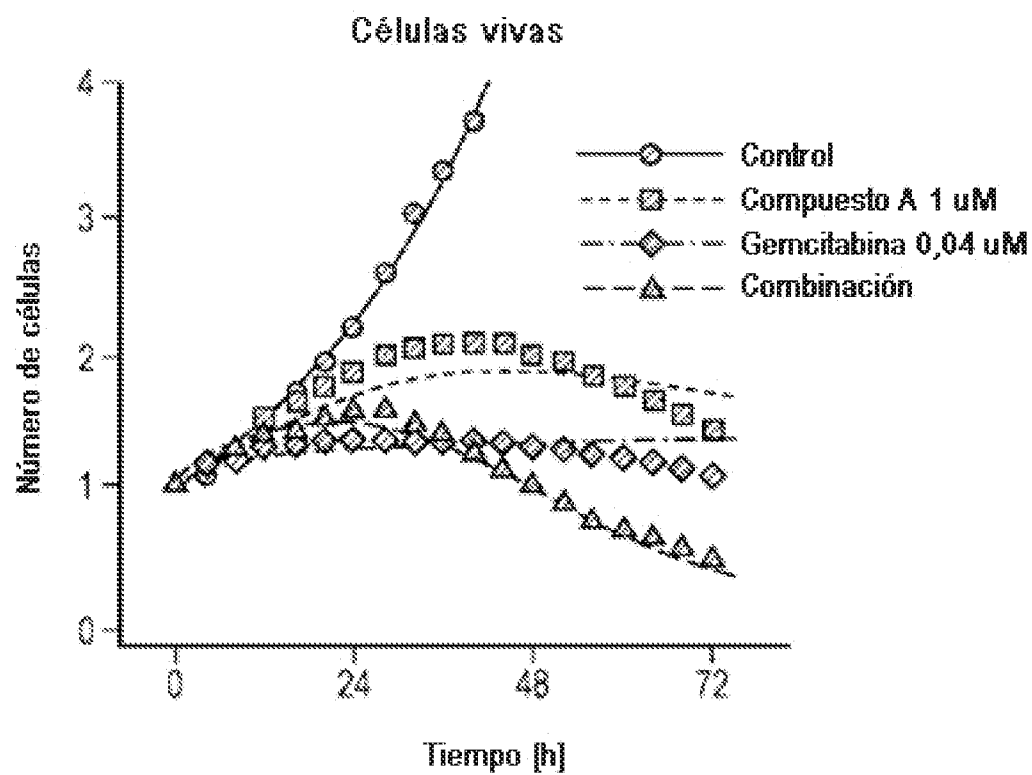


Fig. 18A

**Fig. 18B**

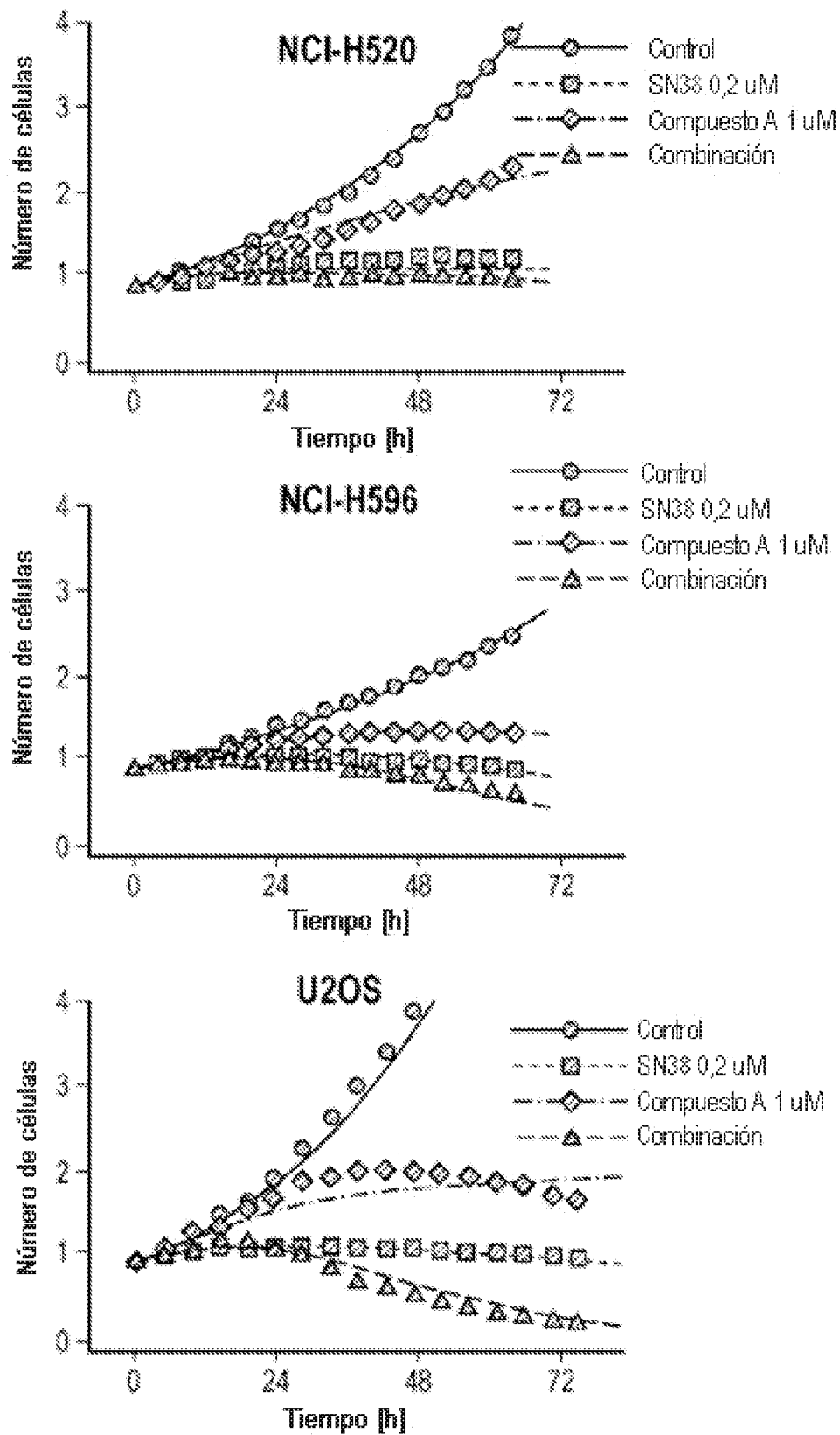


Fig. 19

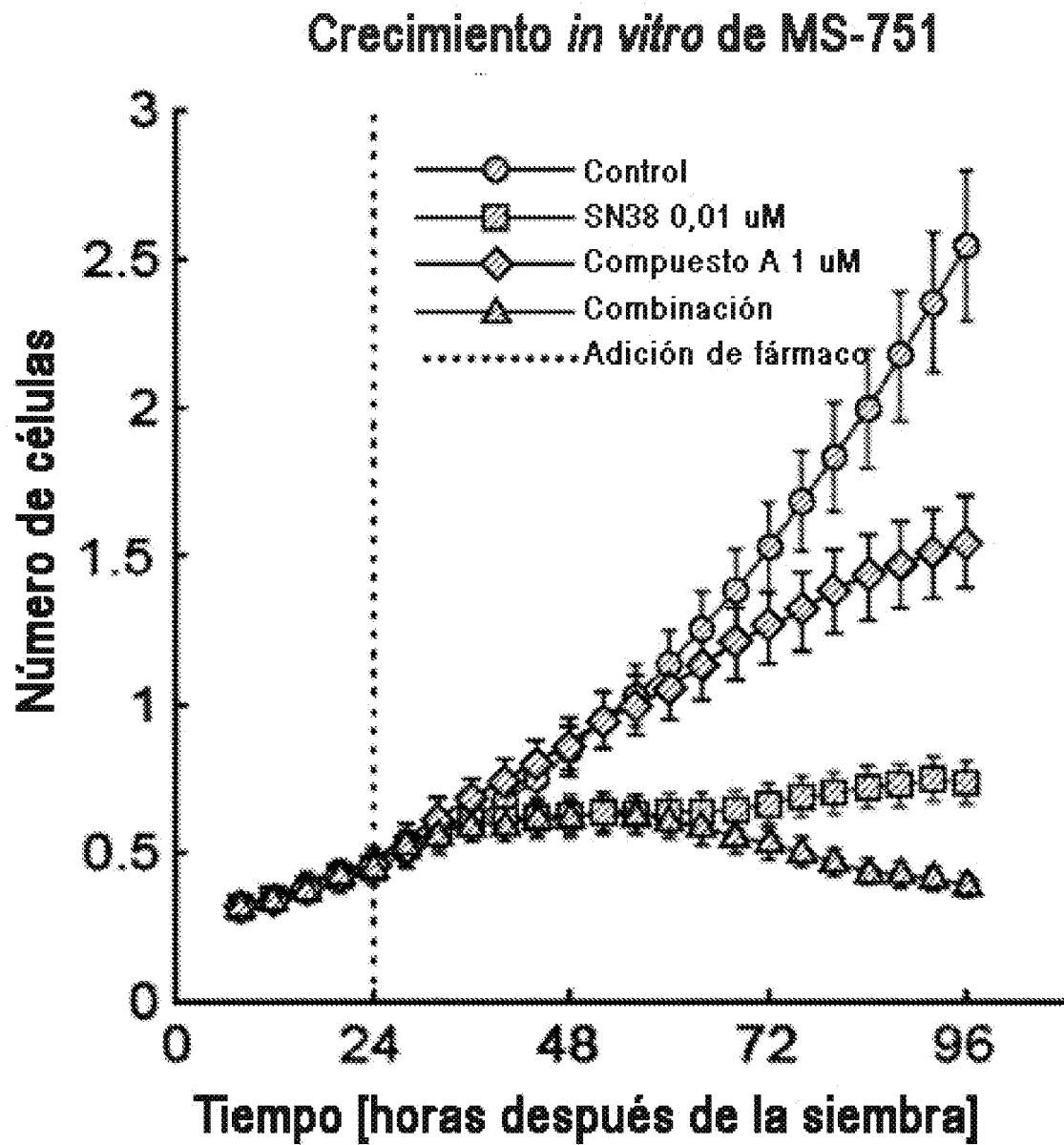
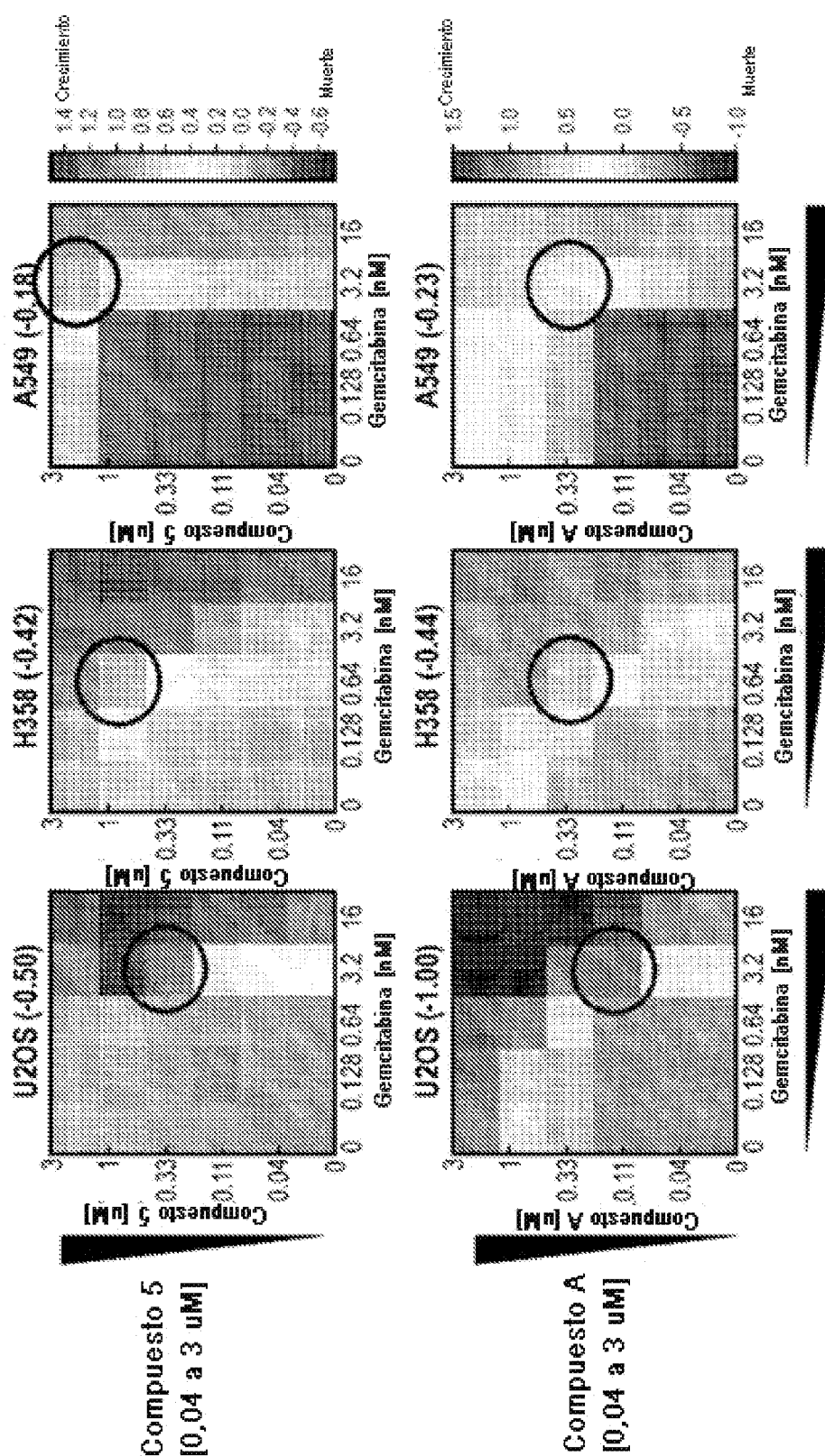


Fig. 20



Gemcitabina [0,128 a 16 nM]

Fig. 21A

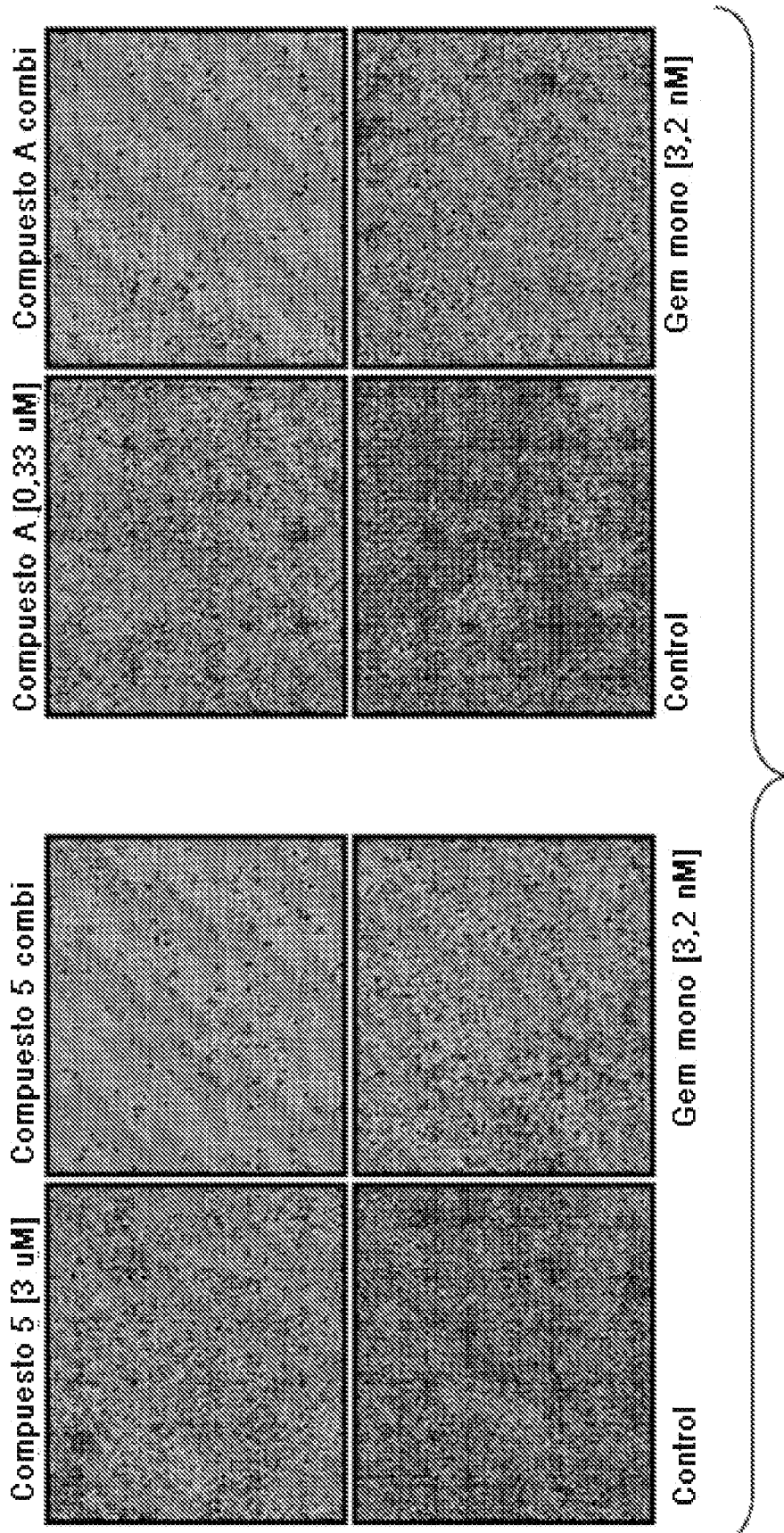


Fig. 21B

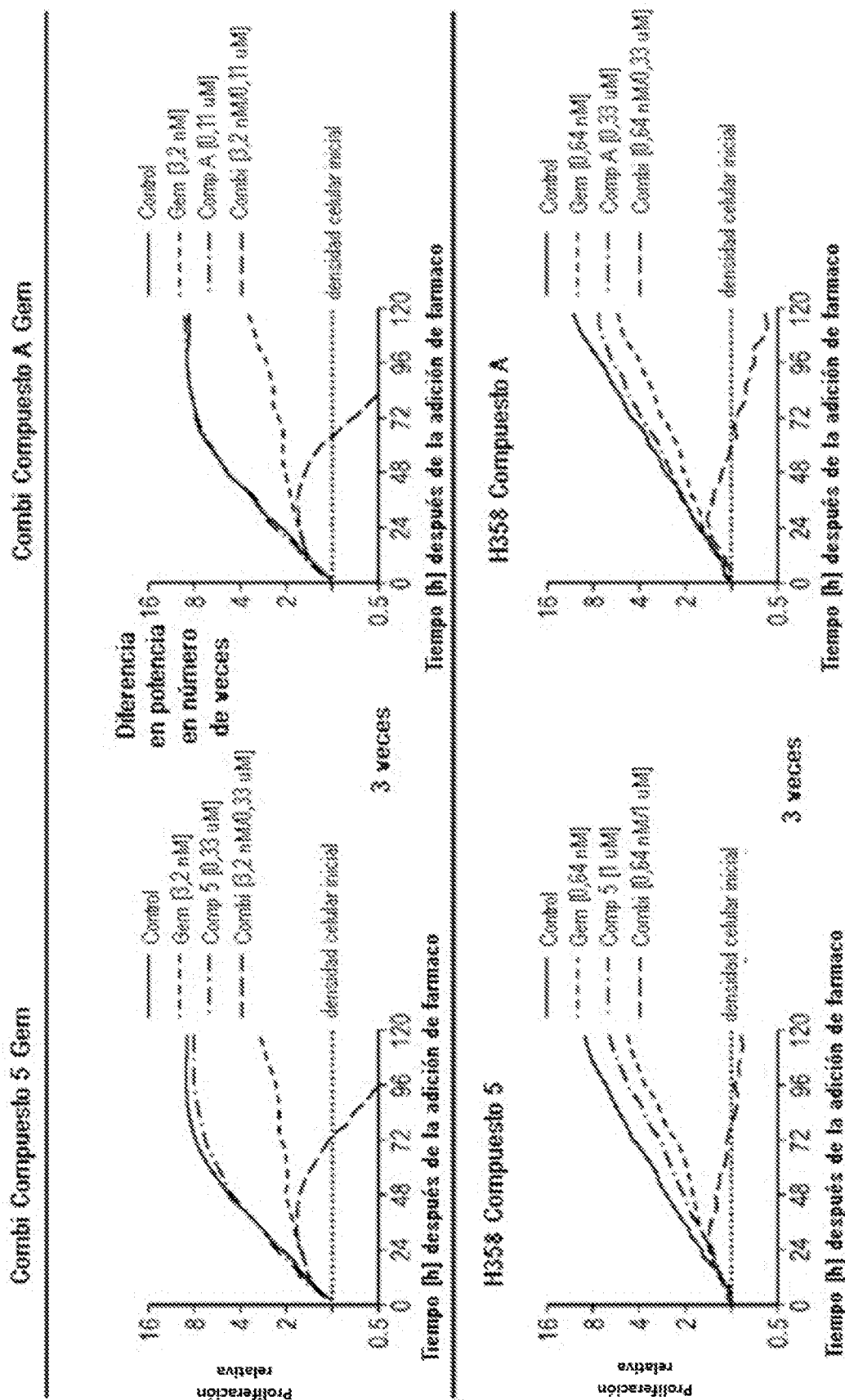


Fig. 21C

A549

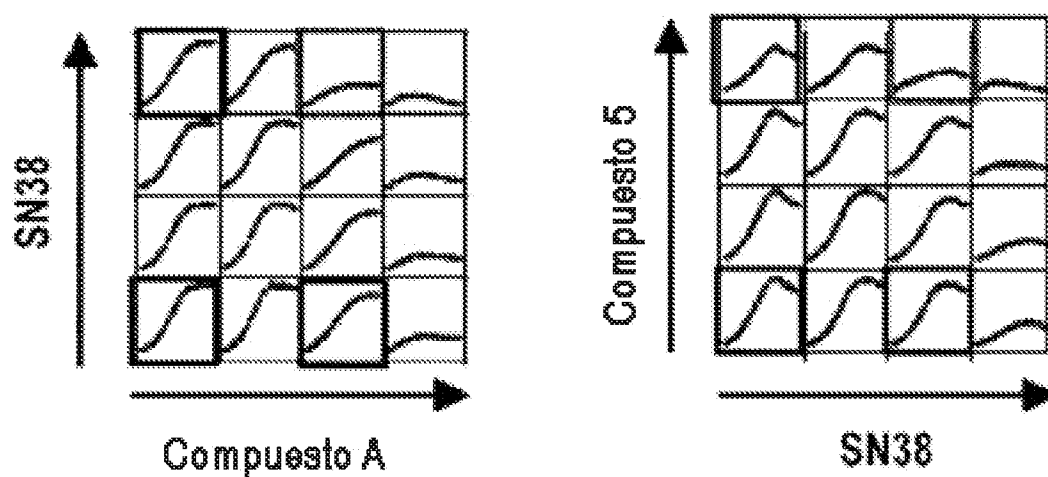


Fig. 22A

Células A549

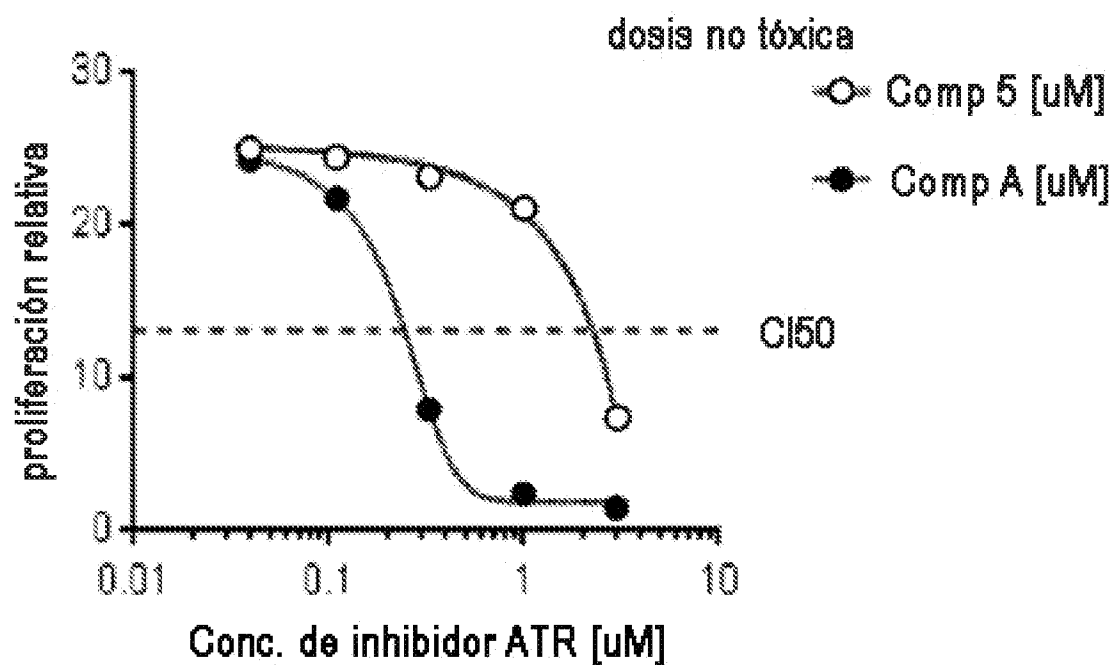


Fig. 22B

Concentración de gemcitabina fija [3,2 nM]

Diluciones en serie: concentración de ATRi: 3, 1, 0,11, 0,33, 0,004 μM

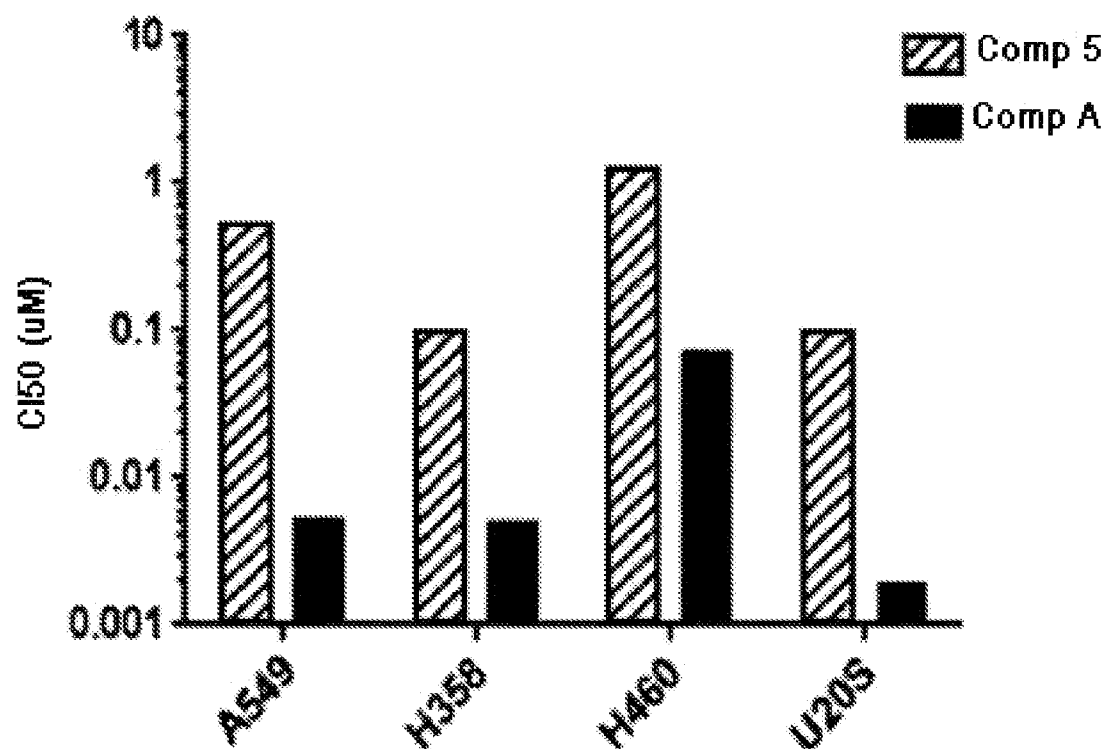


Fig. 23

Gemcitabina	Compuesto A	Compuesto 5
respondedor	A549, HCC827, H2170, H358, H460	A549, HCC827, H2170, H358, H460
no respondedor	H2170, H358, H596	H2170, H358, H596

SN38	Compuesto A	Compuesto 5
respondedor	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6
no respondedor	Calu-6, H1993, H23, H596	Calu-6, H1993, H23, H596

Fig. 24

Quinasa	ATR Cl ₅₀ (nM)	ATM Cl 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, RU, sistema sin células

* KI < 0.2nM

** KI = 6 nM

Cl50 = 120nM

*** interrumpido

Fig. 25A

Quinasa	Compuesto 5 Cl ₅₀ (nM)	Compuesto A Cl ₅₀ (nM)
GSK3 α	206	126
GSK3 β	876	210
MLK1	74	59
MLK2	91	76

EuroFin, RU, sistema sin células

Fig. 25B

Células A549

Análisis basado en inmunotransferencia Western de inhibición de la fosforilación de CHK1 S345 por ATRi (dosis y transcurso temporal)

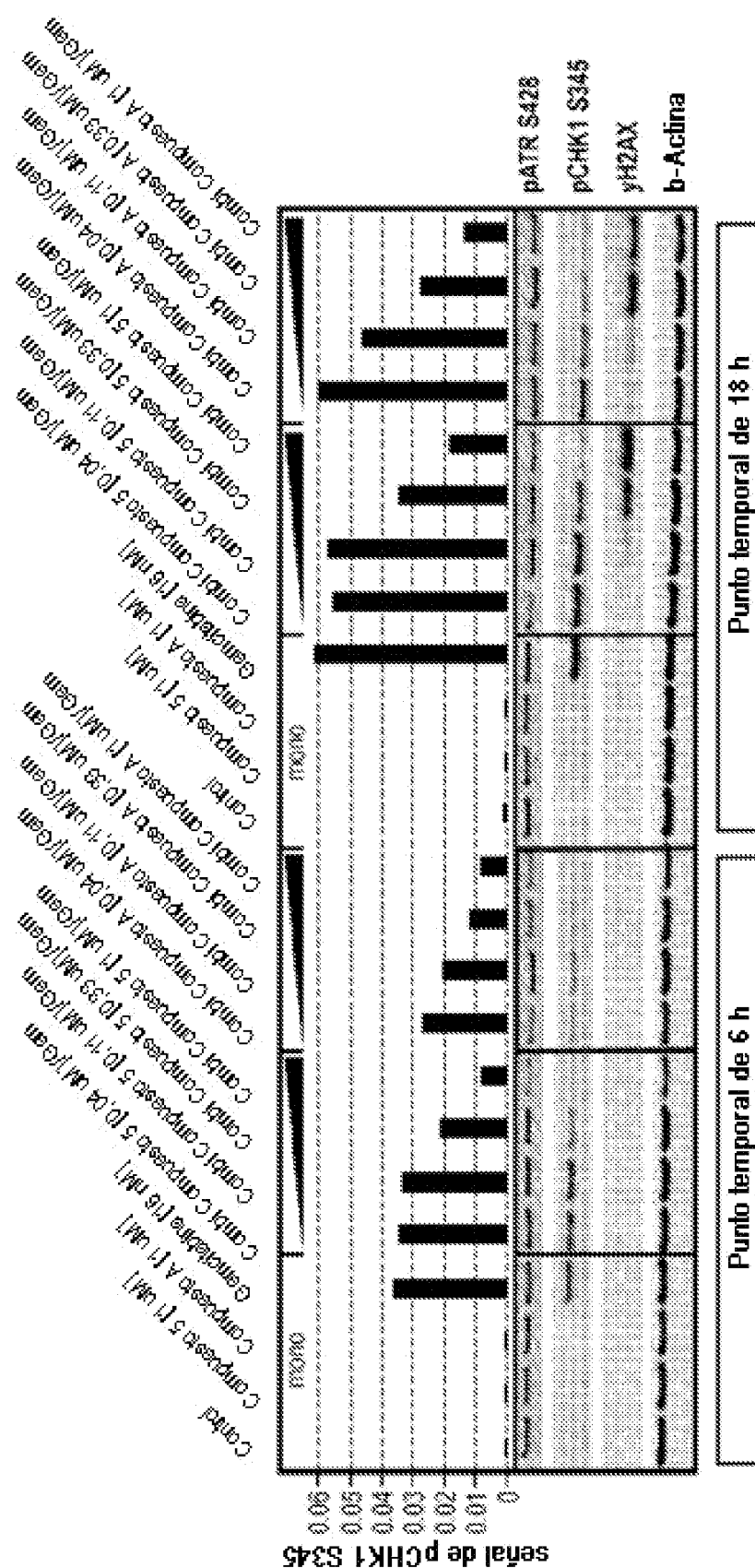


Fig. 26A

CI50 de inhibición de la fosforilación de CHK1 S345

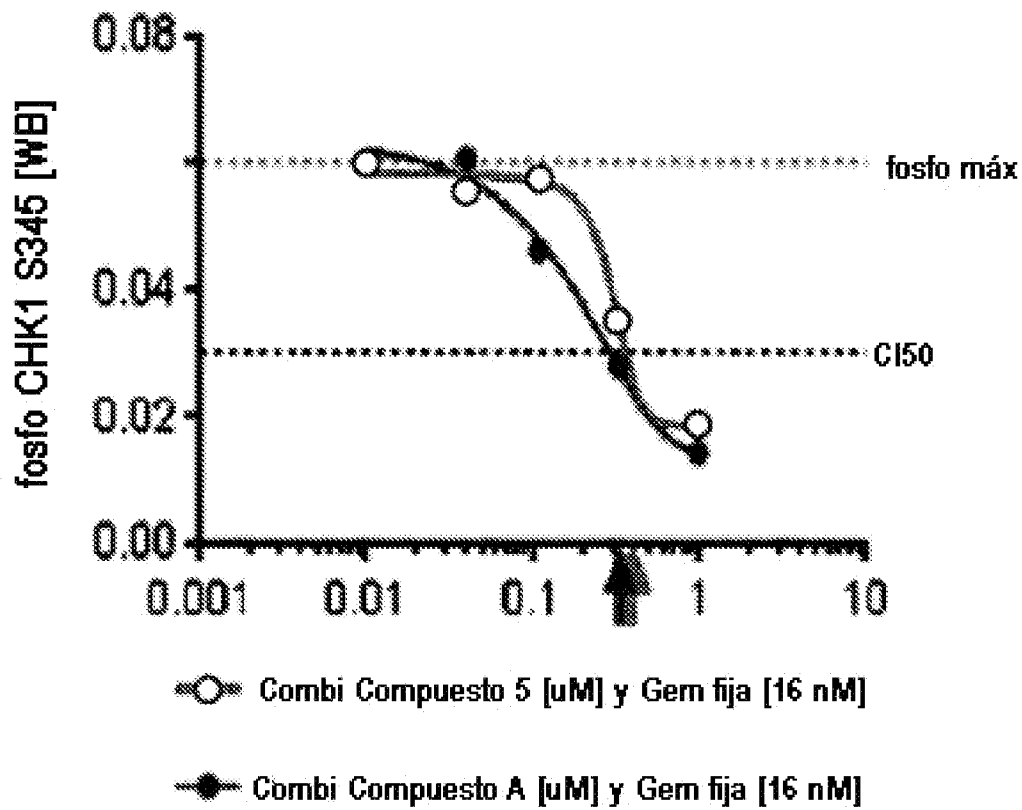
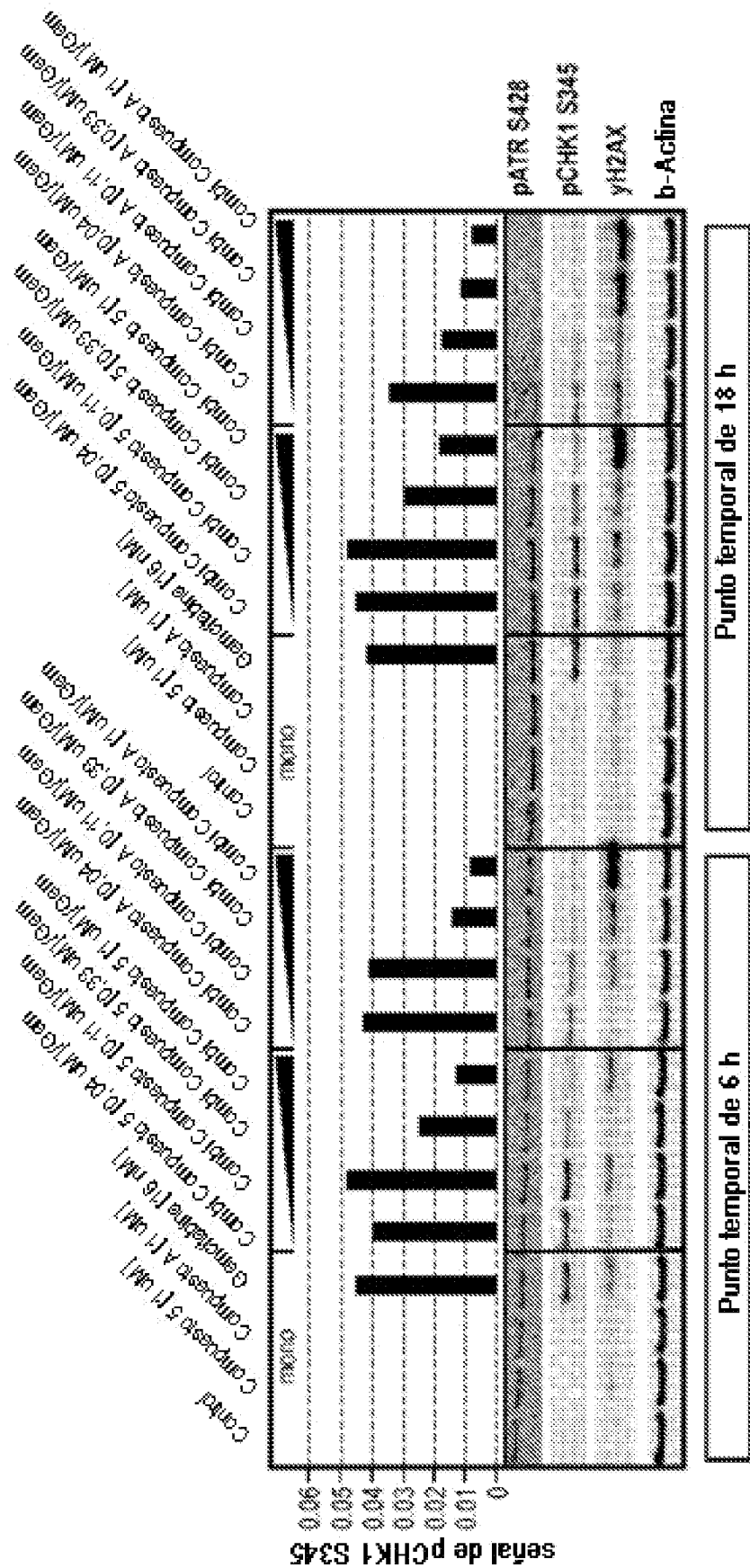


Fig. 26B

Células H23

Análisis basado en inmunotransferencia Western de inhibición de la fosforilación de CHK1 S345 por ATRi (dosis y transcurso temporal)



CI50 de inhibición de la fosforilación de CHK1 S345

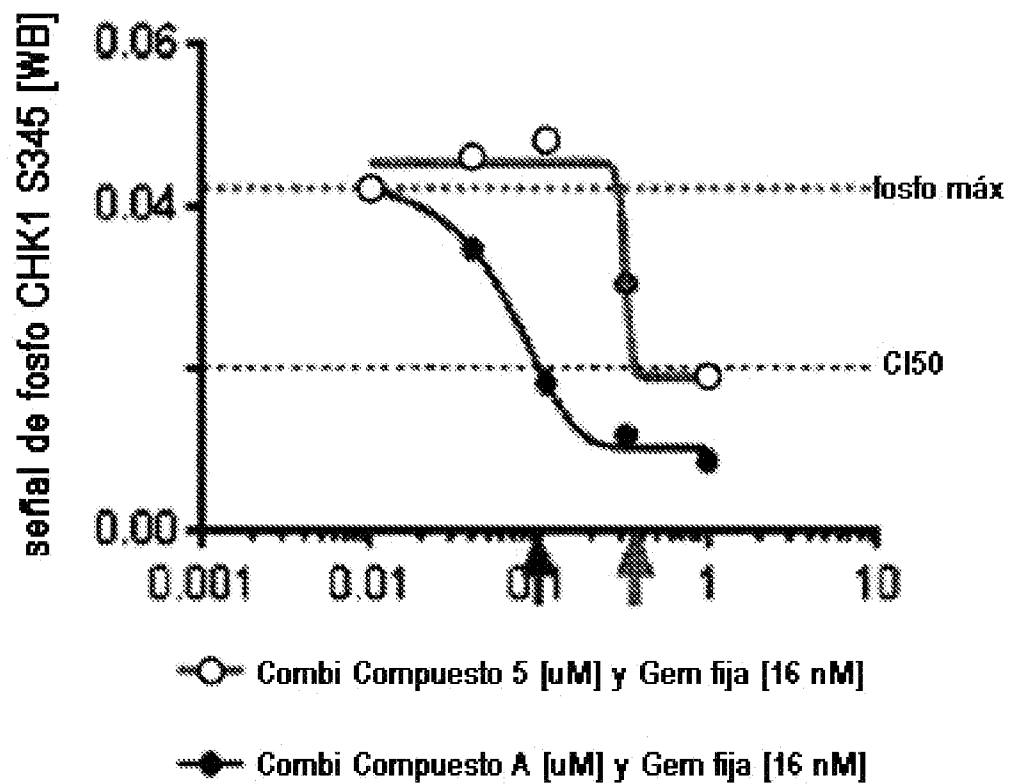


Fig. 26D

Células DMS-114

Punto temporal de 6 h

Punto temporal de 18 h

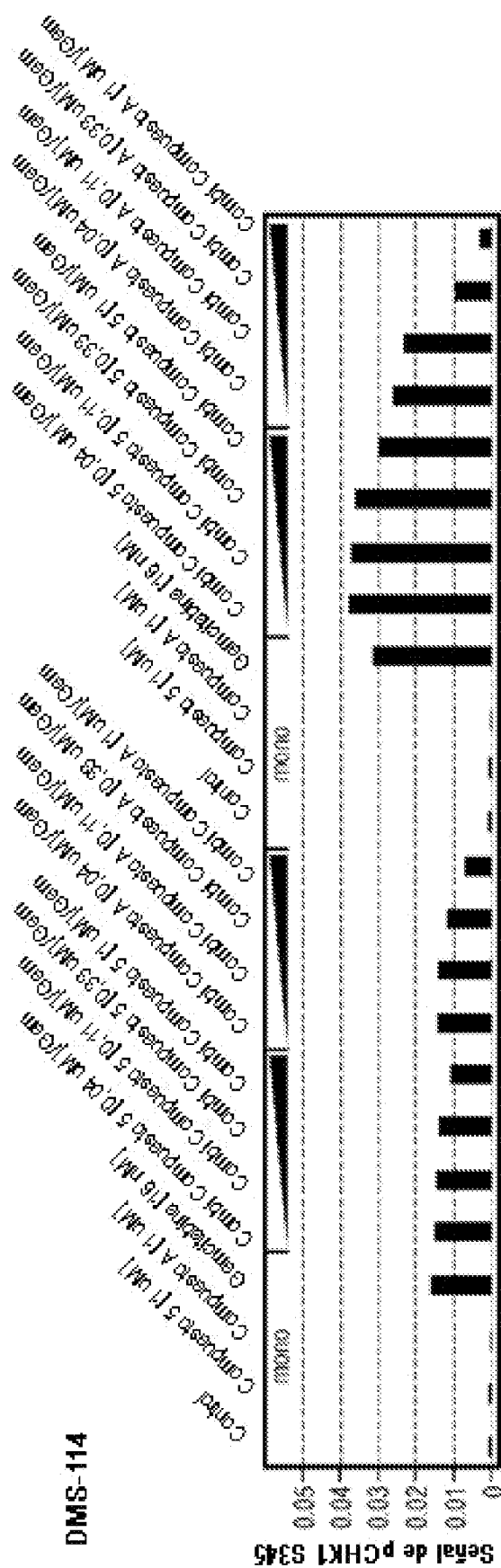
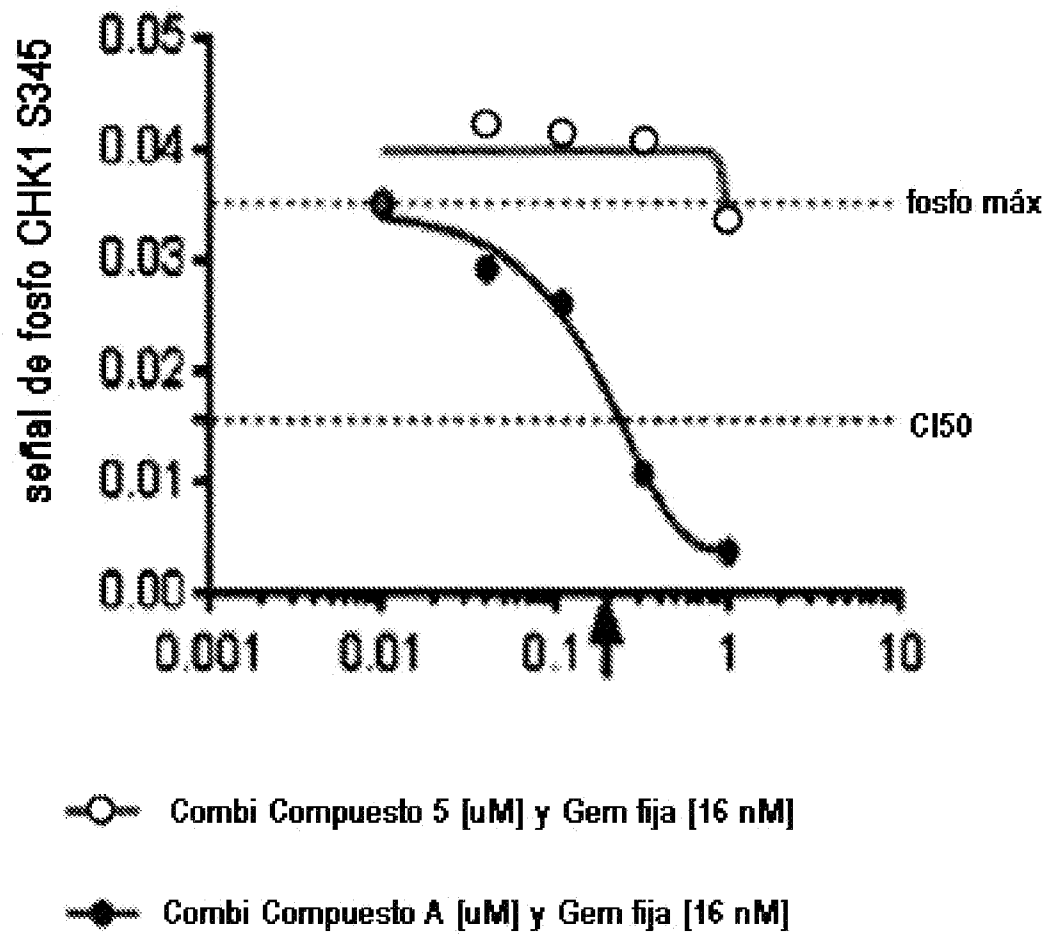
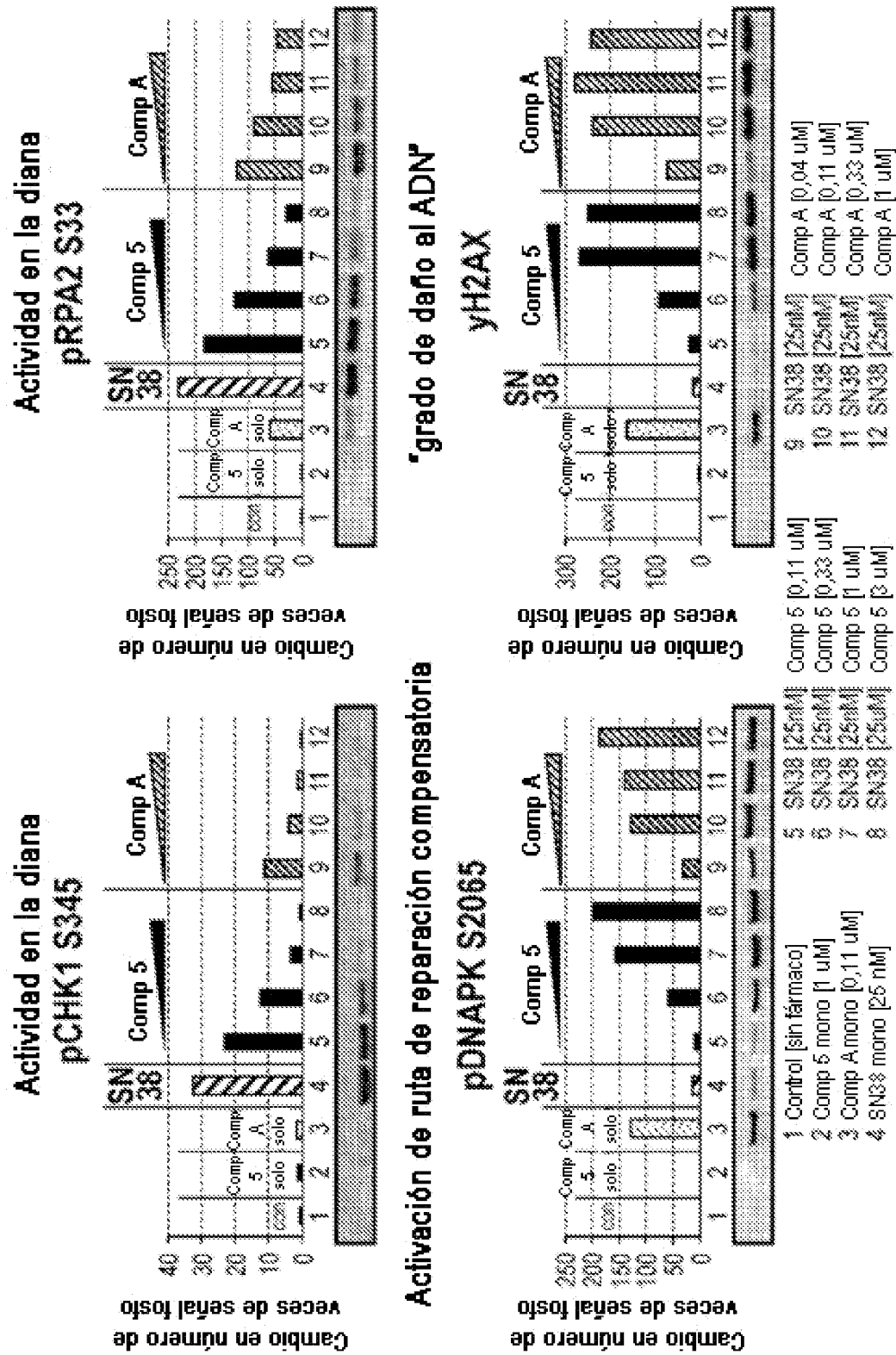


Fig. 26E

Células DMS114**Fig. 26F**



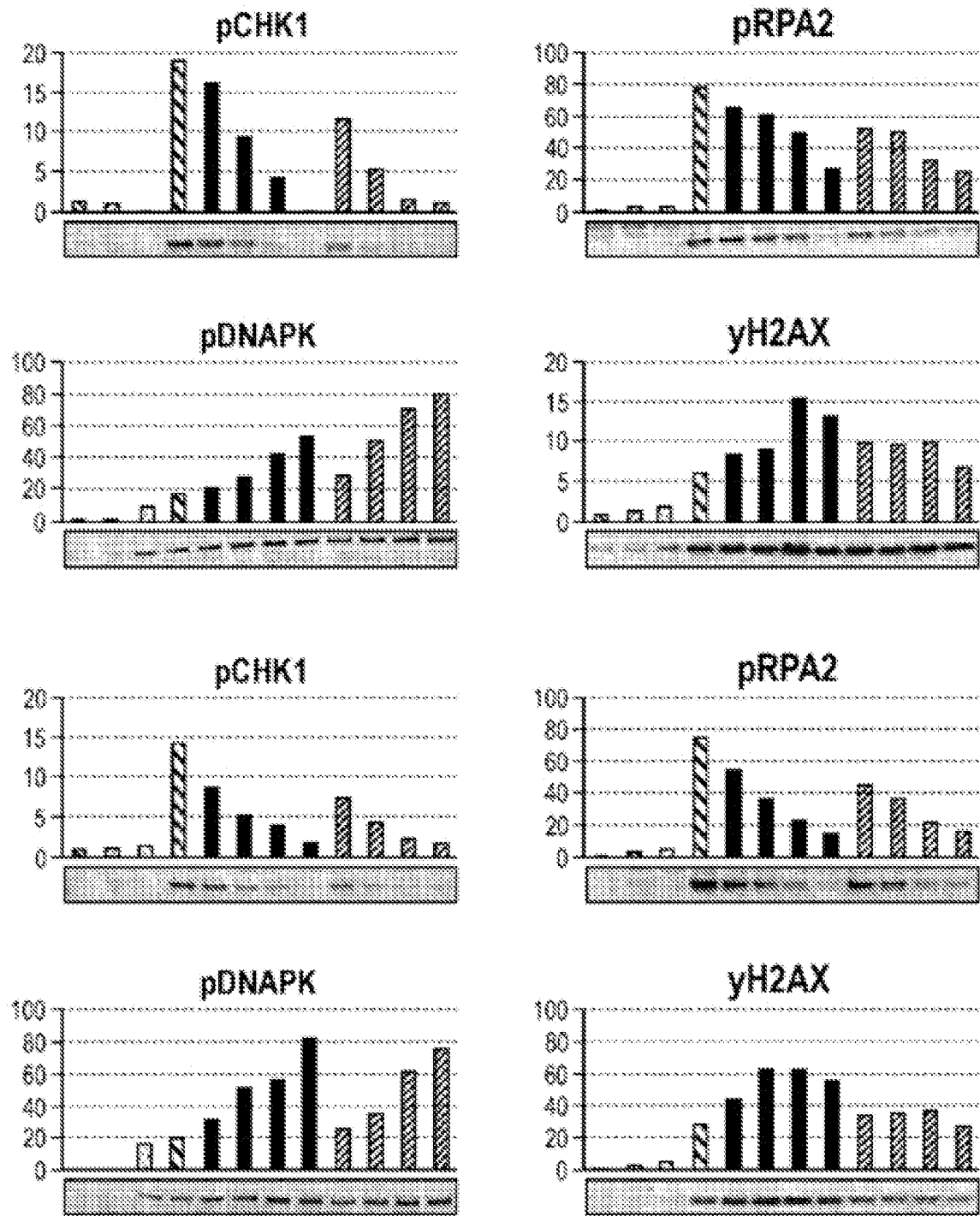
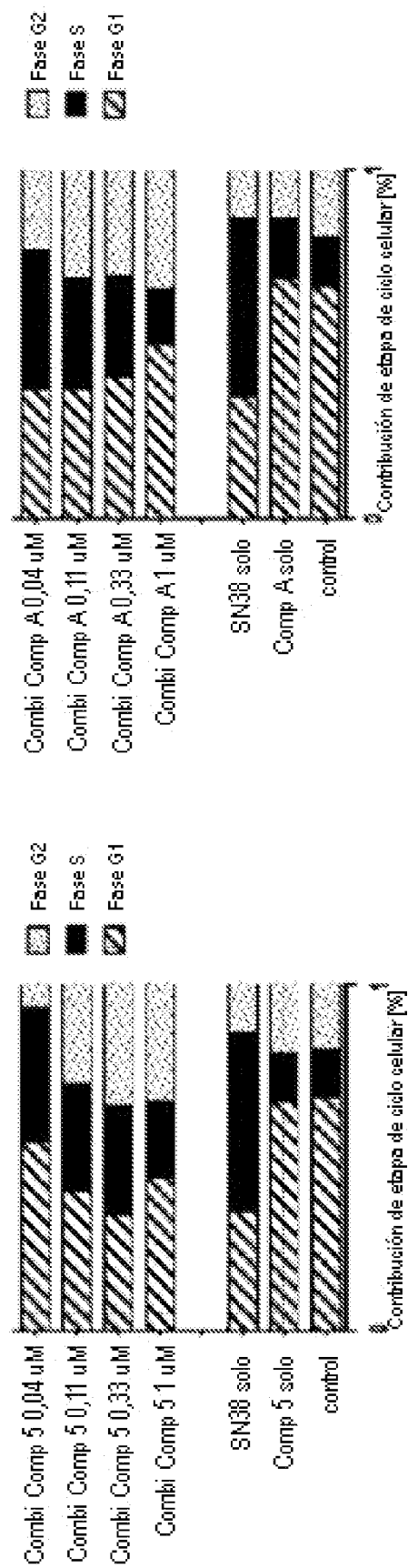


Fig. 27B



	G1	S	G2
Control	67%	14%	19%
Compuesto A solo [1 uM]	69%	17%	14%
SN38 solo [25 nM]	35%	51%	14%
SN38 [25 nM] Comp A [3 uM]	50%	16%	35%
SN38 [25 nM] Comp A [1 uM]	41%	29%	30%
SN38 [25 nM] Comp A [0,33 uM]	37%	32%	31%
SN38 [25 nM] Comp A [0,11 uM]	37%	40%	23%

	G1	S	G2
Control	67%	14%	19%
Compuesto 5 solo [1 uM]	66%	14%	20%
SN38 solo [25 nM]	35%	51%	14%
SN38 [25 nM] Comp 5 [3 uM]	44%	22%	34%
SN38 [25 nM] Comp 5 [1 uM]	34%	31%	35%
SN38 [25 nM] Comp 5 [0,33 uM]	40%	31%	29%
SN38 [25 nM] Comp 5 [0,11 uM]	54%	39%	7%

Fig. 28

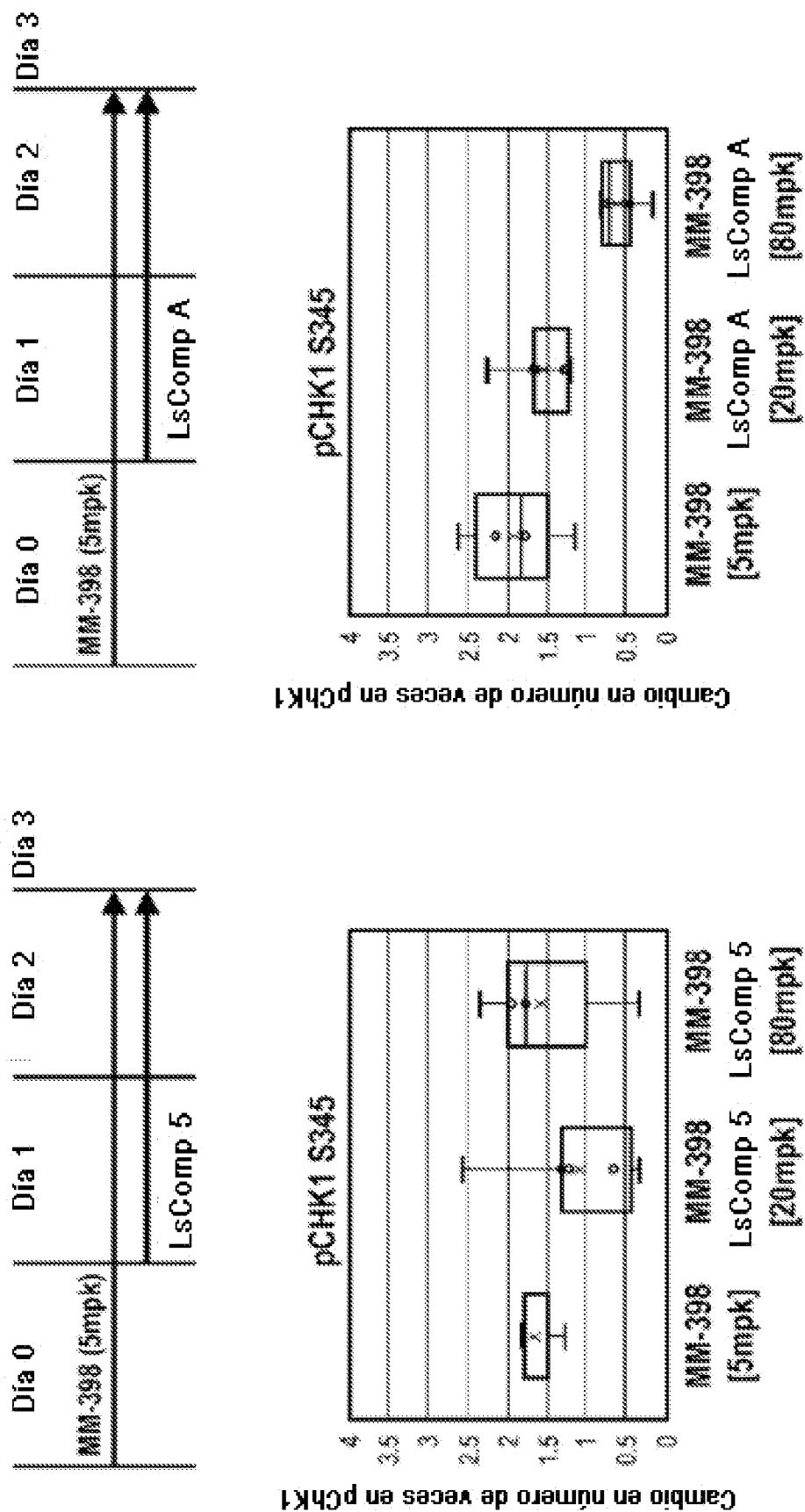


Fig. 29

SUM-149
fosfo-RPA2 S33 WB

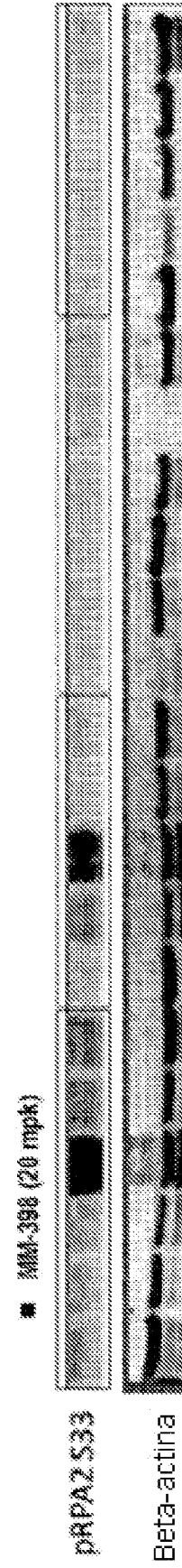
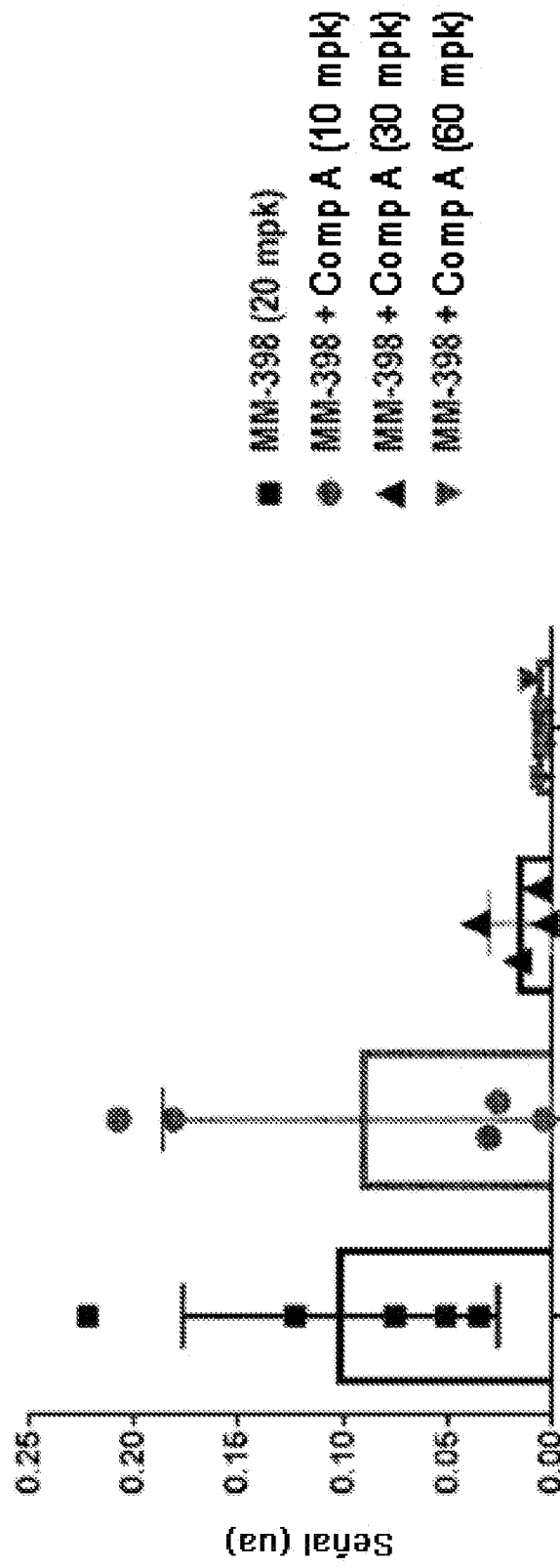


Fig. 30A

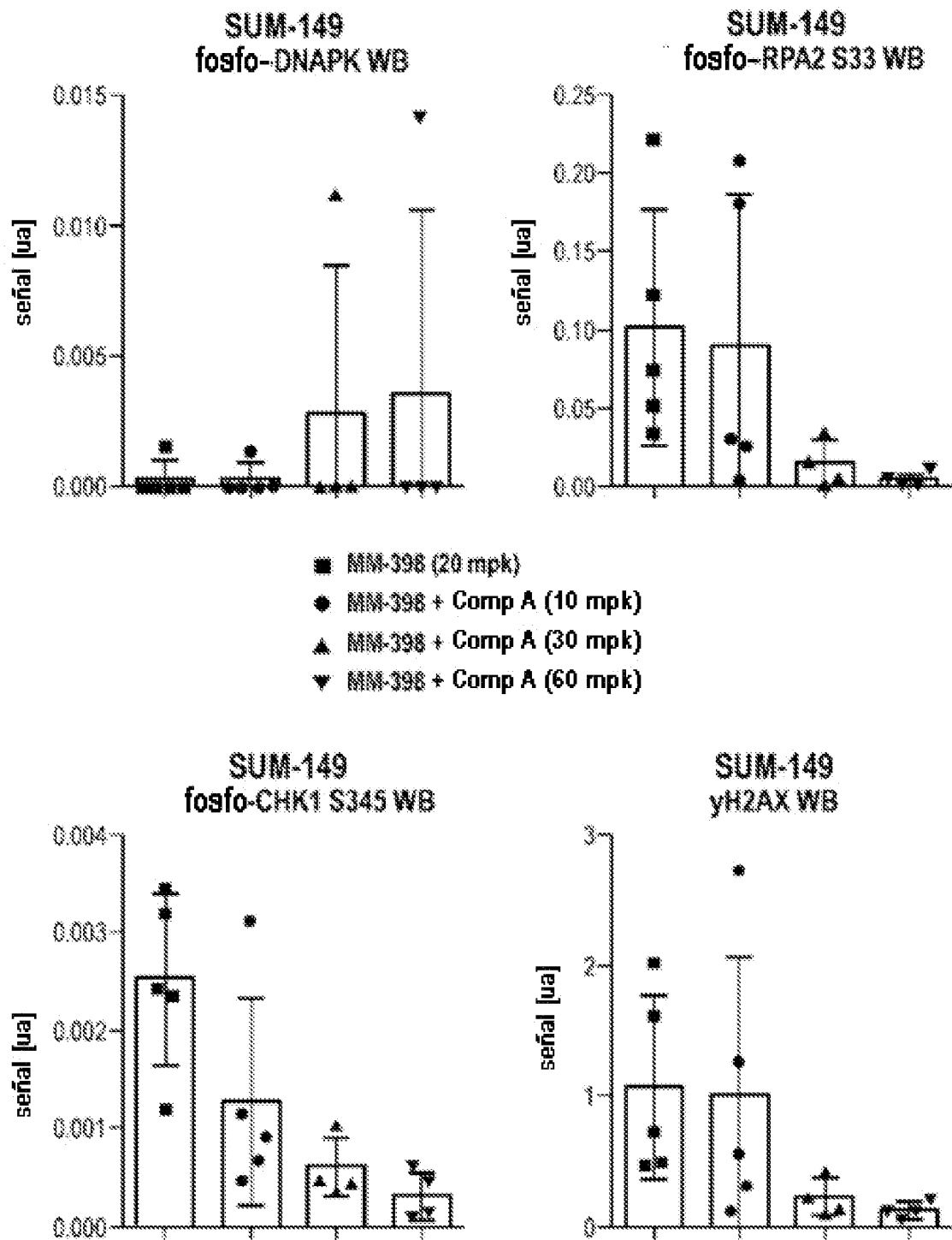


Fig. 30B

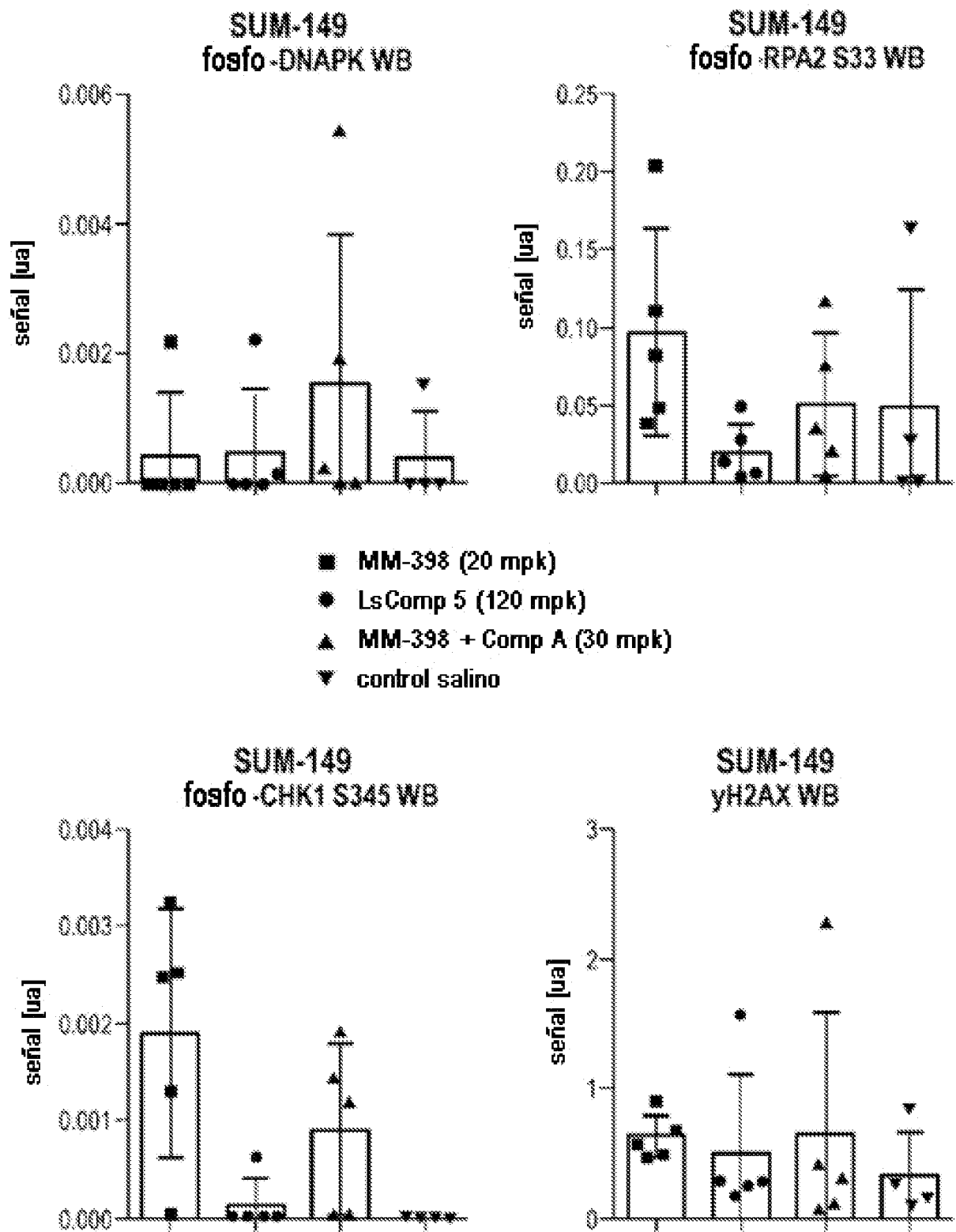


Fig. 30C

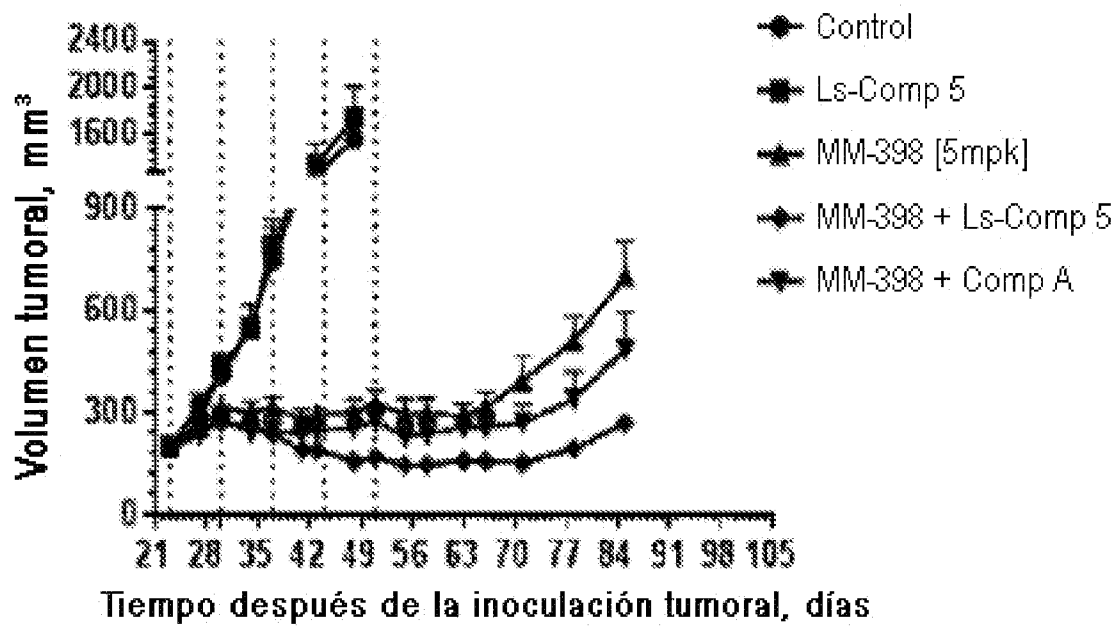


Fig. 31

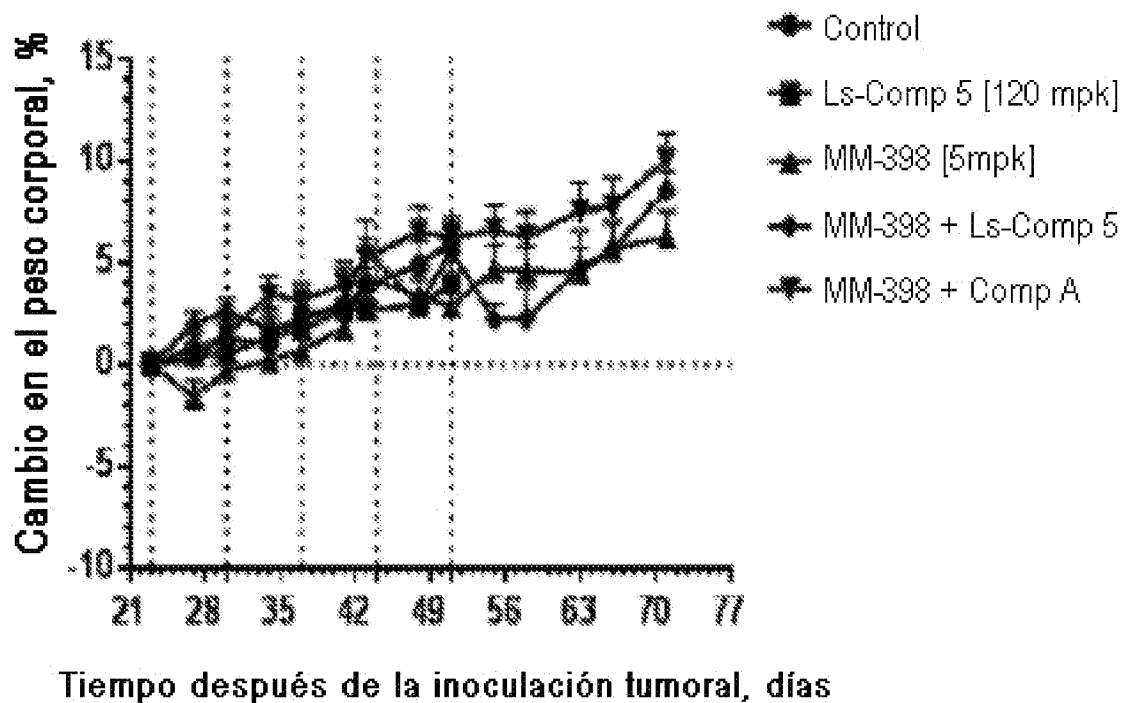


Fig. 32

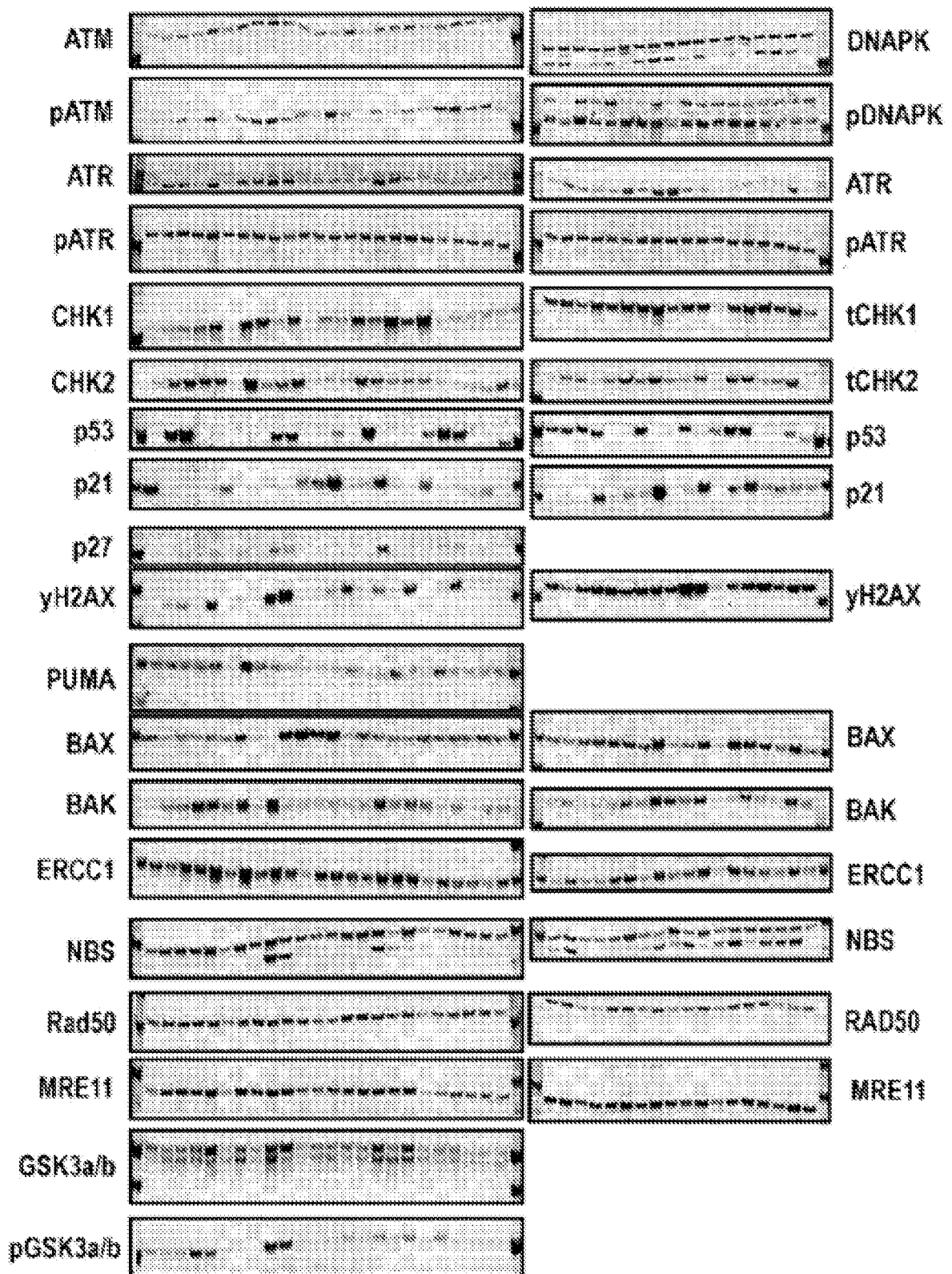


Fig. 33

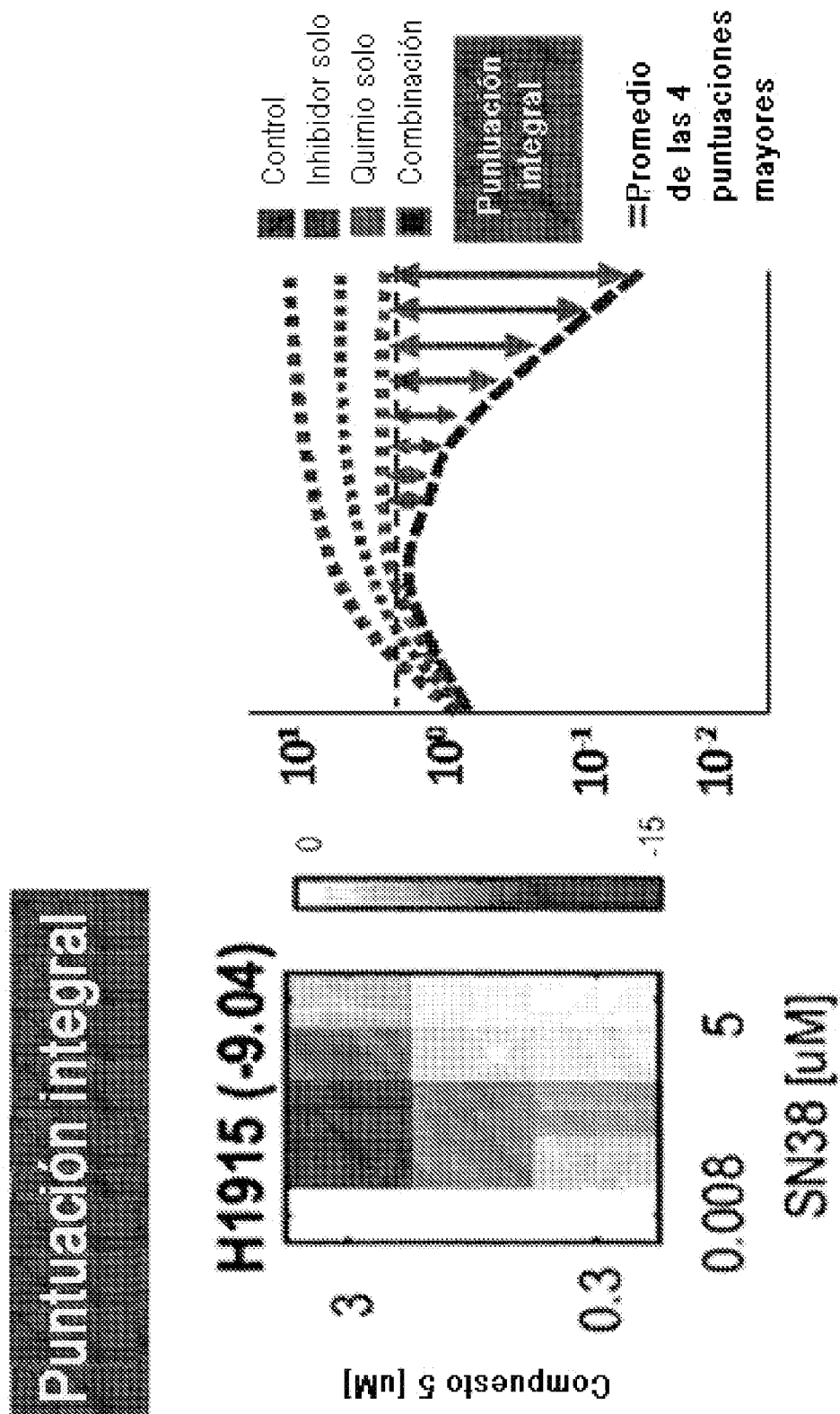


Fig. 34

Expresión de proteína MRE11 y correlación de puntuación integral de SN38
(Combinación ATRi/SN38, solo pulmón)

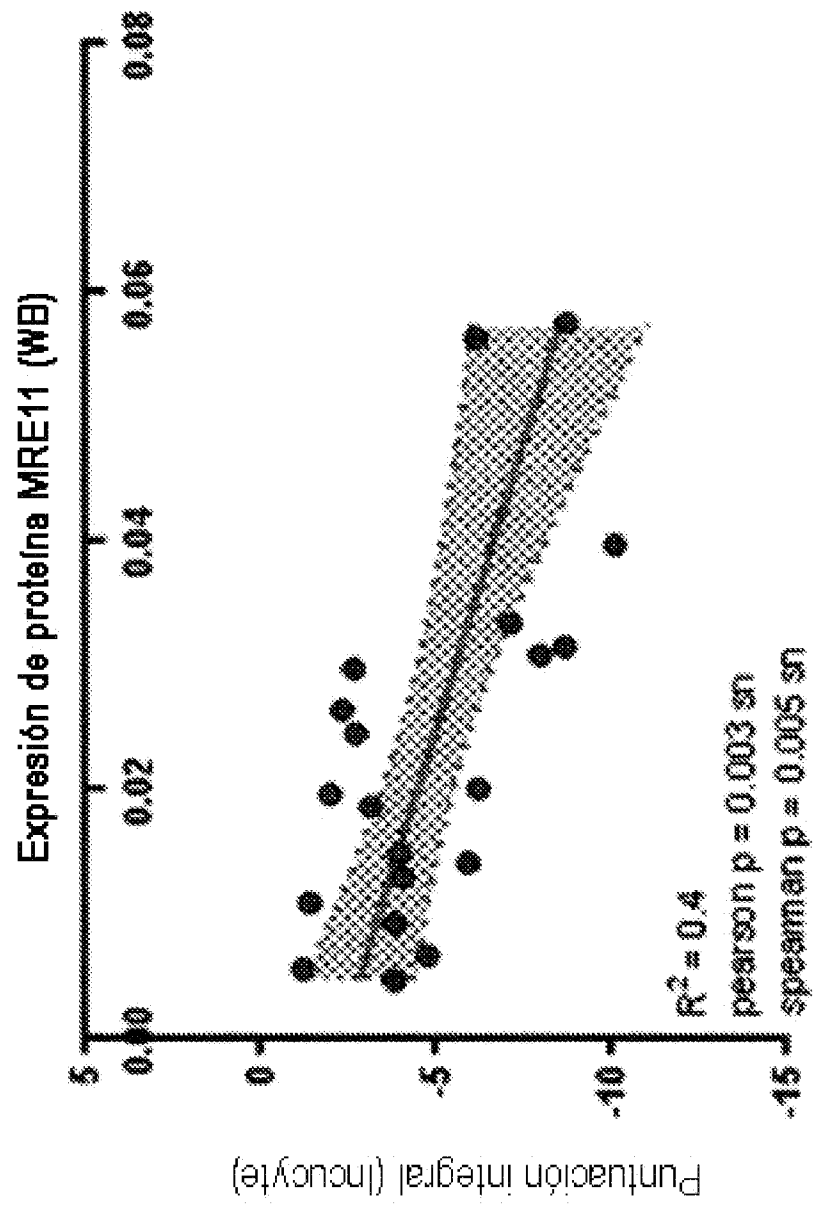


Fig. 35

Expresión de proteína ATM y correlación de puntuación integral de SN38
(Combinación ATRi/SN38, solo pulmón)

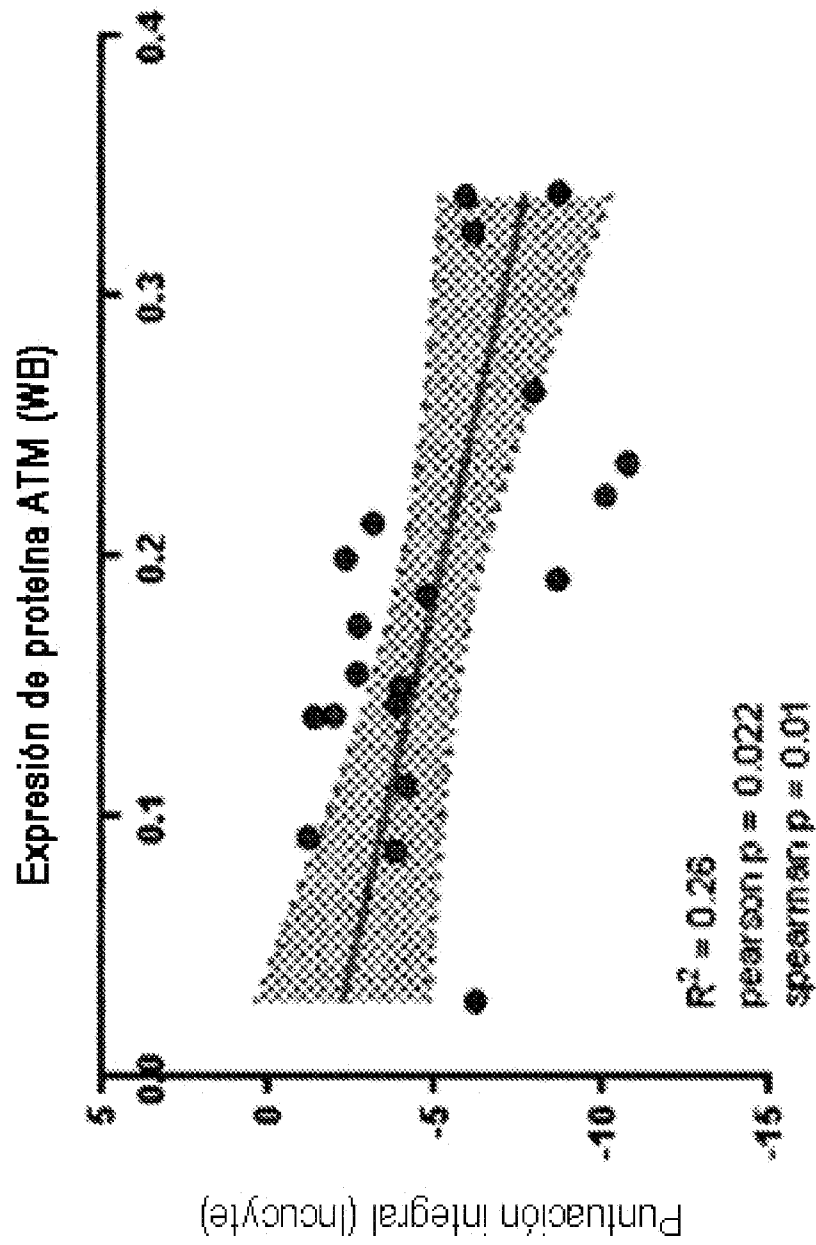


Fig. 36

Expresión de proteína NBS y correlación de puntuación integral de SN38
 (Combinación ATRi/SN38, comprometido con p53, solo pulmón)

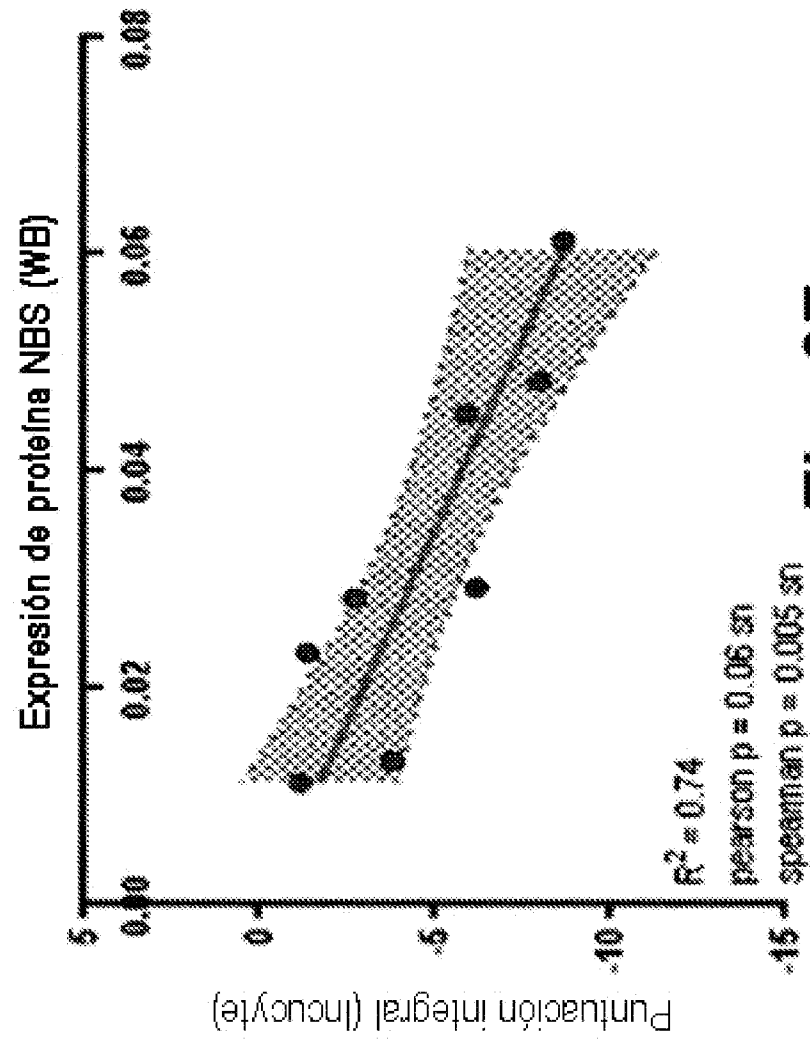


Fig. 37

Expresión de proteína MRE11 y correlación de puntuación integral de SN38
(Combinación ATR/SN38, comprometido con p53, solo pulmón)

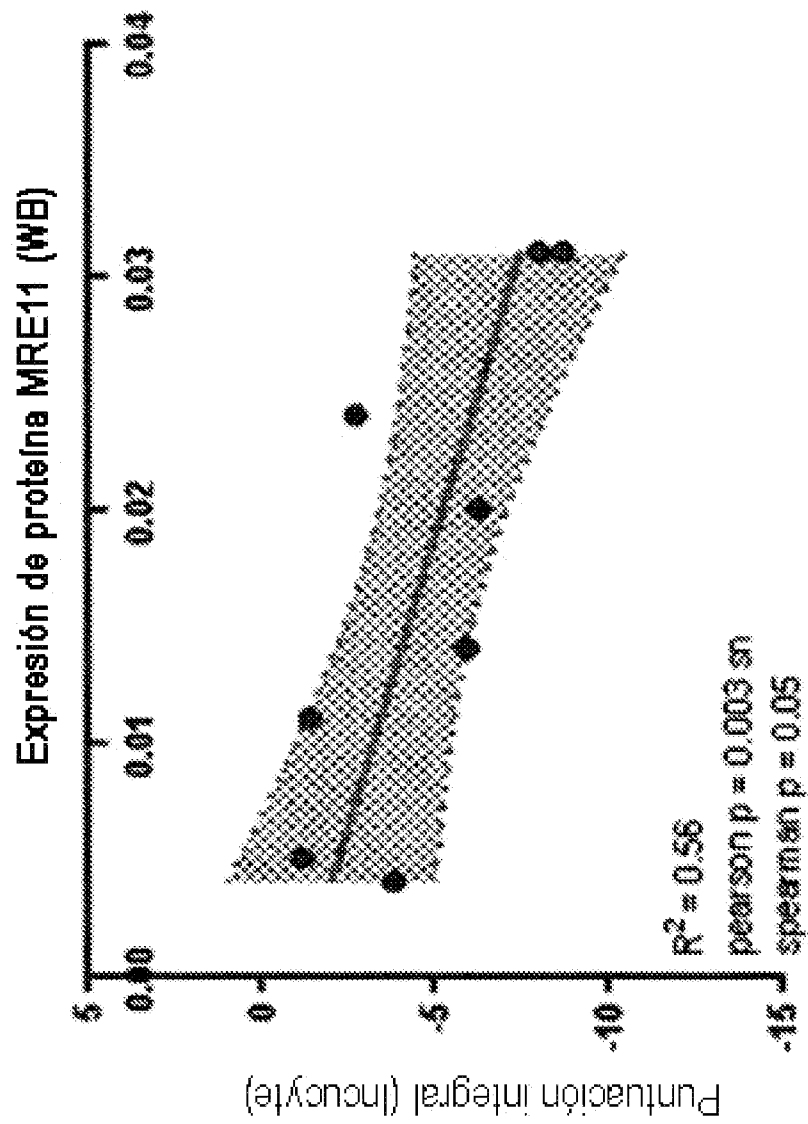


Fig. 38

Expresión de proteína MRE11 y correlación de puntuación integral de SN38
 (Combinación ATRi/SN38, comprometido con p53, solo pulmón)

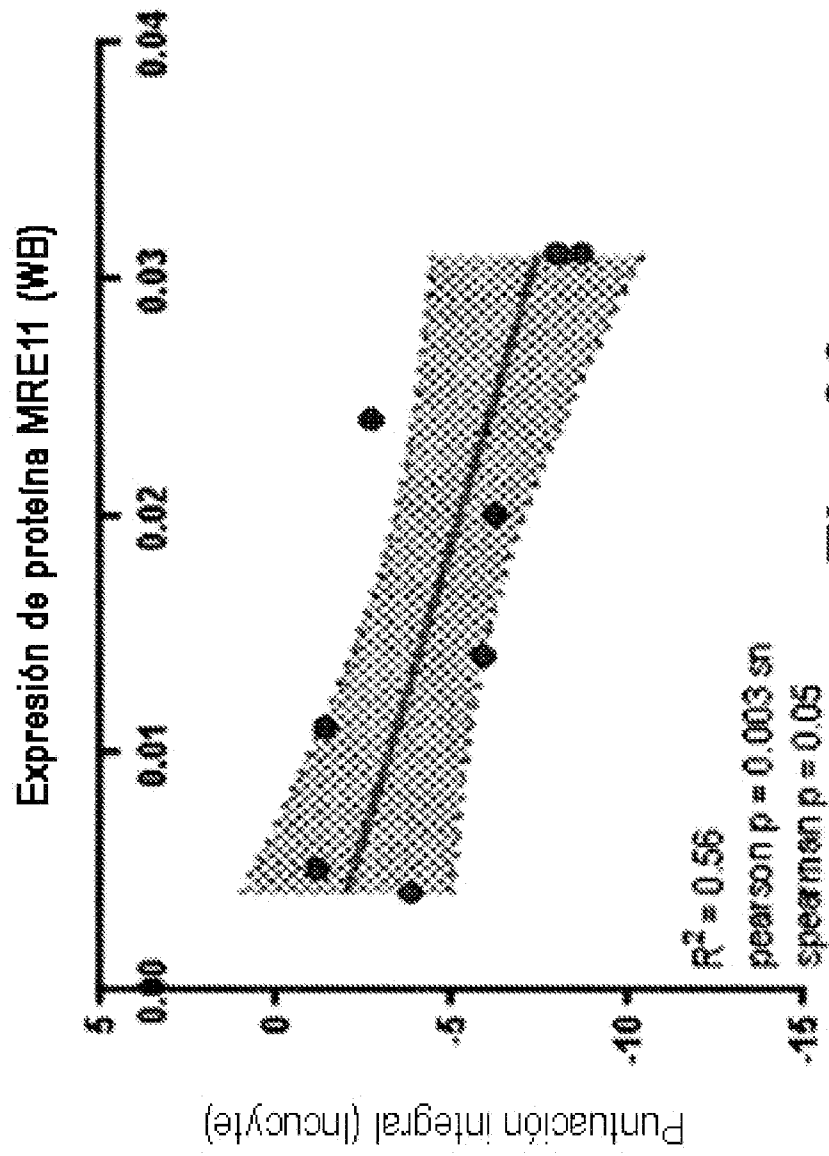


Fig. 39

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pATR S426

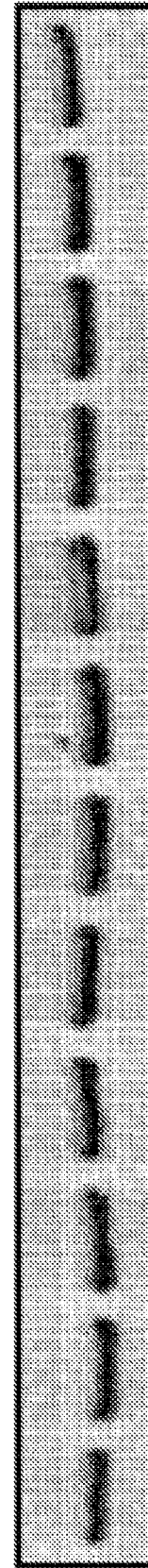
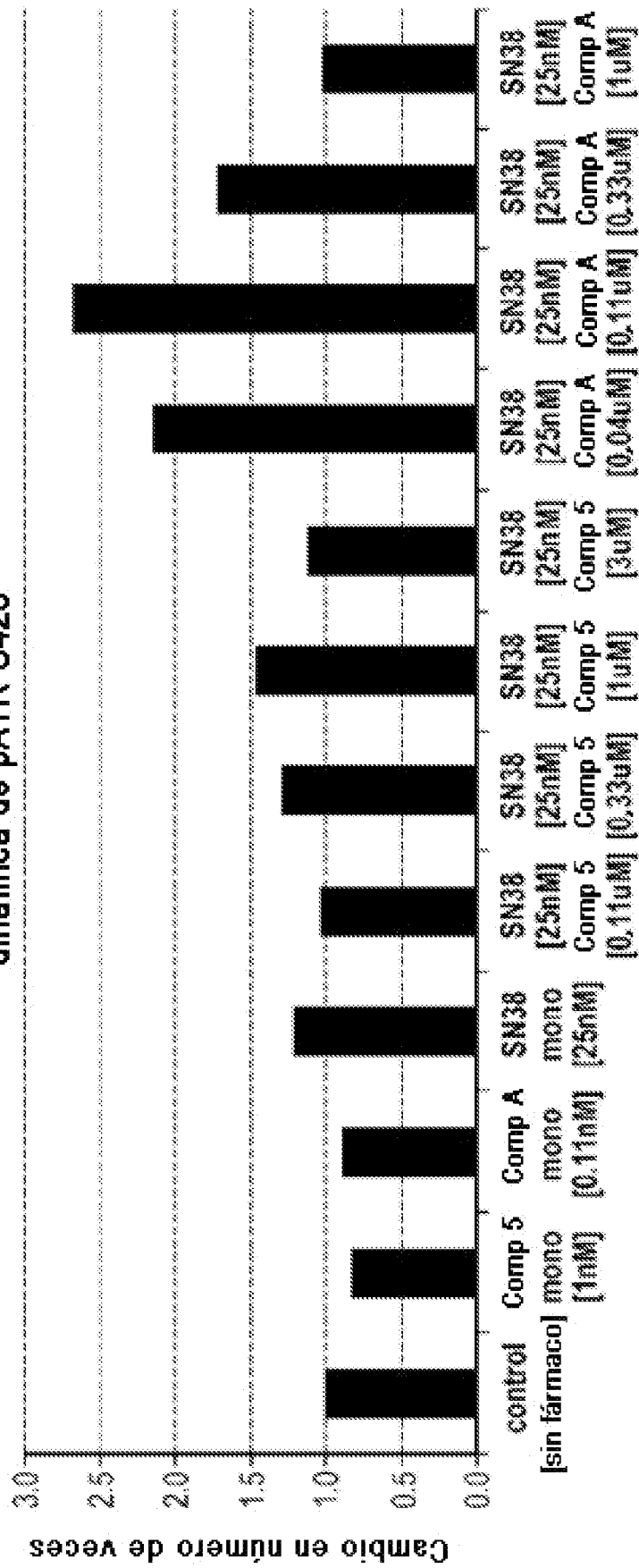


Fig. 40A

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pDNAPK S2065

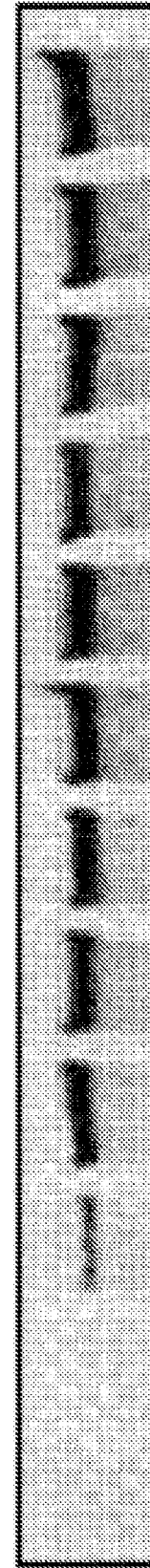
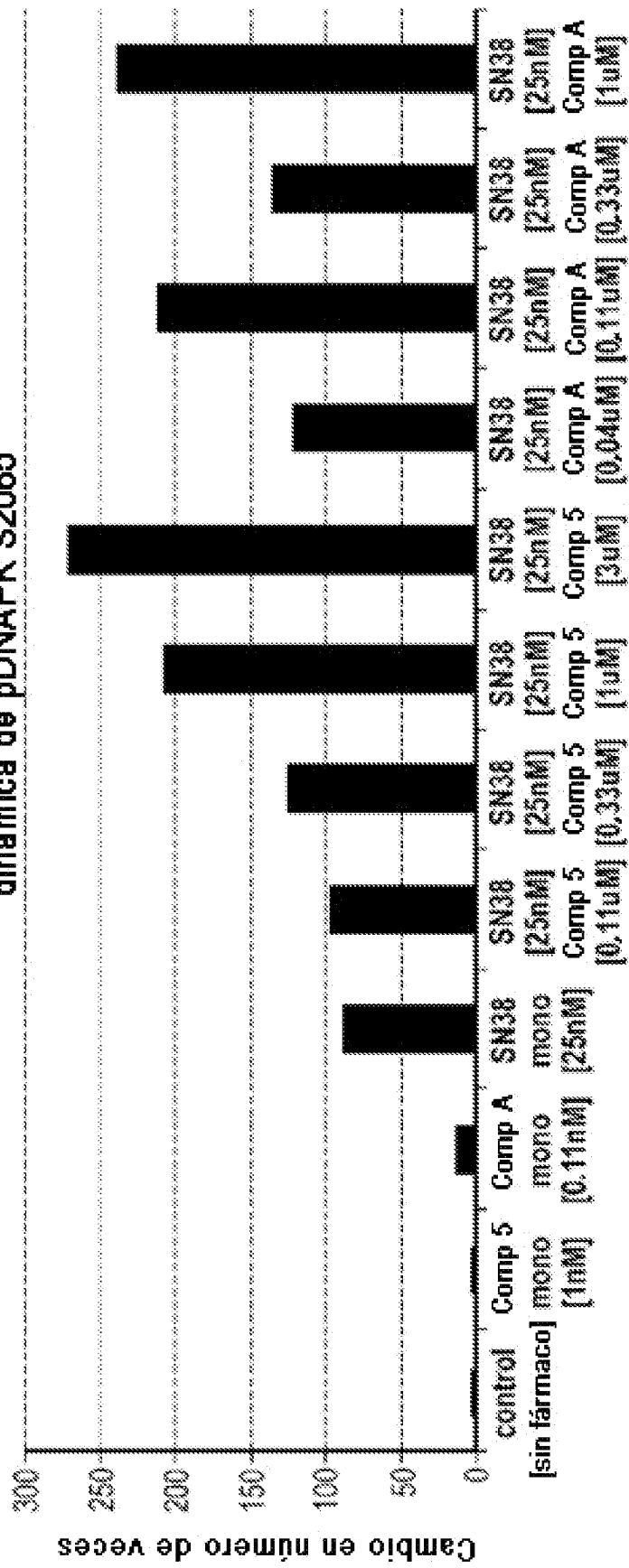


Fig. 40B

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK1 S345

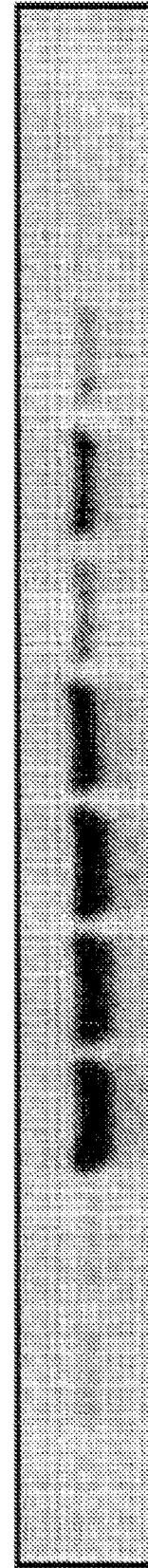
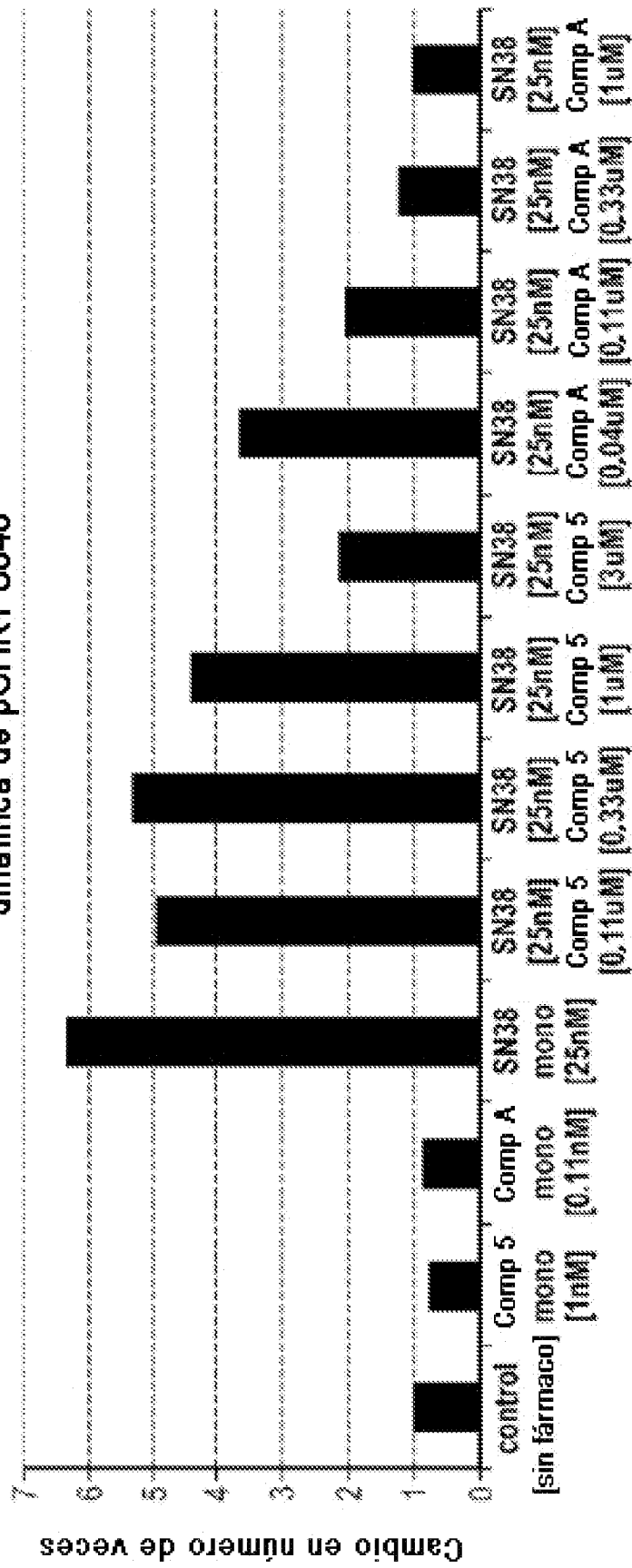


Fig. 40C

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pRPA2 S33

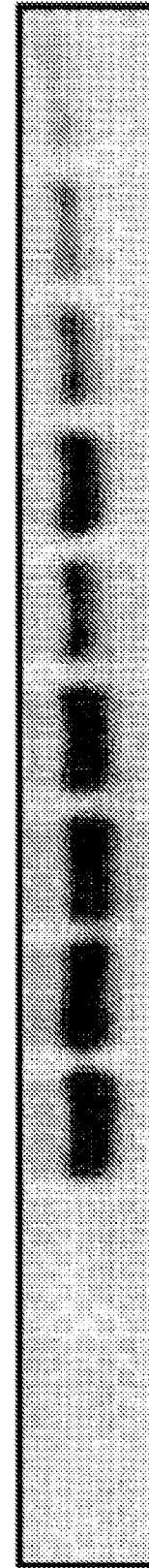
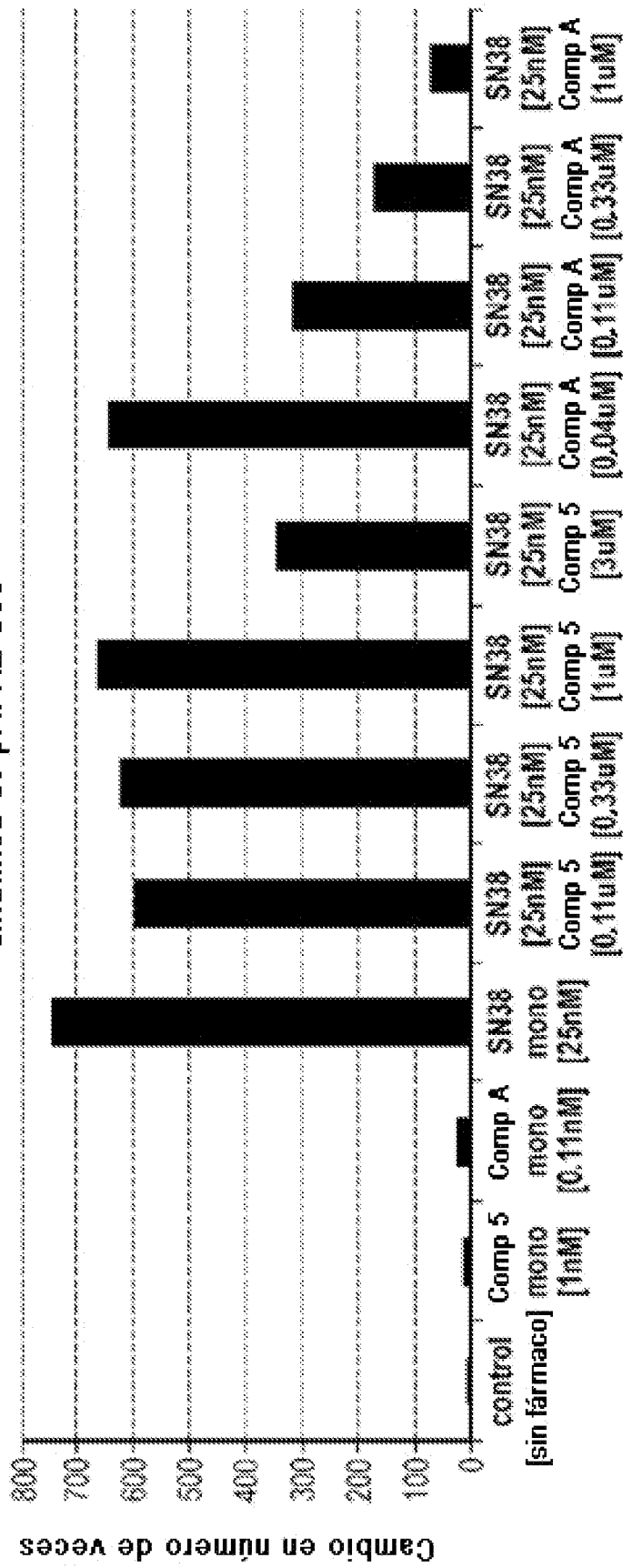


Fig. 40D

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pCHK2 T68

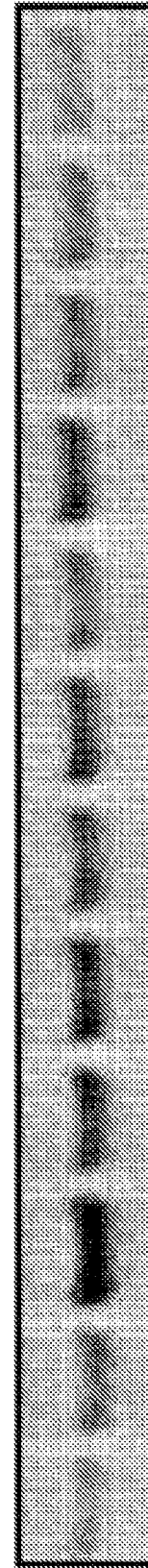
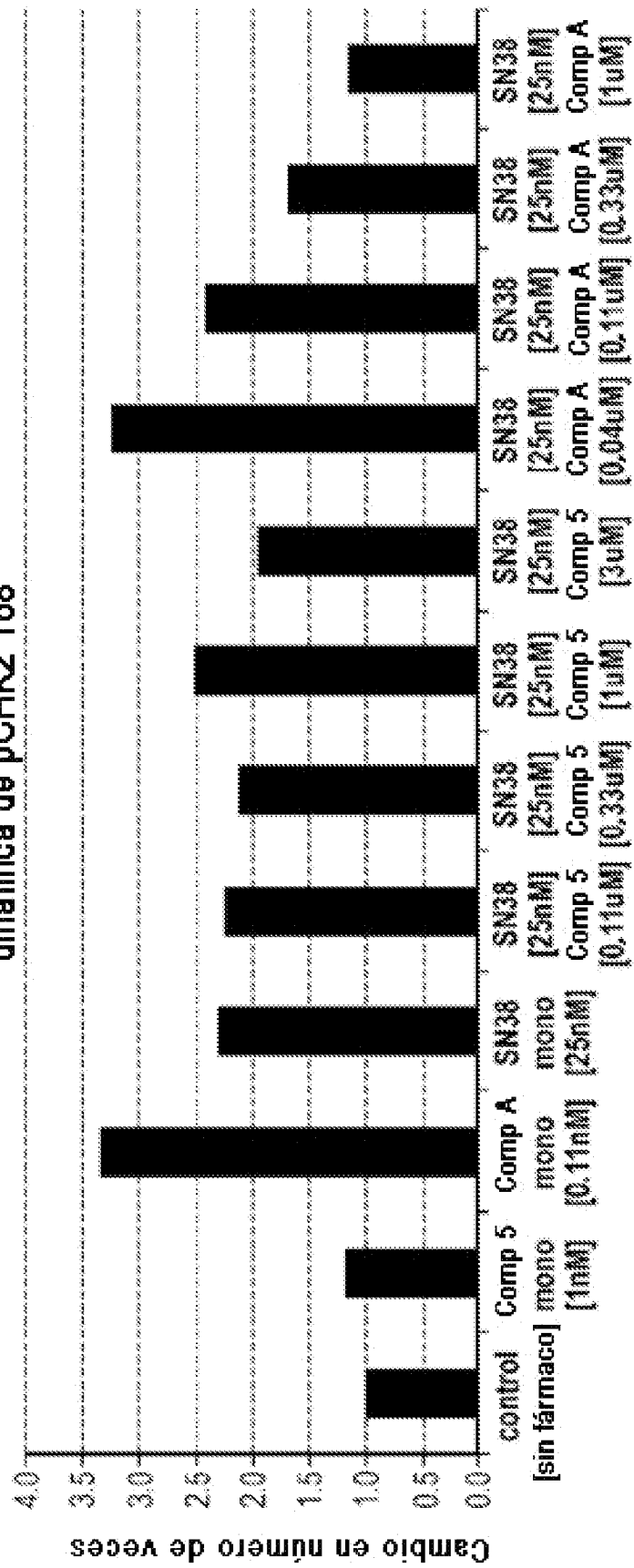


Fig. 40E

H1299 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de yH2AX S2065

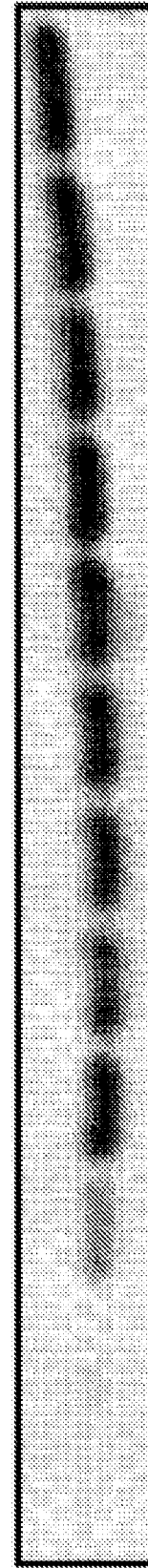
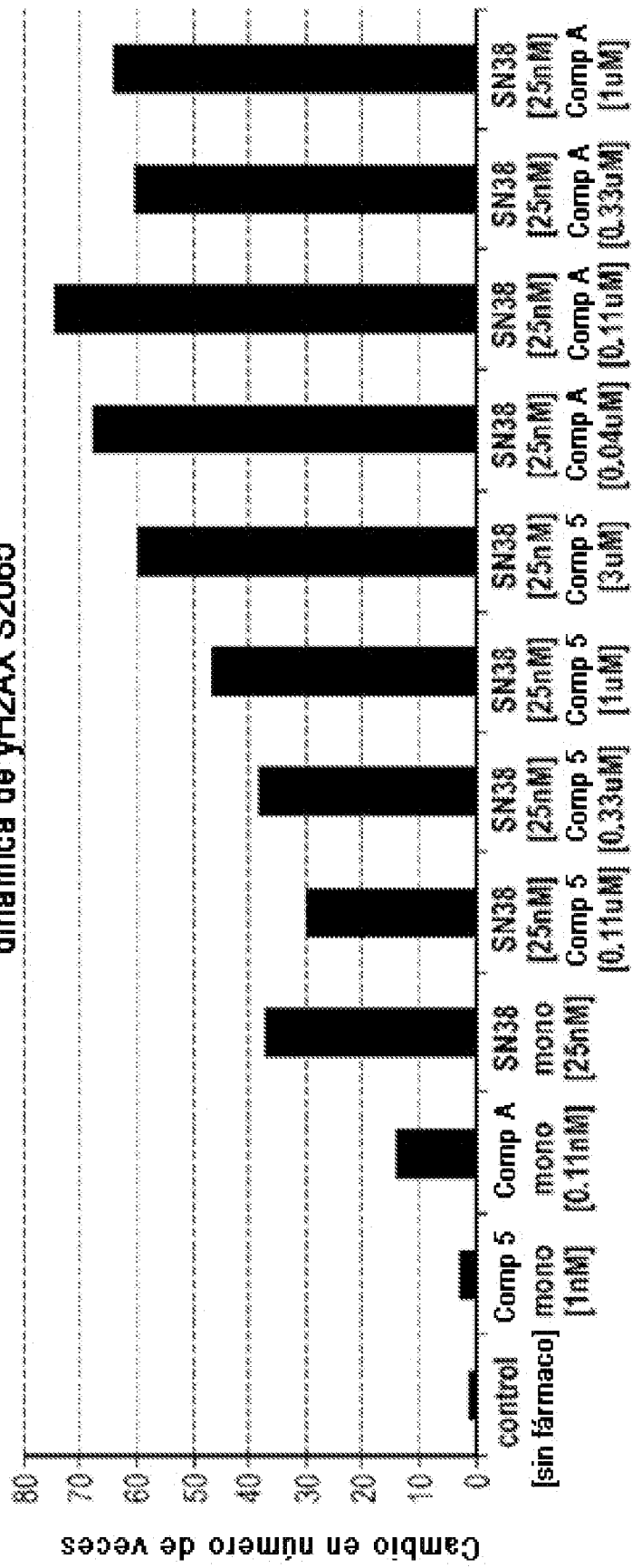


Fig. 40F

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pATR S428

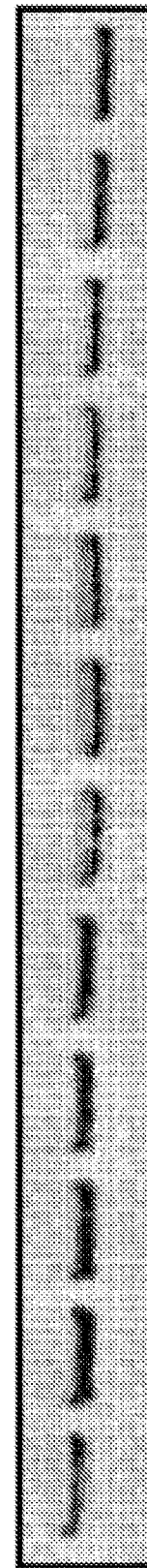
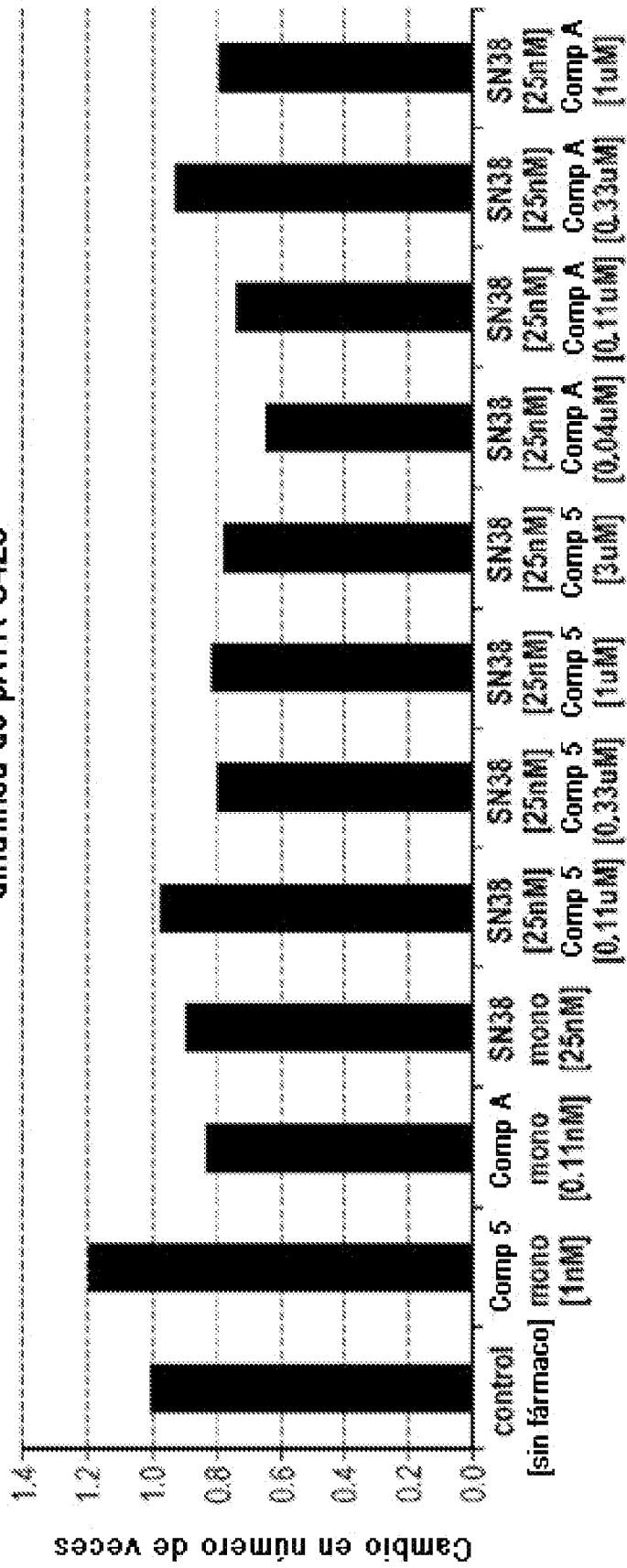


Fig. 41A

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pDNAPK S2065

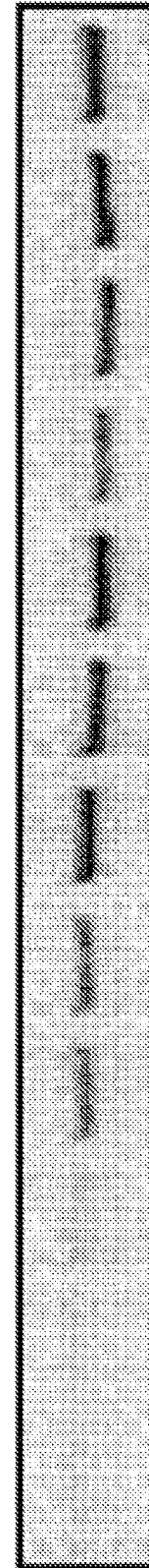
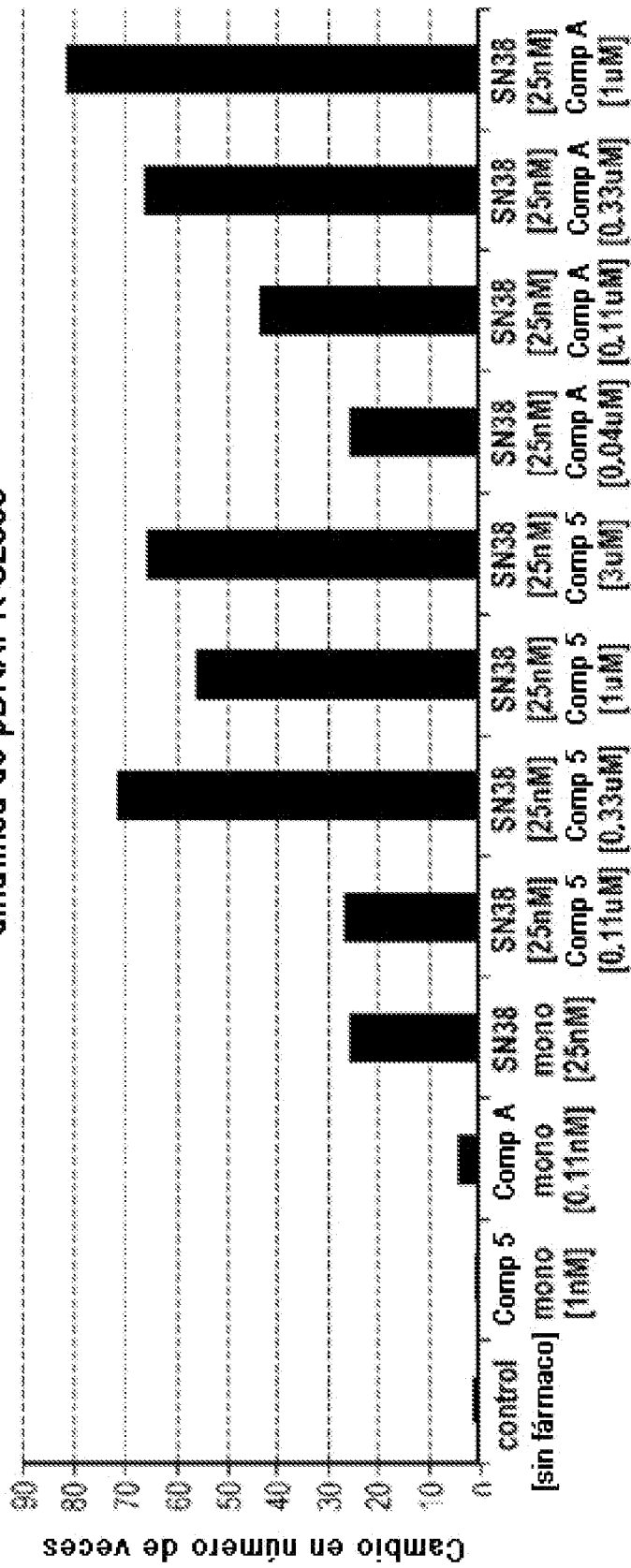


Fig. 41B

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK1 S345

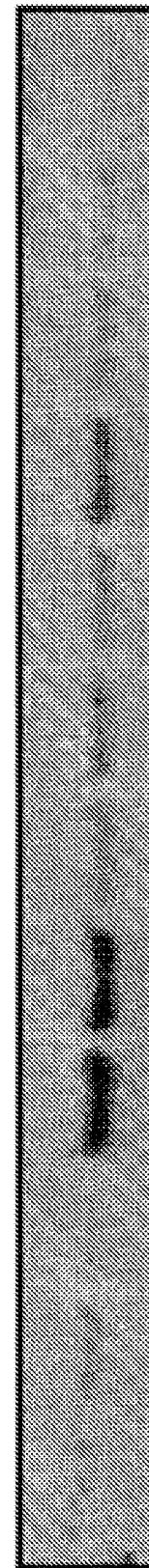
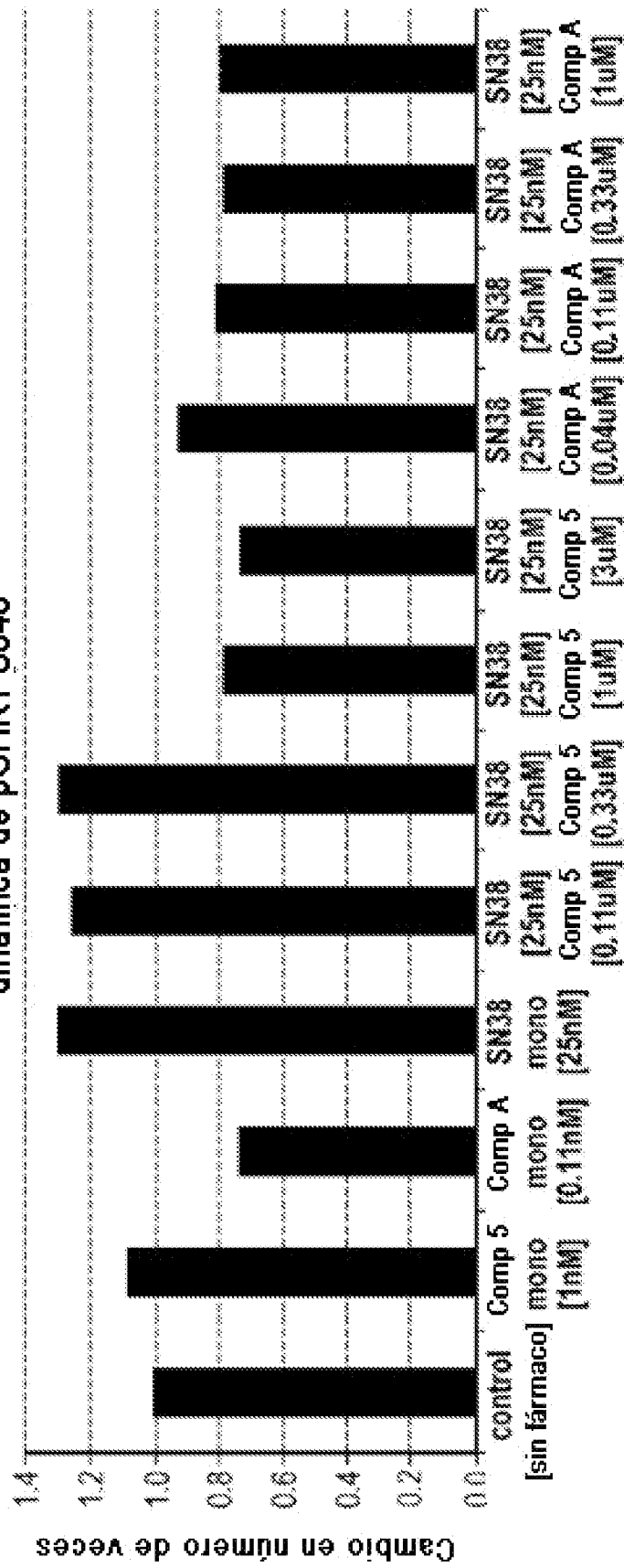


Fig. 41C

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pRPA2 S33

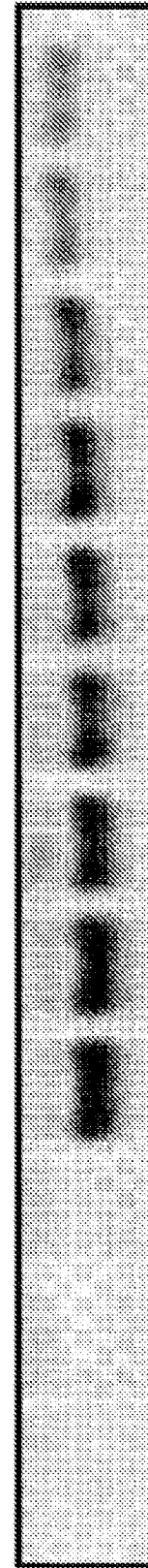
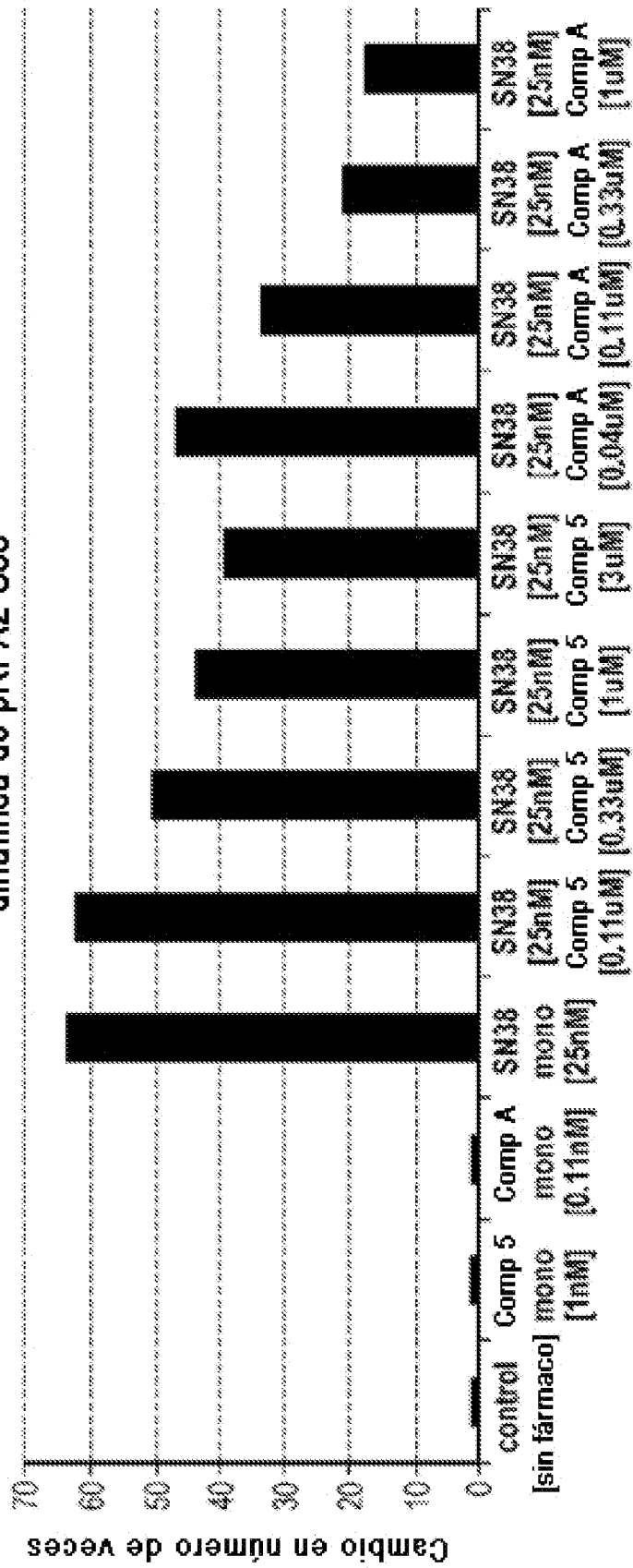


Fig. 41D

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK1 T68

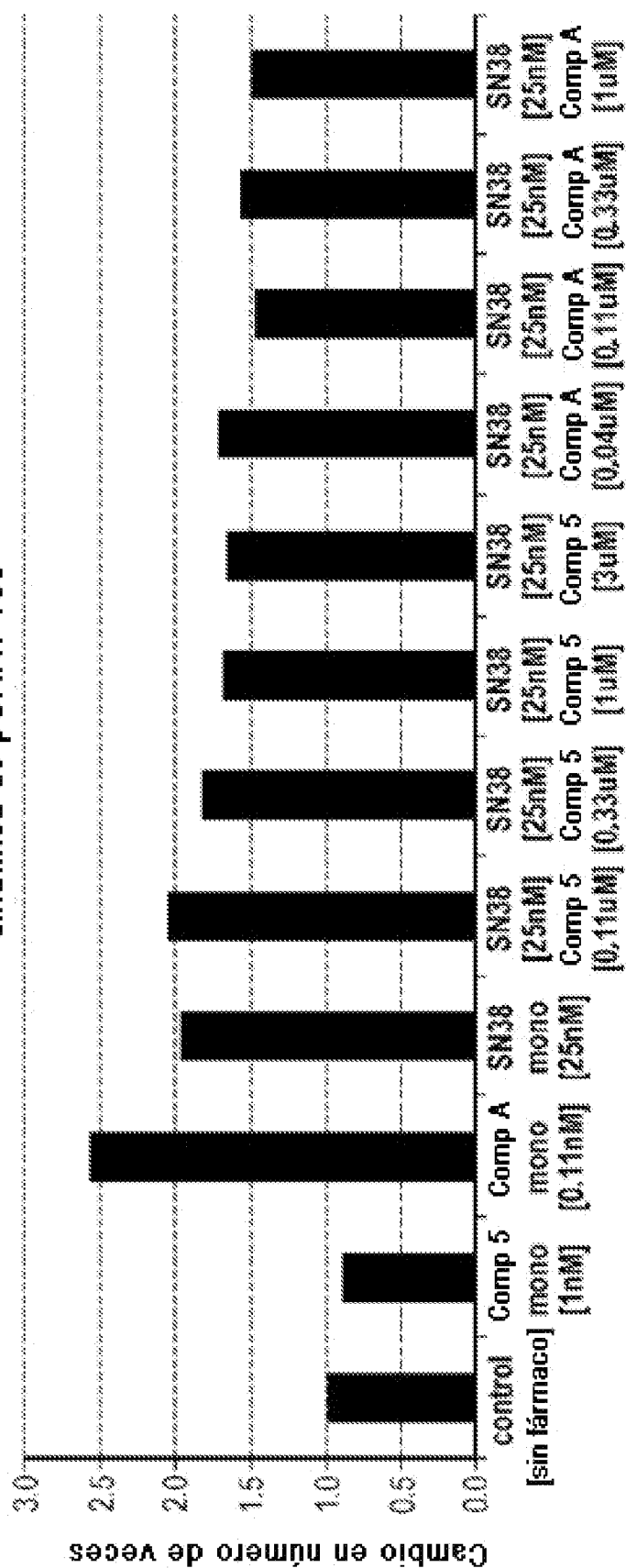


Fig. 41E

H460 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de yH2AX S2065

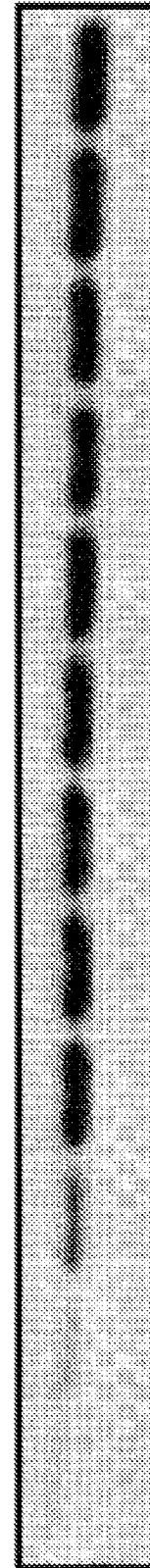
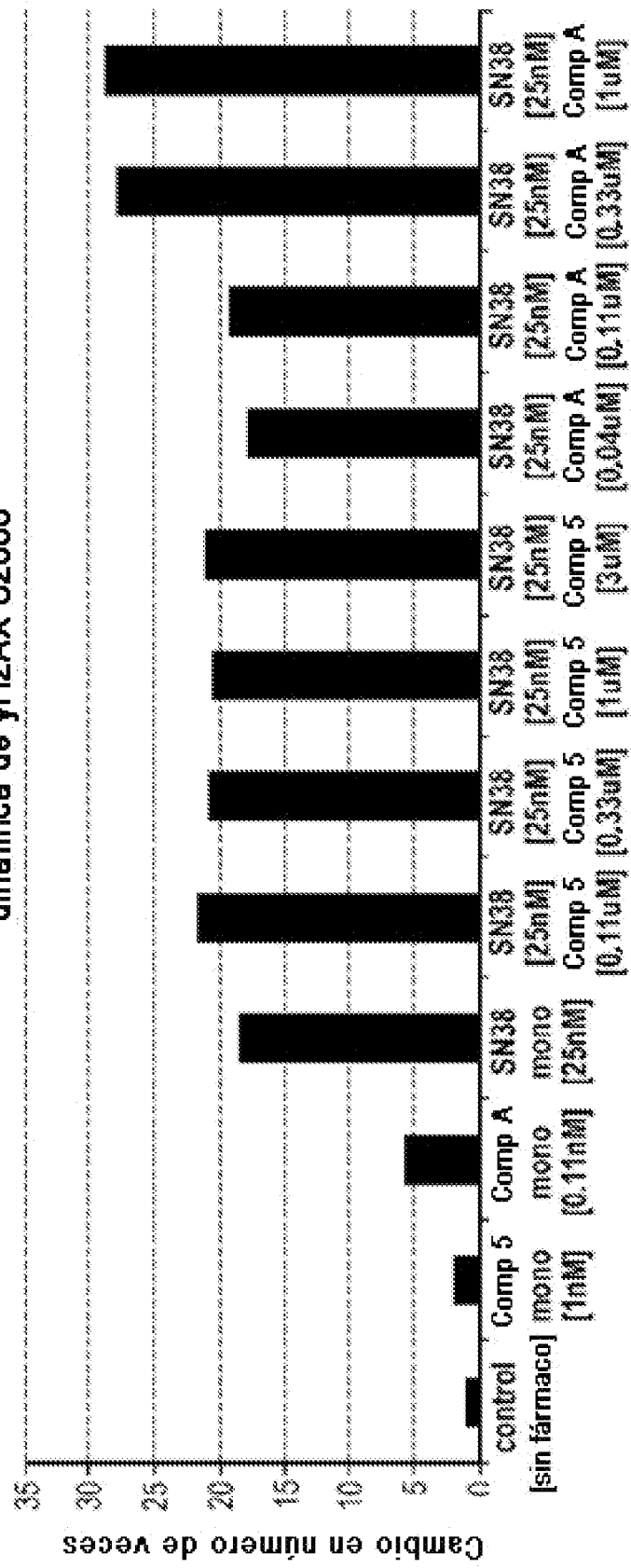


Fig. 41F

**DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pATR S428**

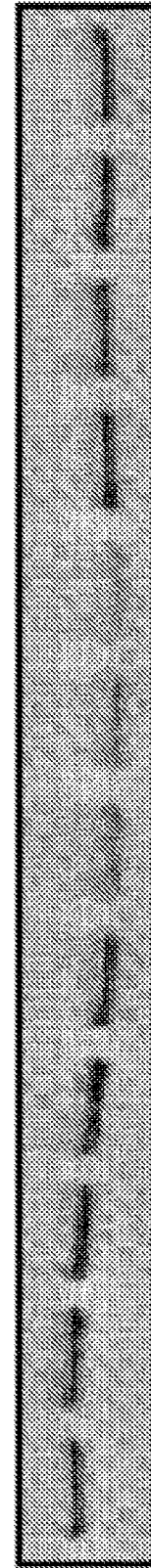
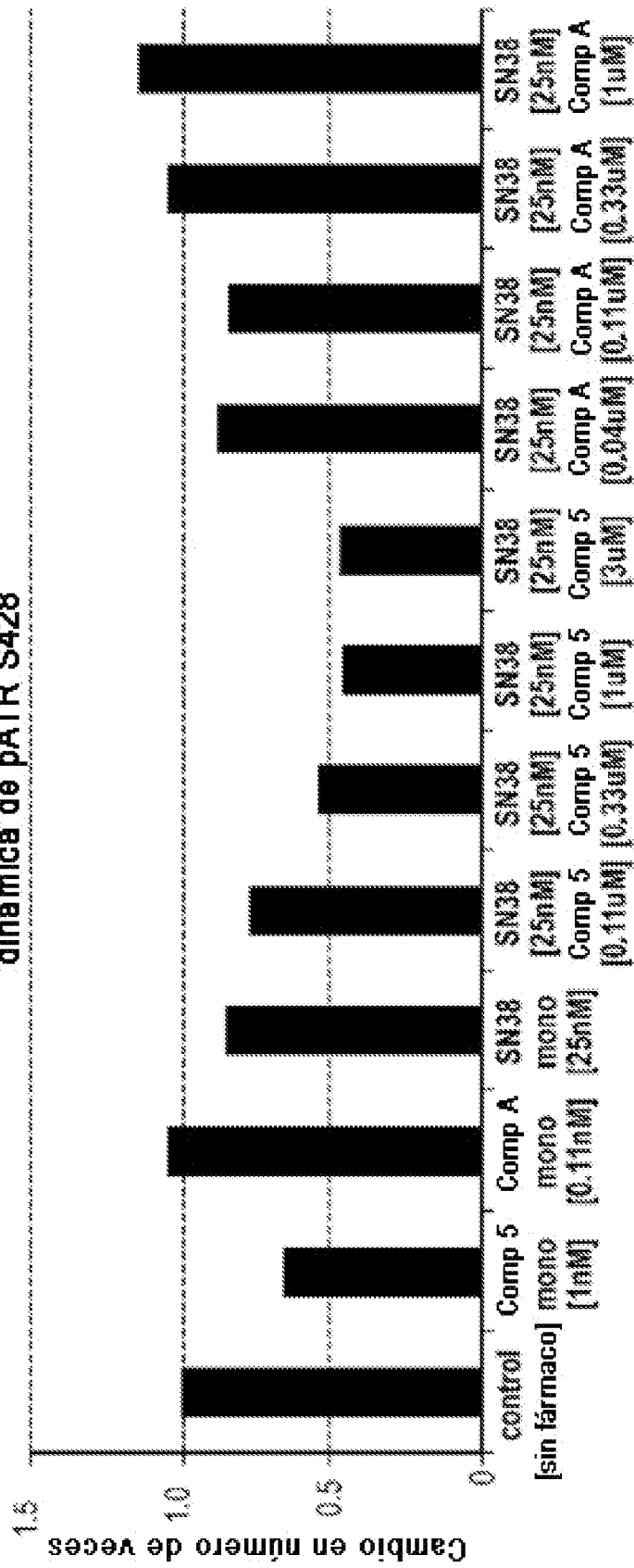


Fig. 42A

DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pDNAPK S2065

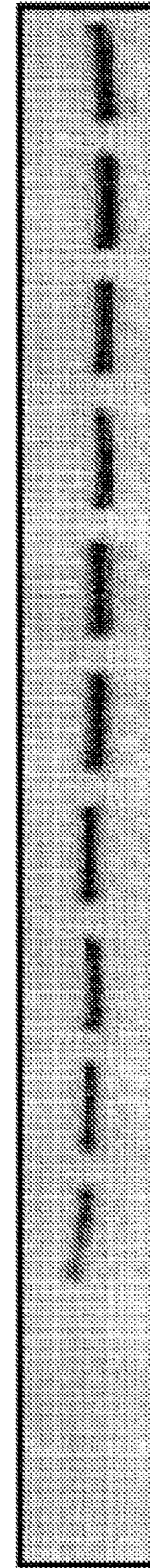
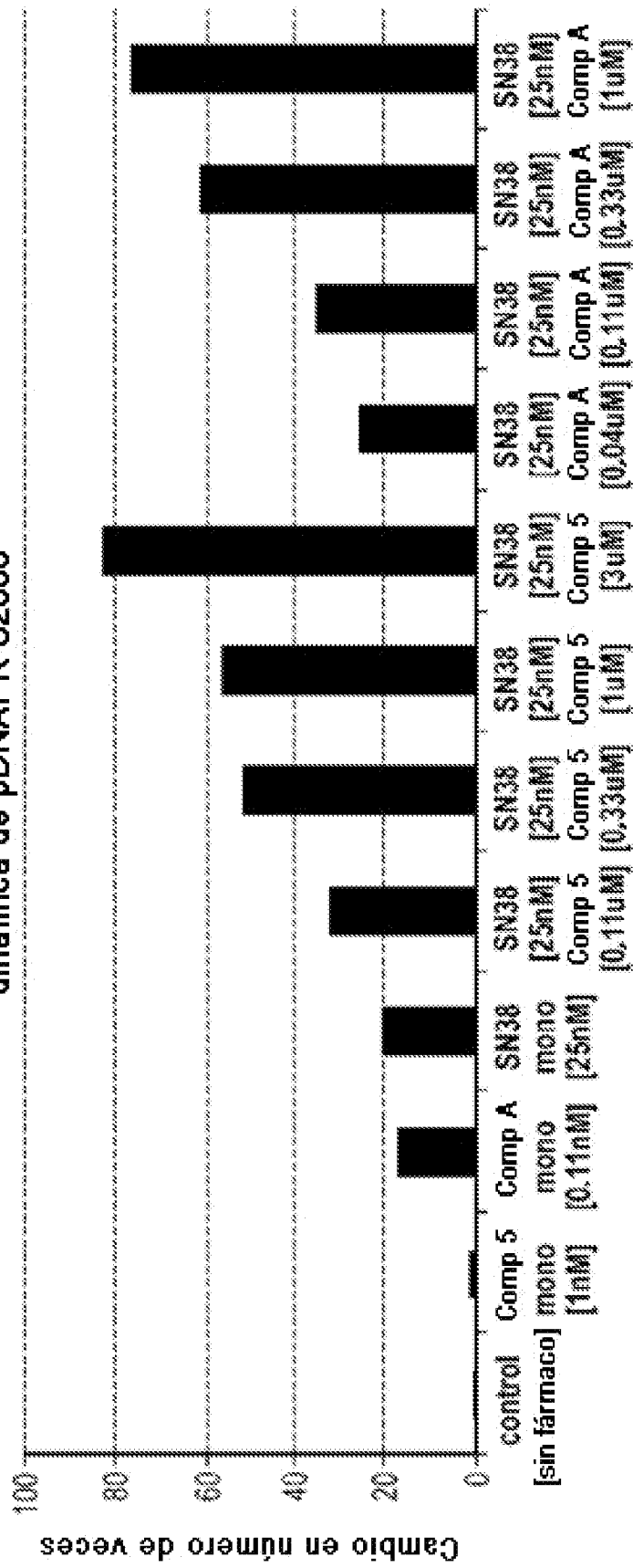


Fig. 42B

DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pCHK1 S345

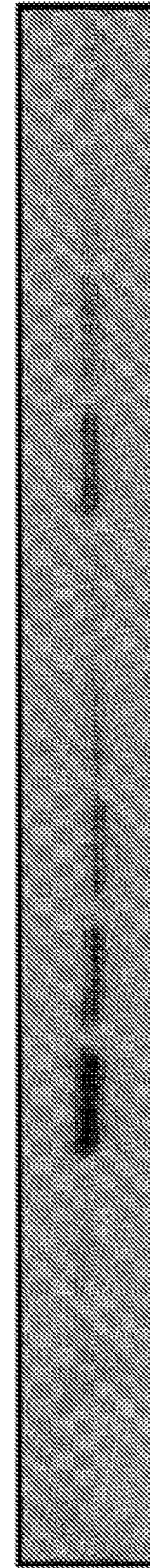
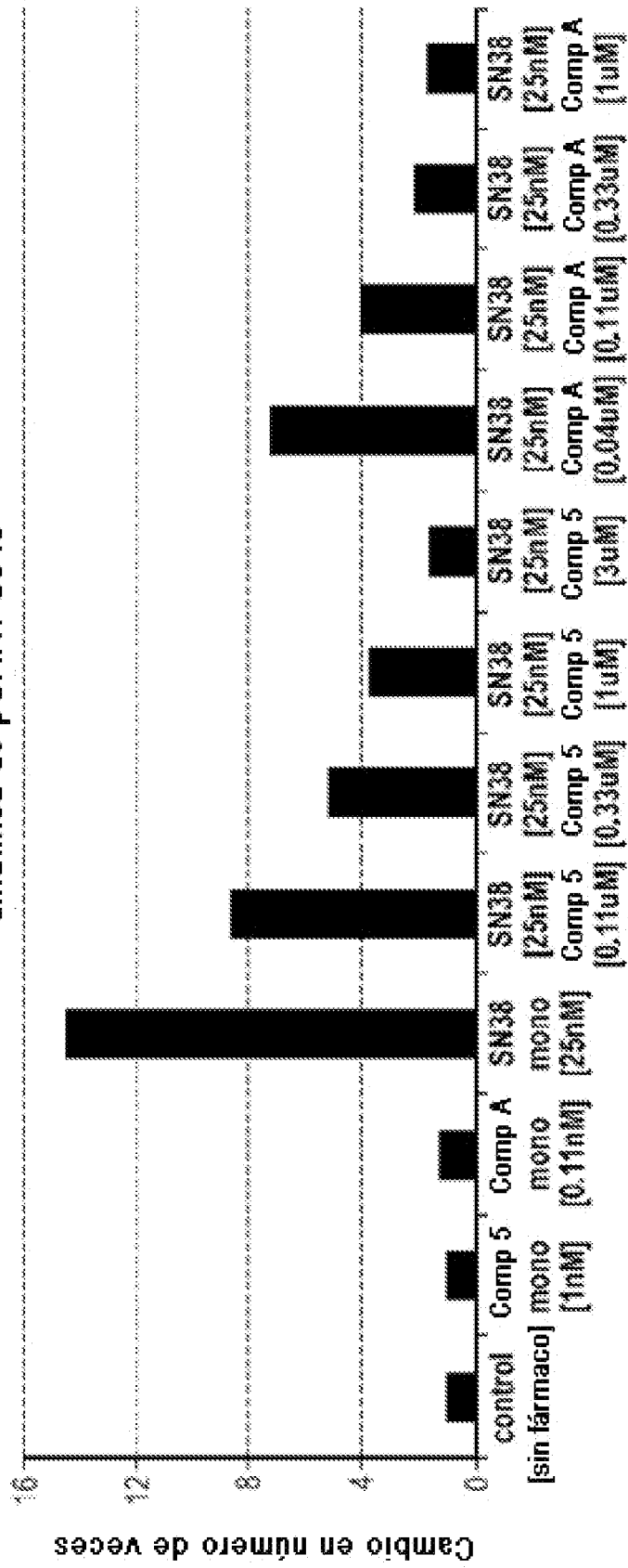


Fig. 42C

DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pRPA2 S33

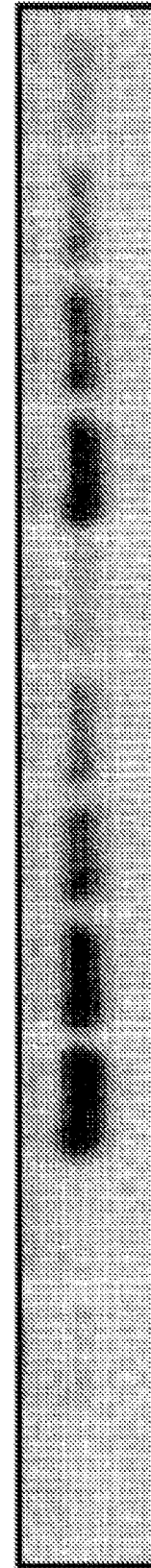
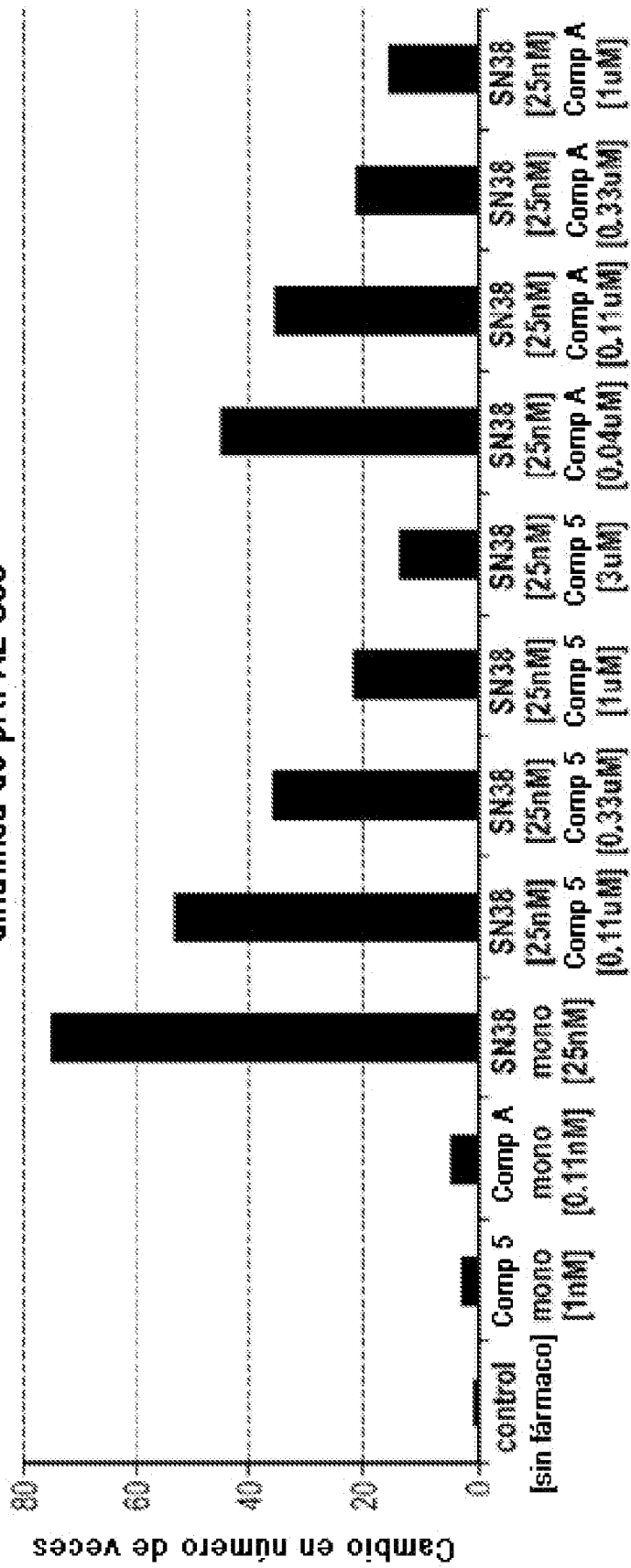


Fig. 42D

DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pCHK2 T68

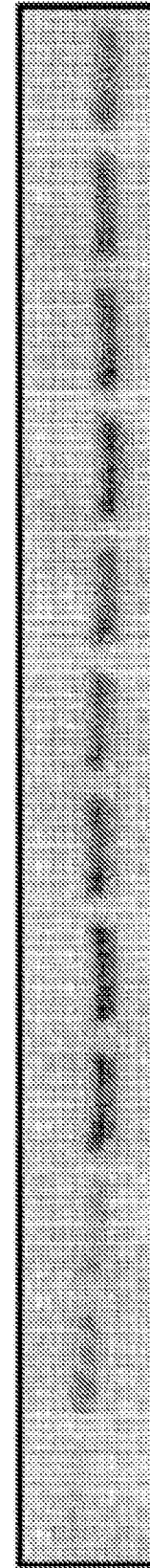
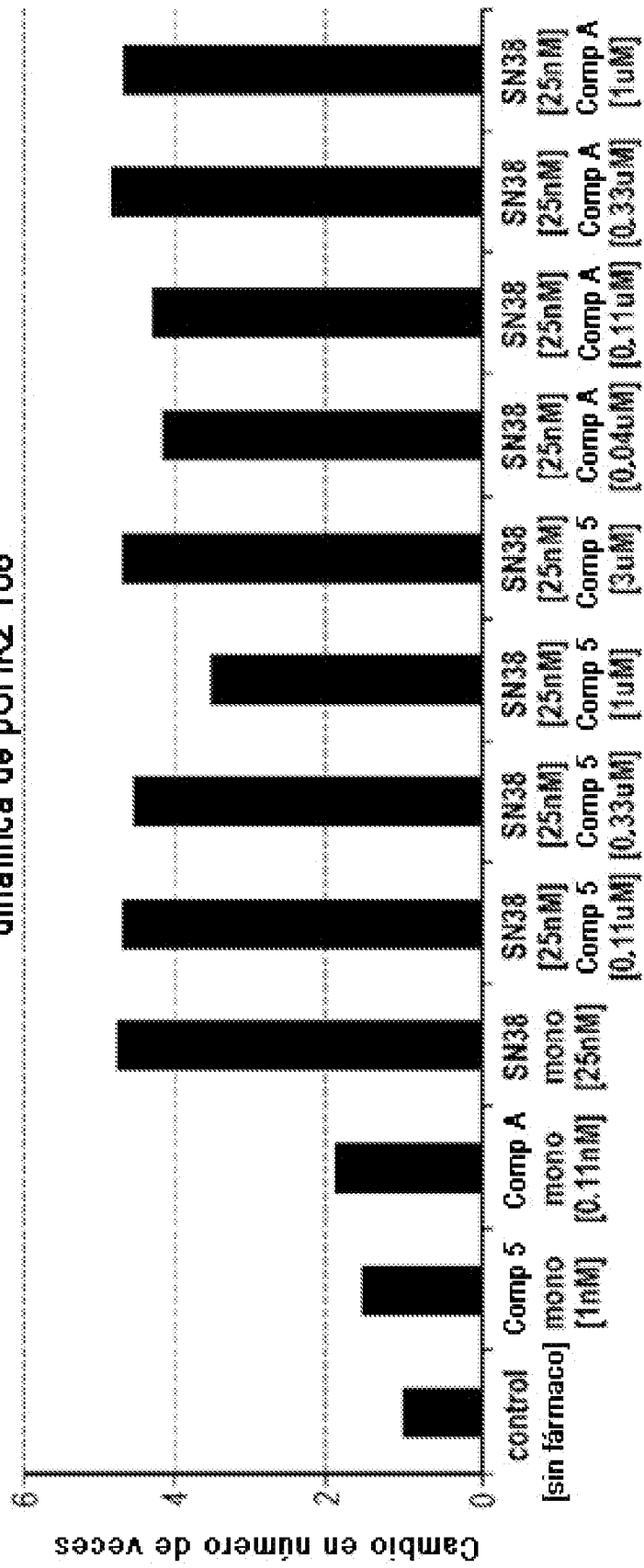


Fig. 42E

DMS-114 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de yH2AX

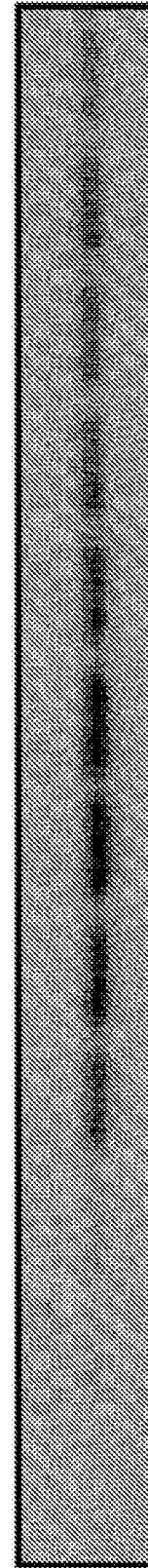
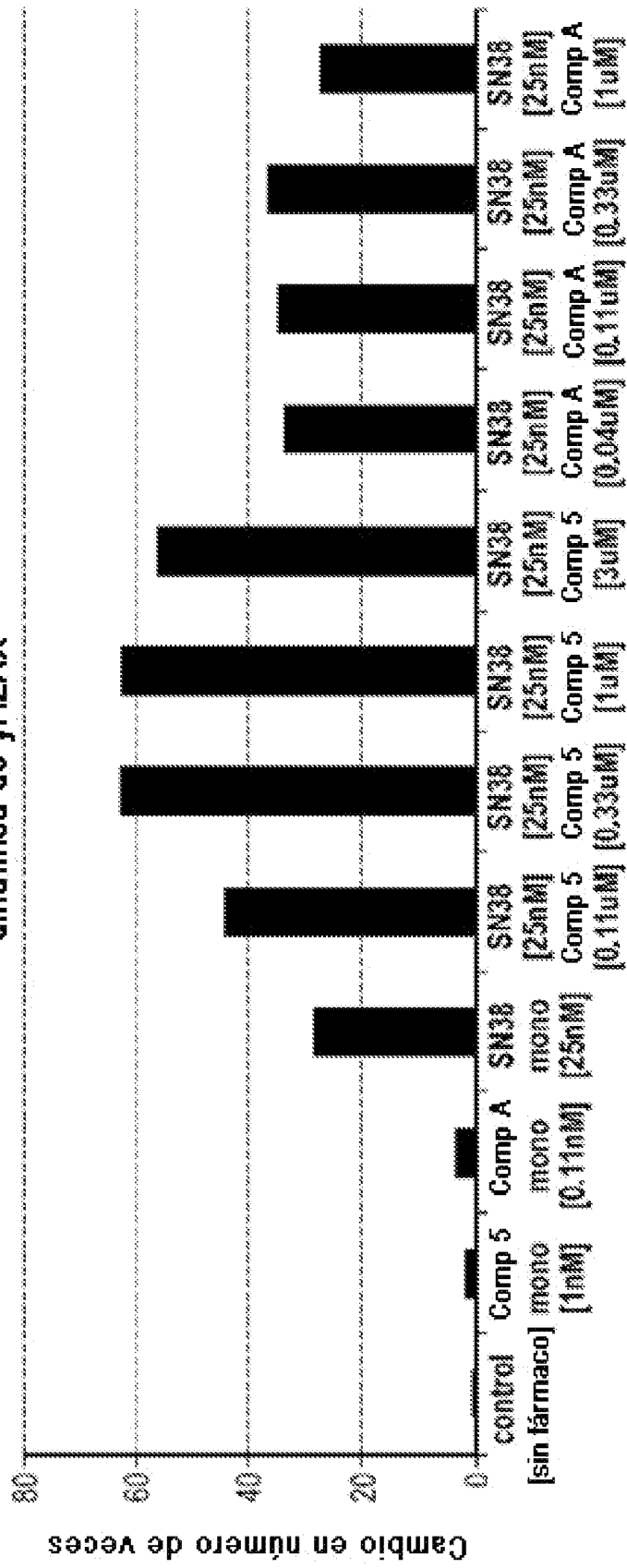


Fig. 42F

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pATR S428

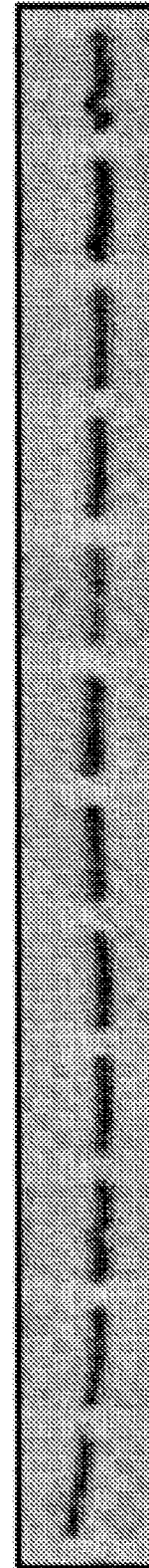
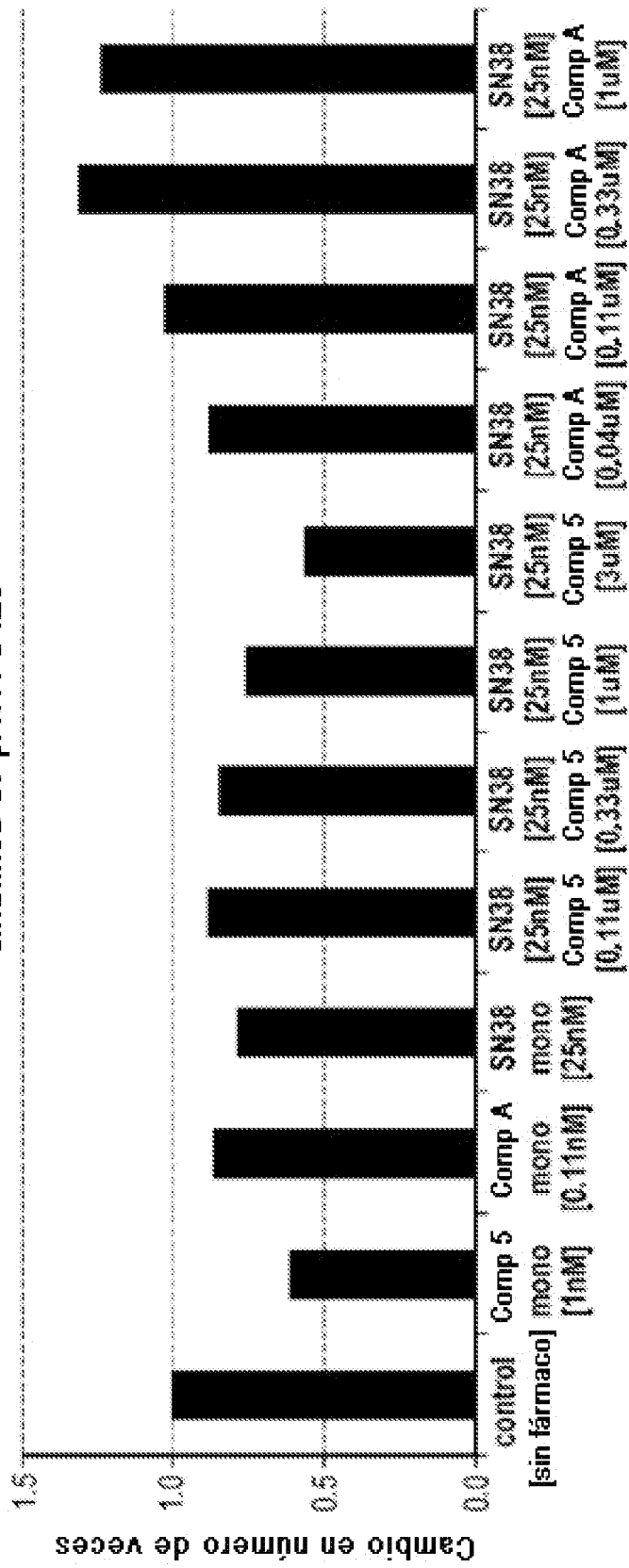


Fig. 43A

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pDNAPK S2065

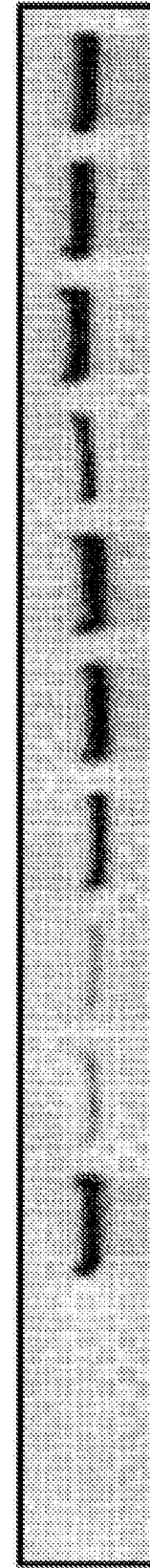
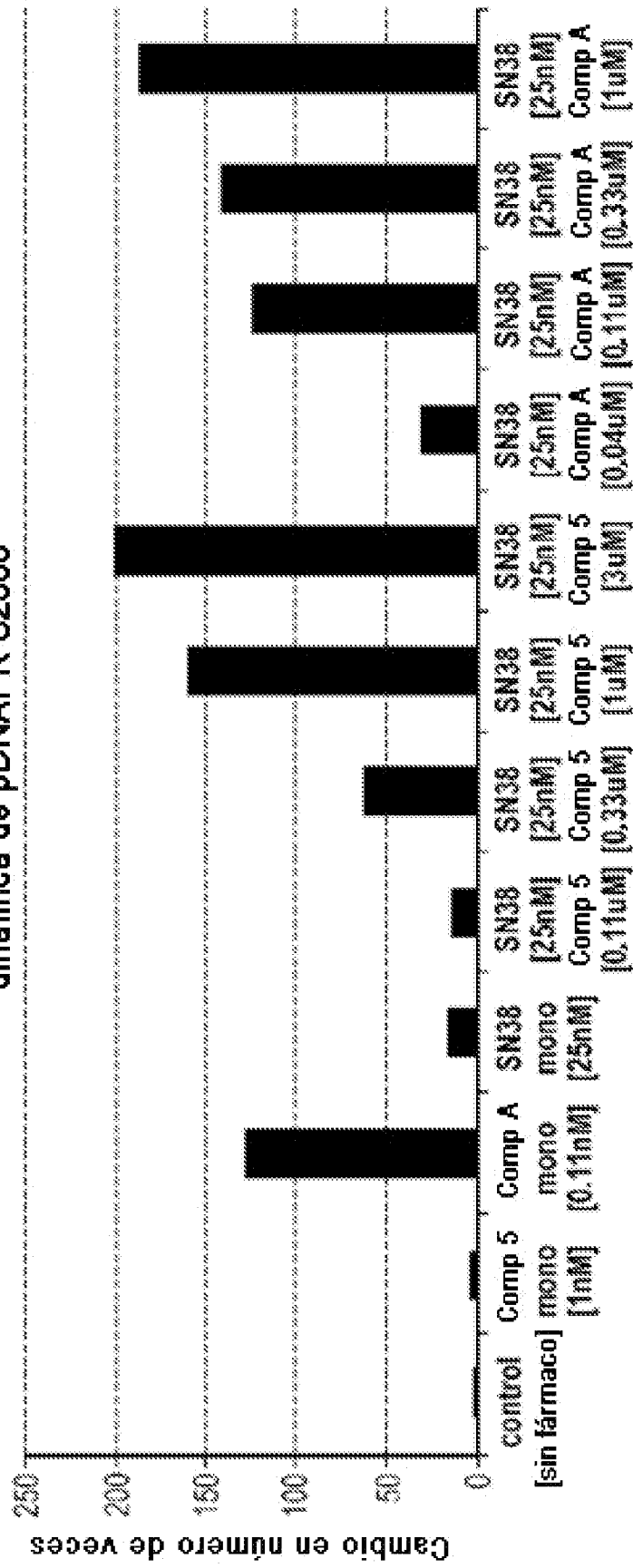


Fig. 43B

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK1 S345

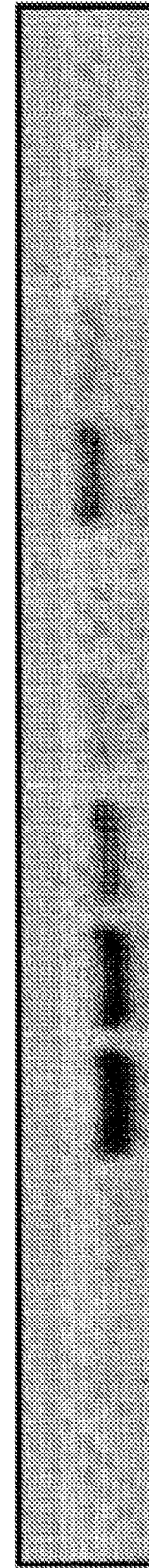
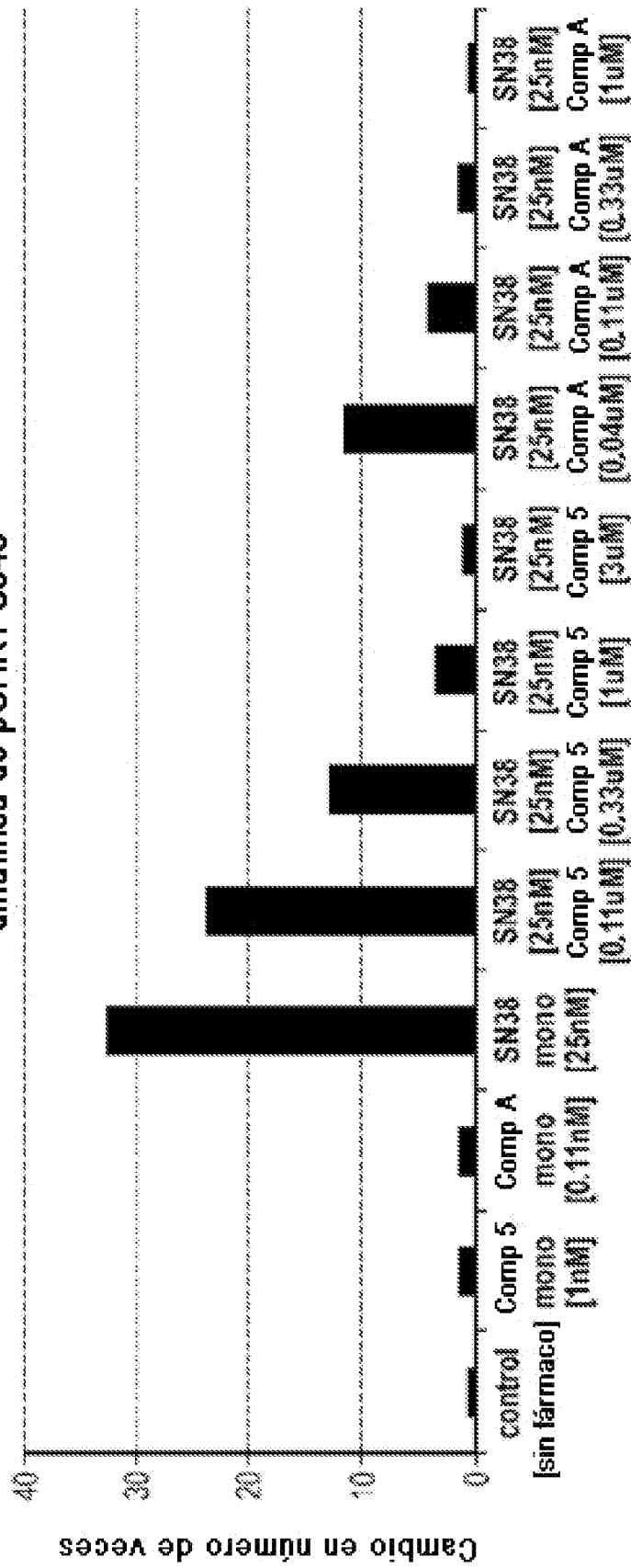


Fig. 43C

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pRPA2 S33

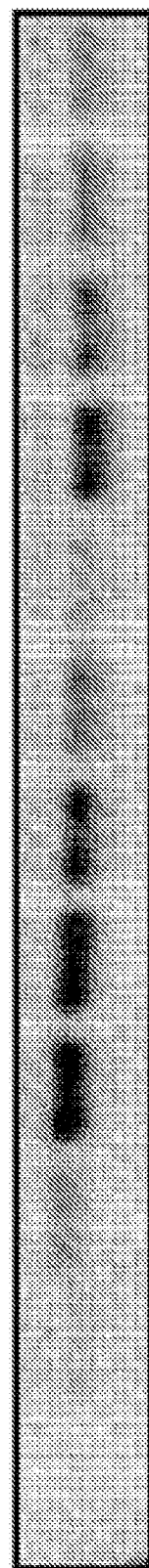
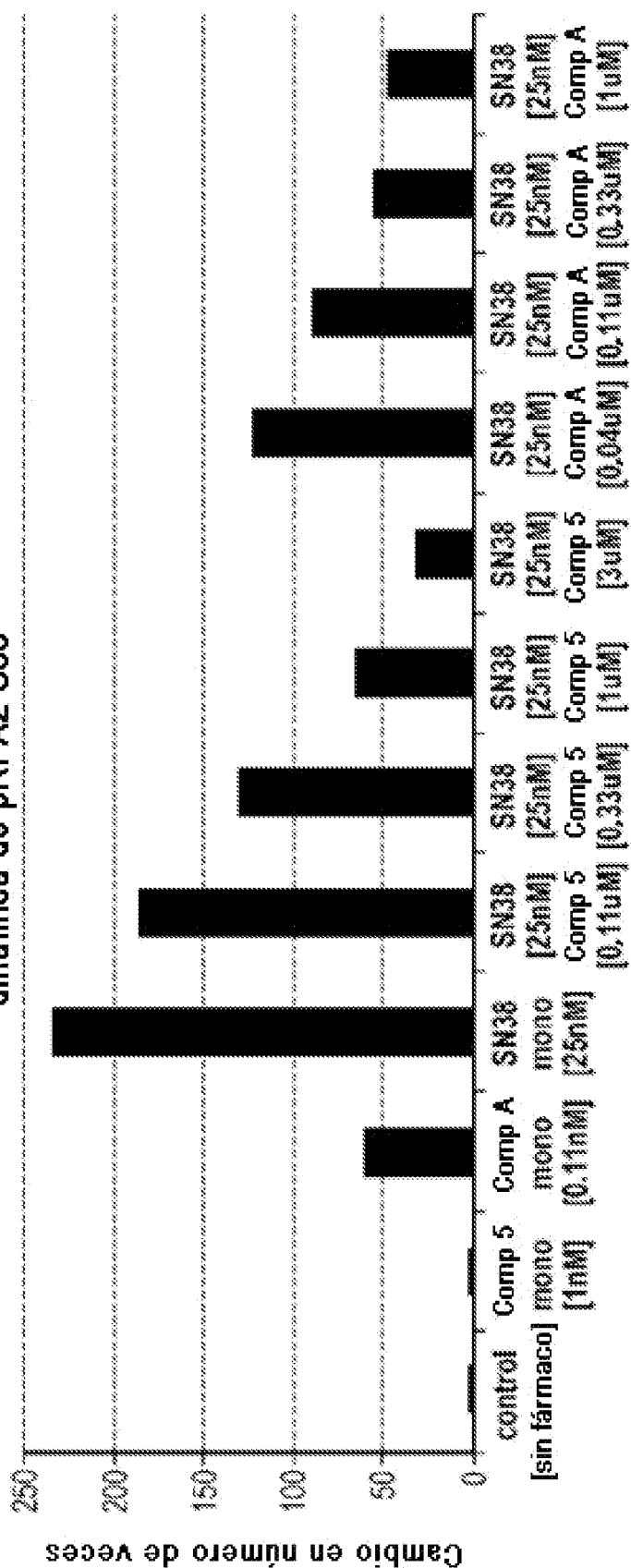


Fig. 43D

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK2 T68

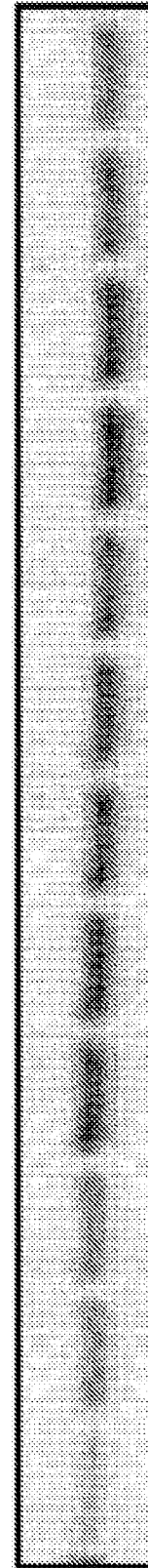
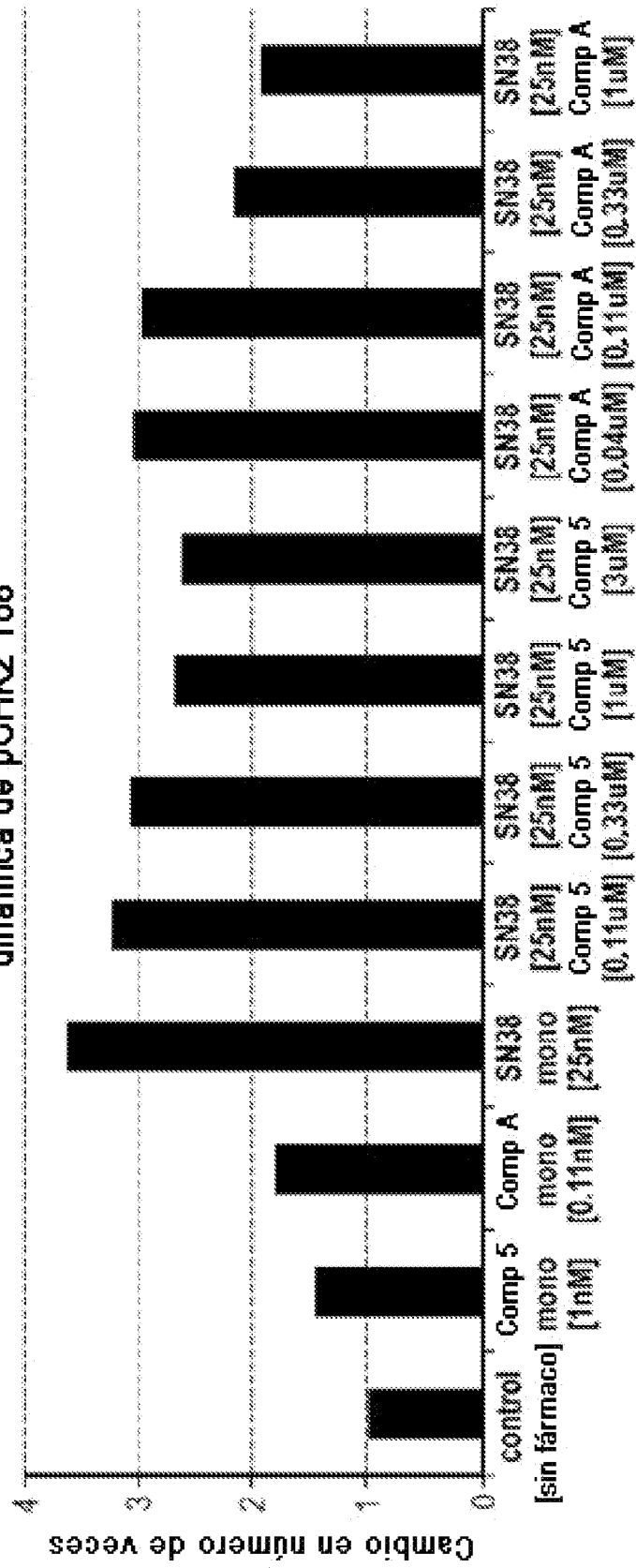


Fig. 43E

HCC-70 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de γH2AX

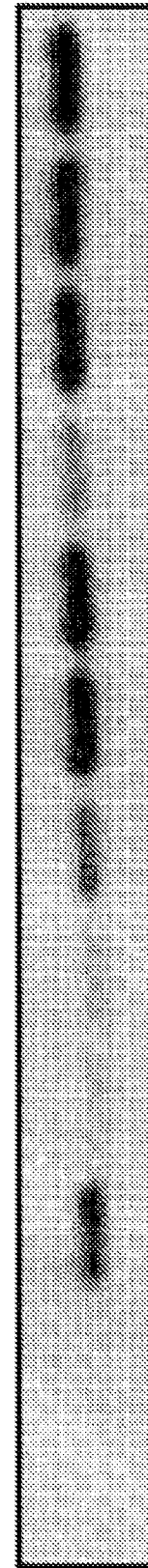
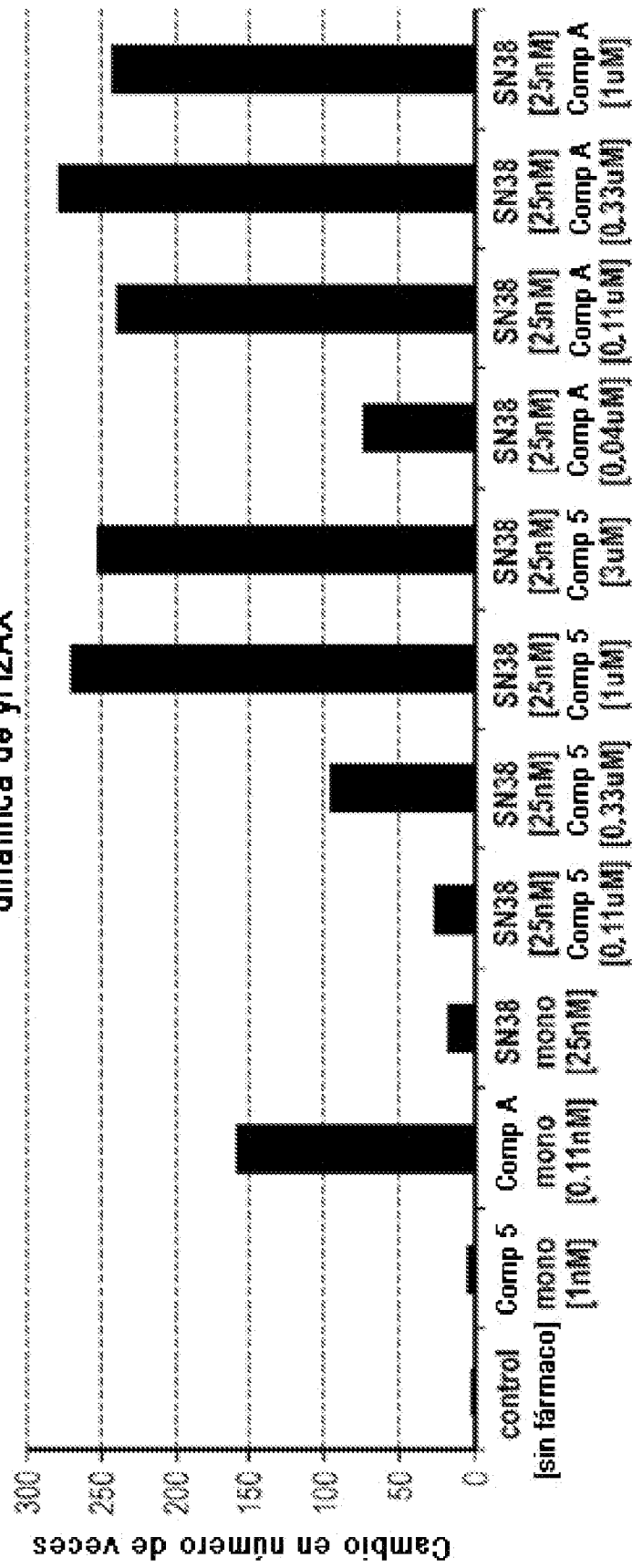


Fig. 43F

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pATR S428

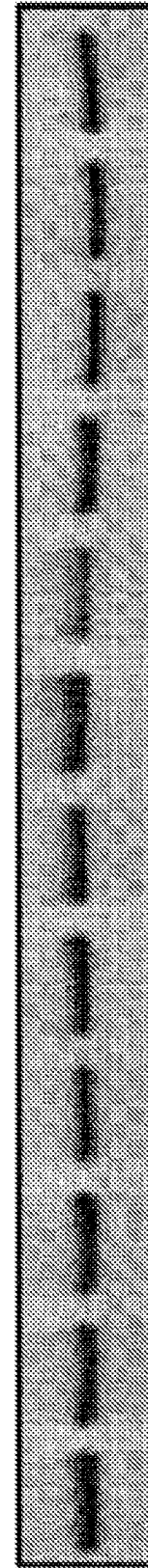
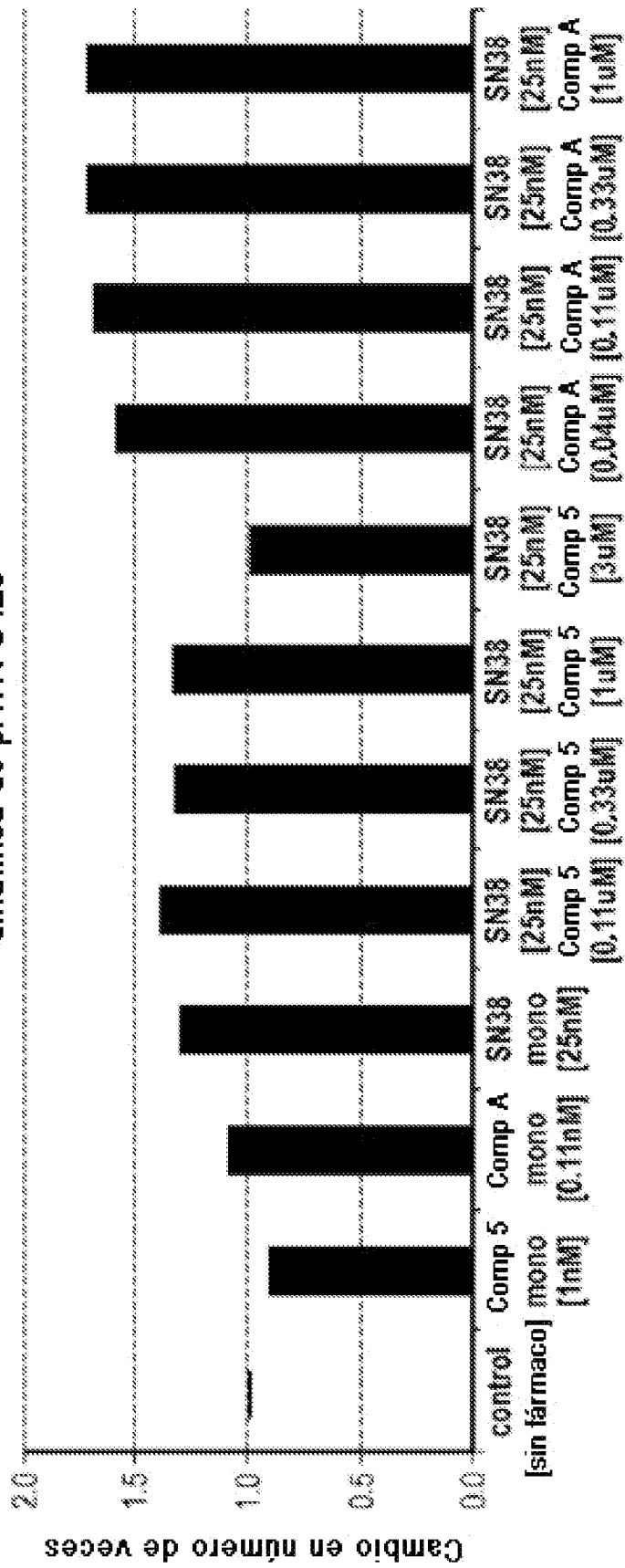


Fig. 44A

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pDNAPK S2065

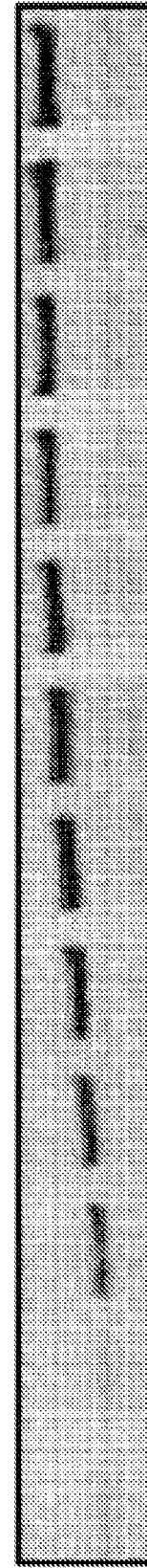
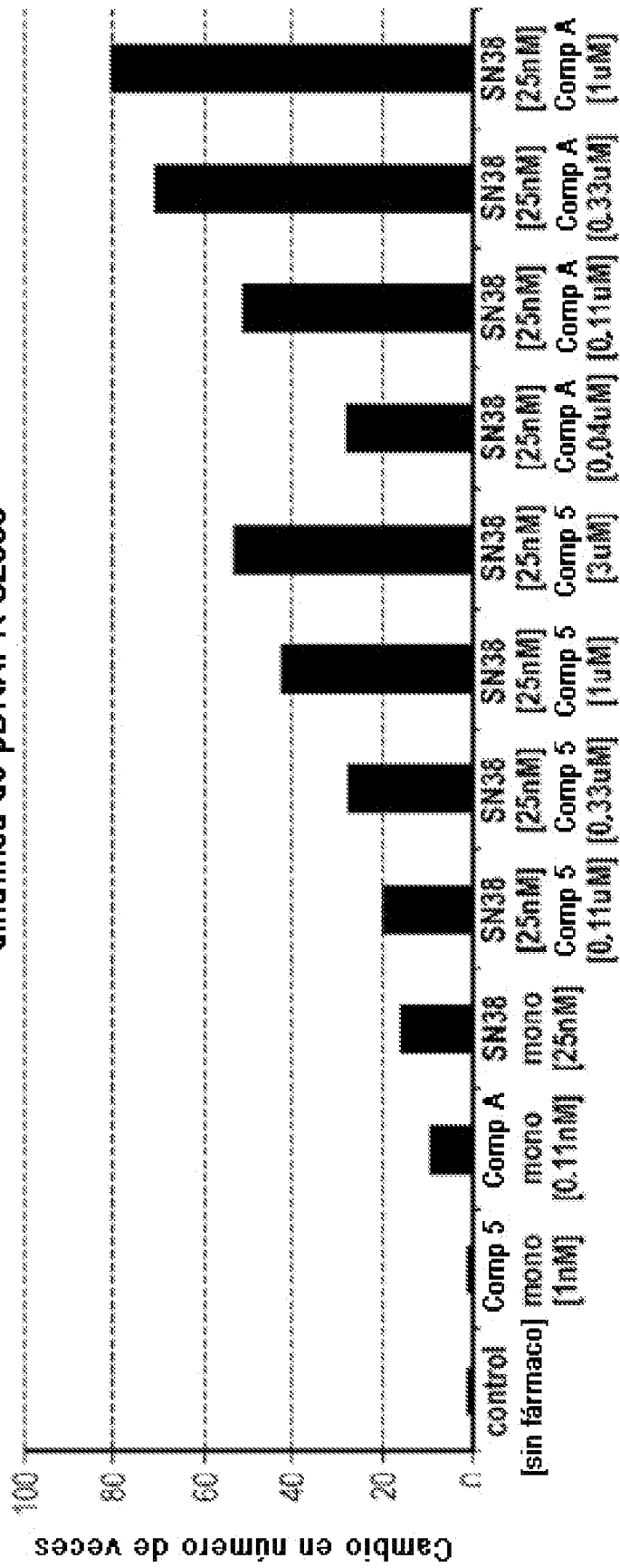


Fig. 44B

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pCHK1 S345

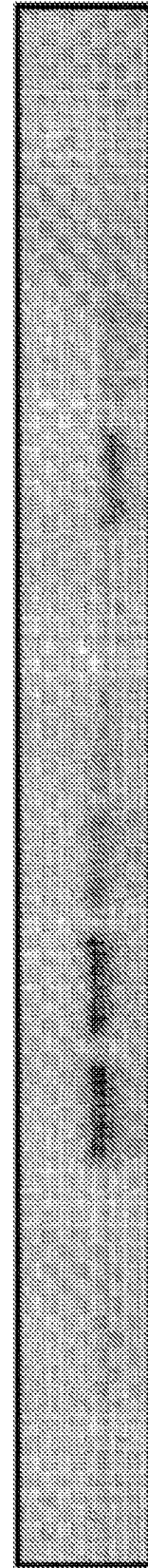
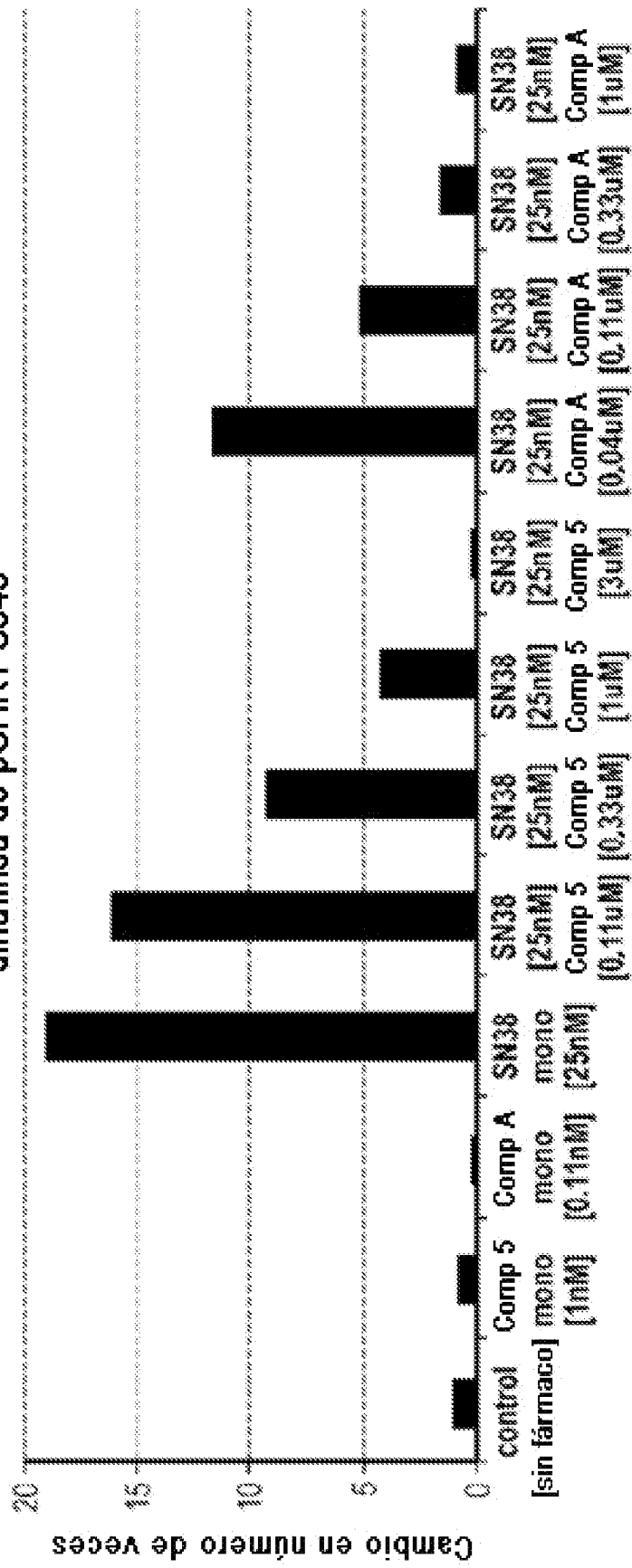


Fig. 44C

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de pRPA2 S33

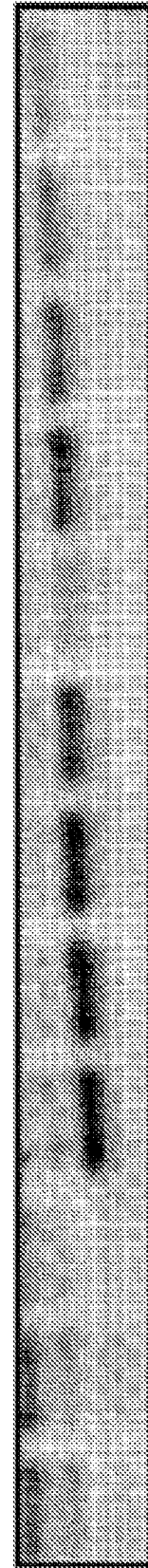
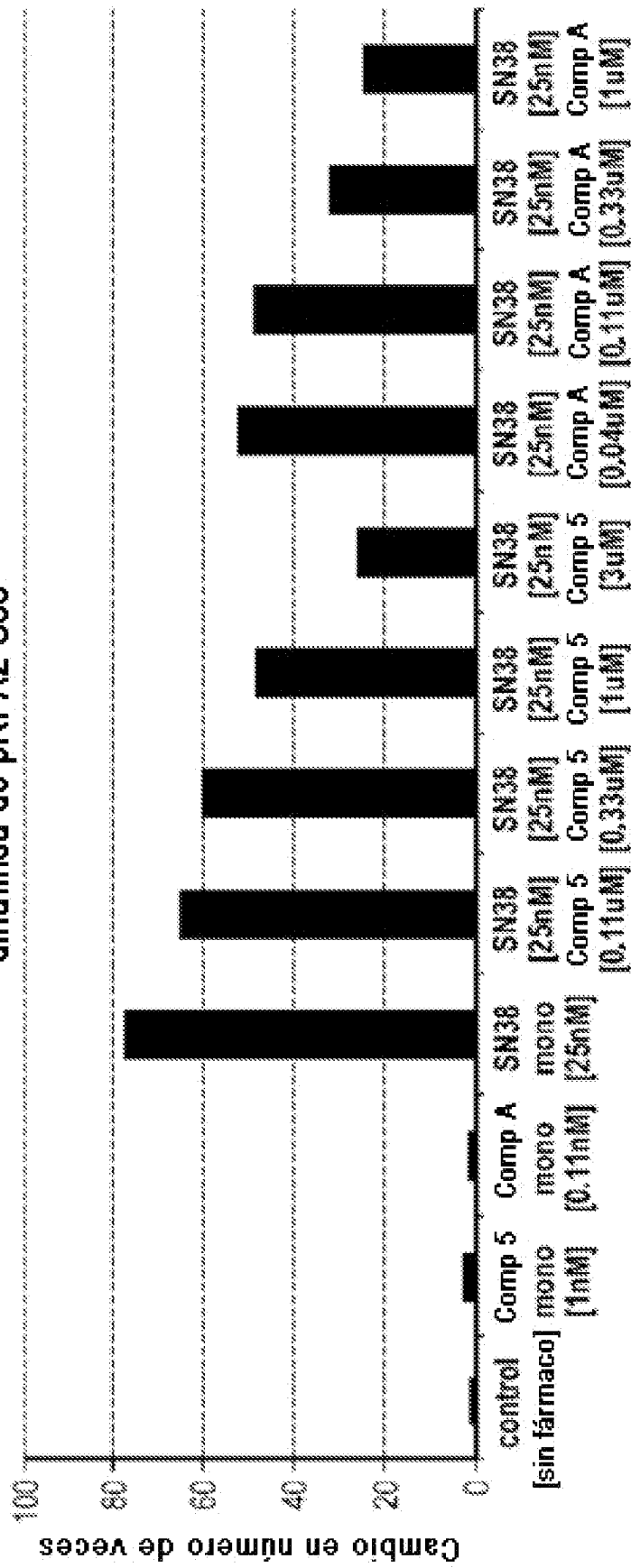


Fig. 44D

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A
dinámica de pCHK2 T68

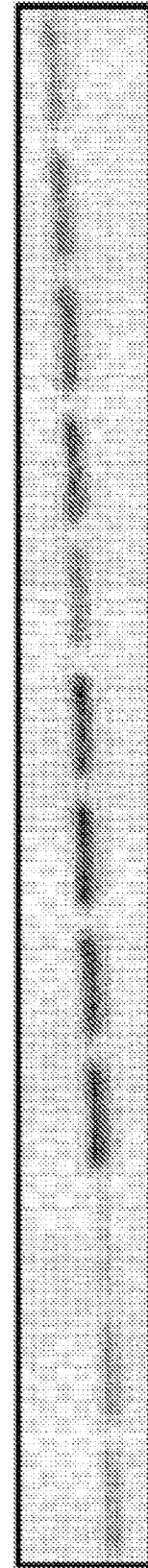
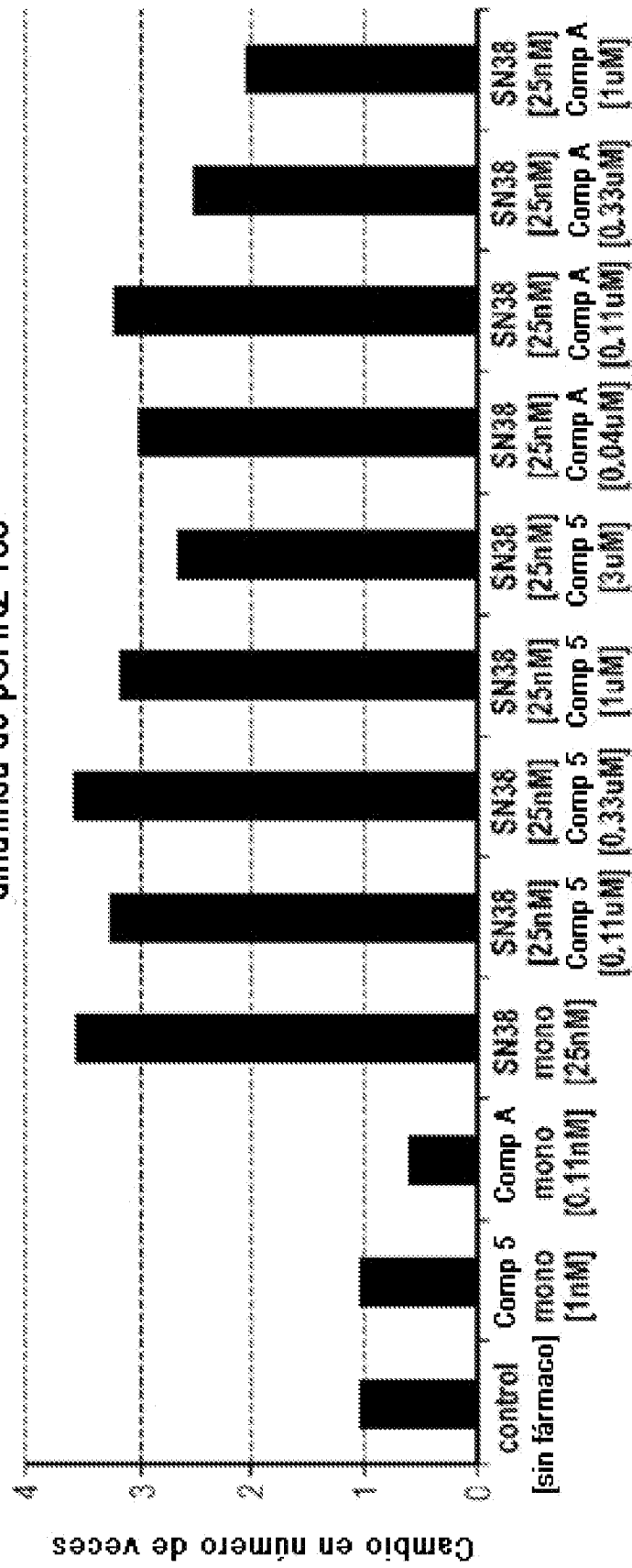


Fig. 44E

MDA-MB468 Combinación SN38 Compuesto 5 o Compuesto A dinámica de yH2AX

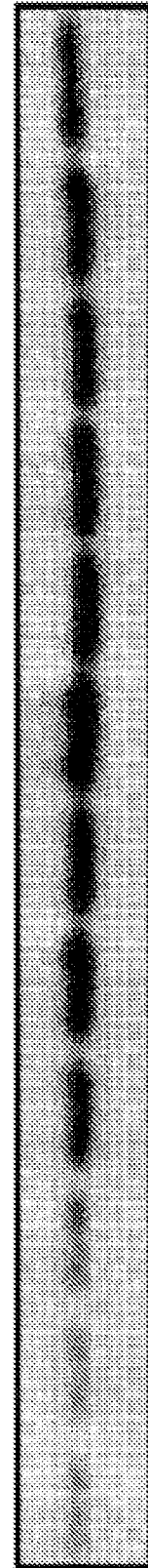
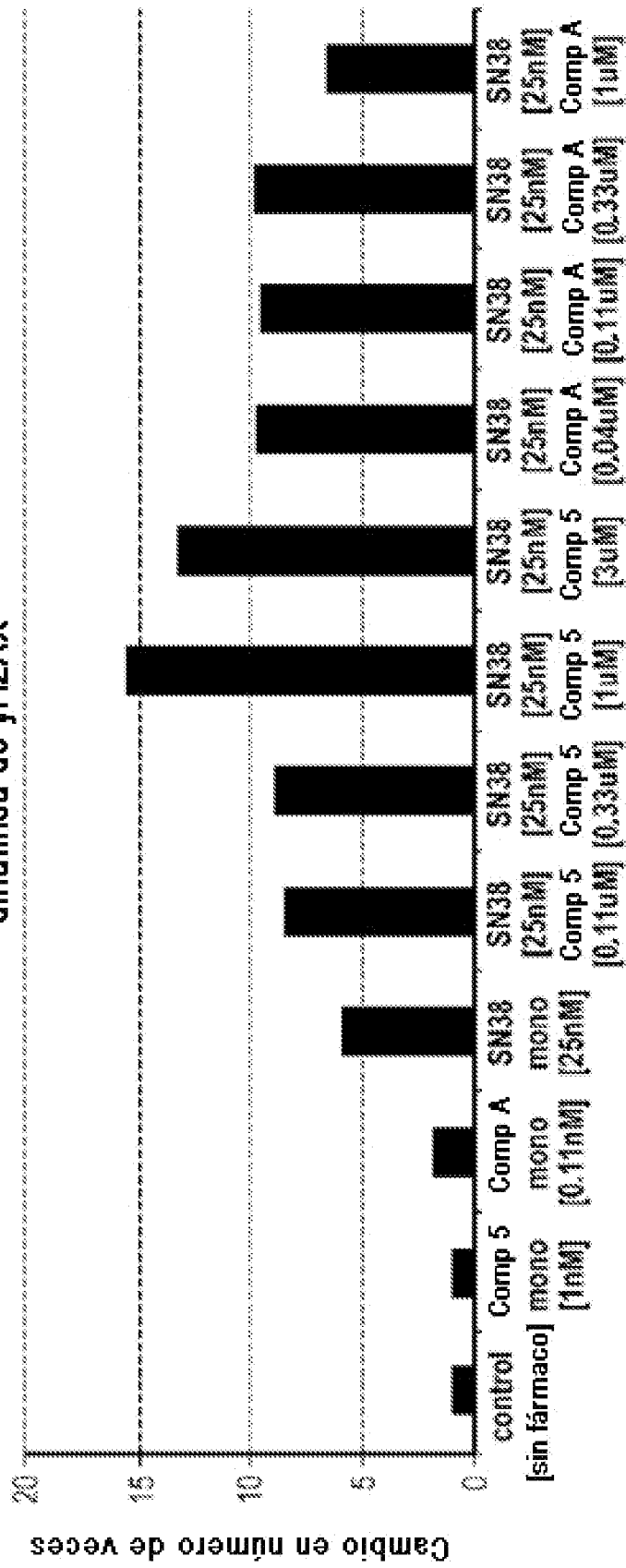


Fig. 44F

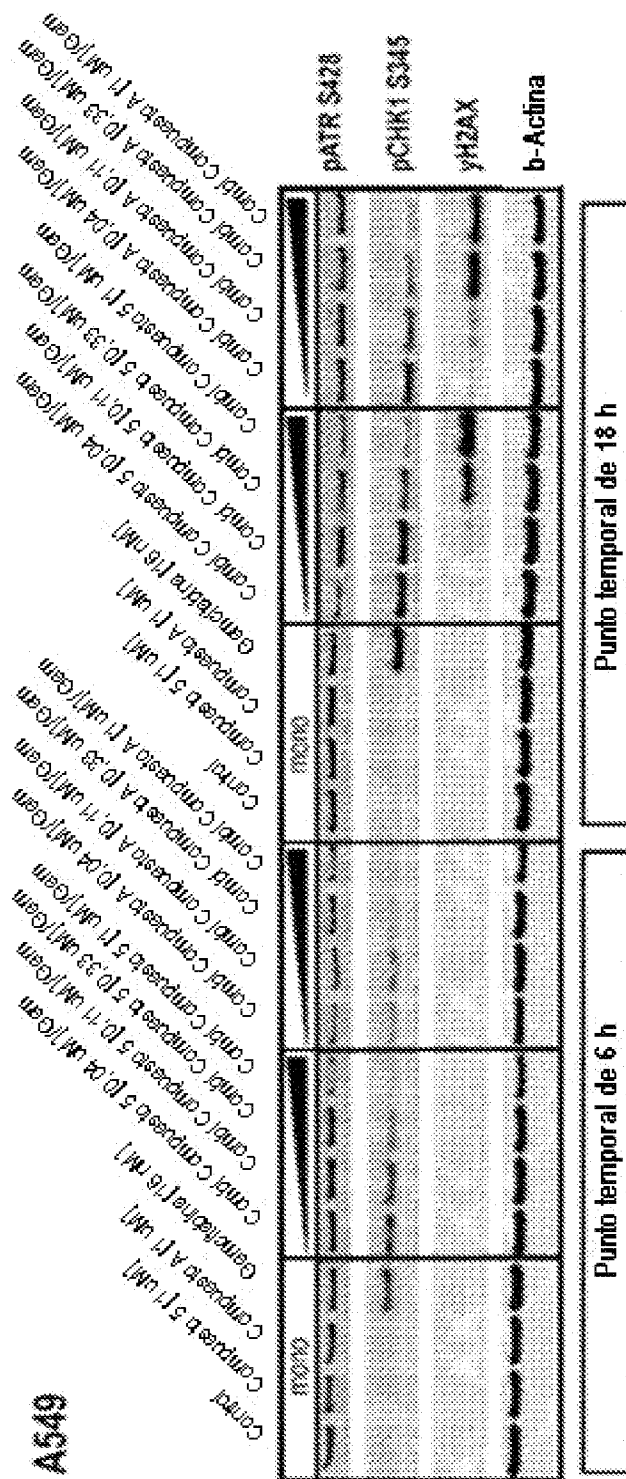


Fig. 45

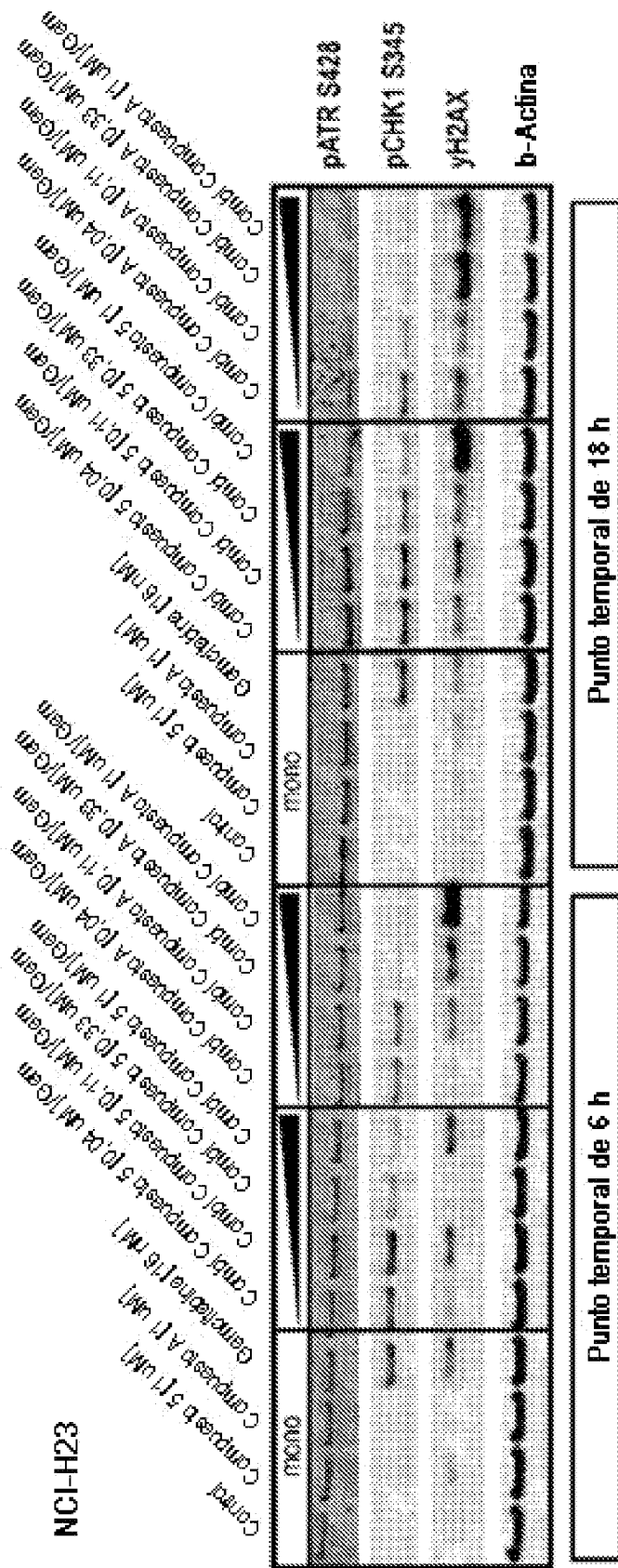


Fig. 46

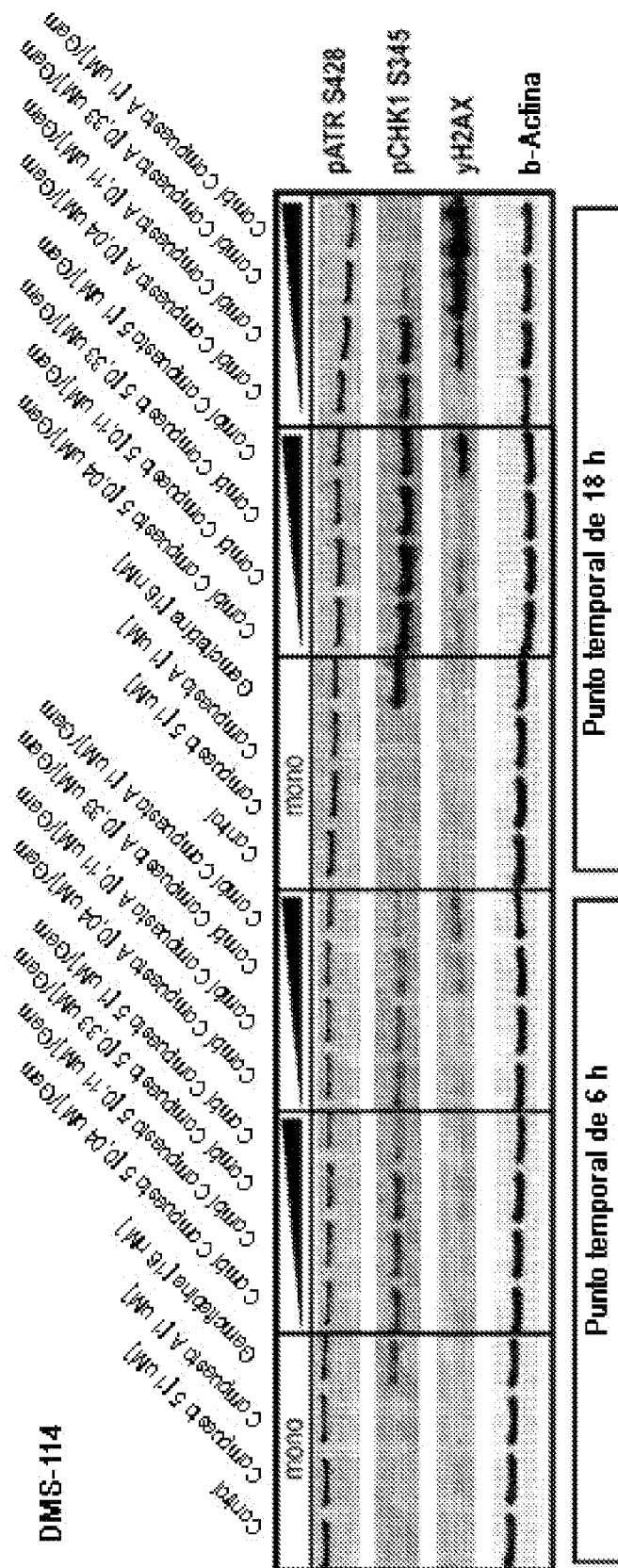
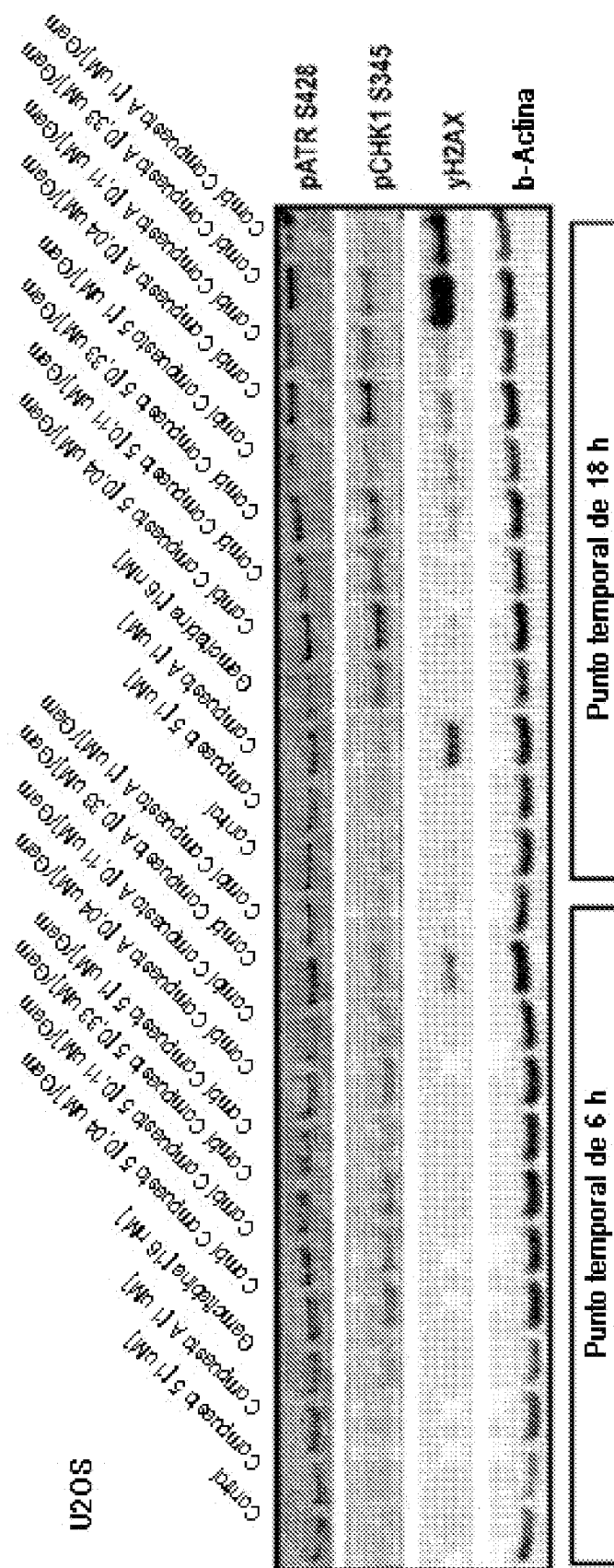
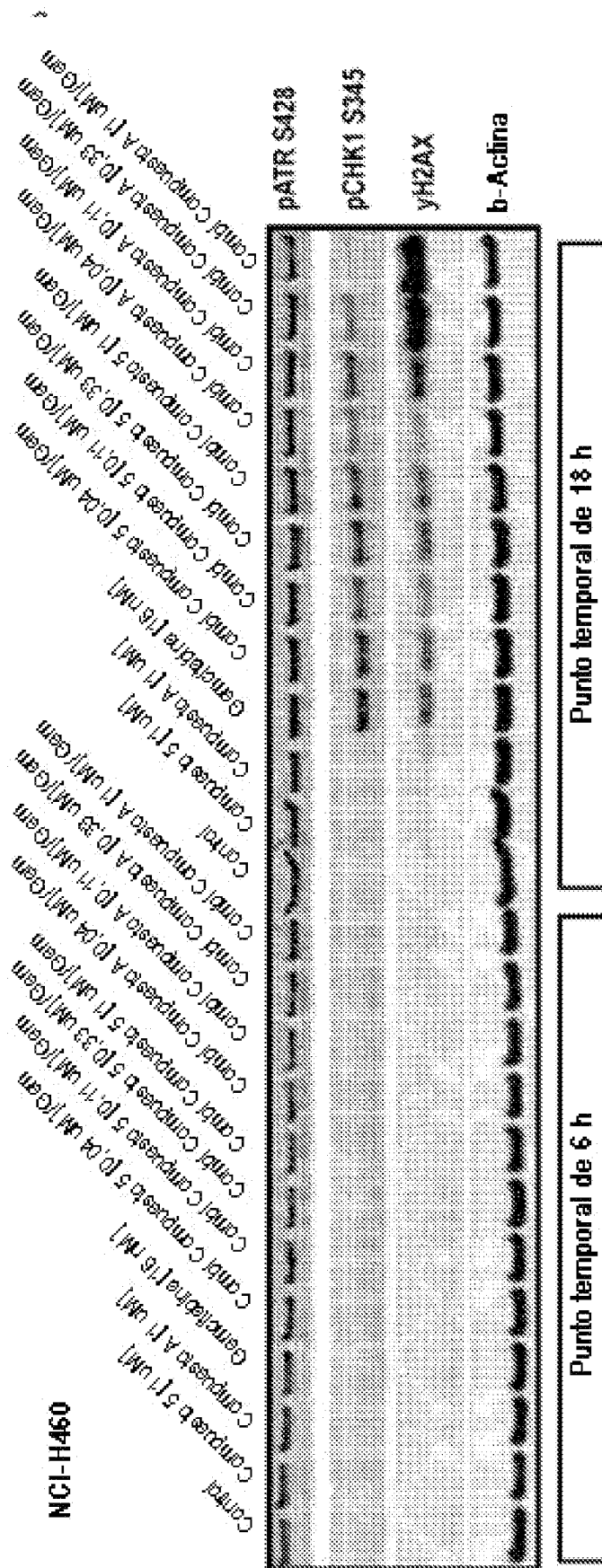
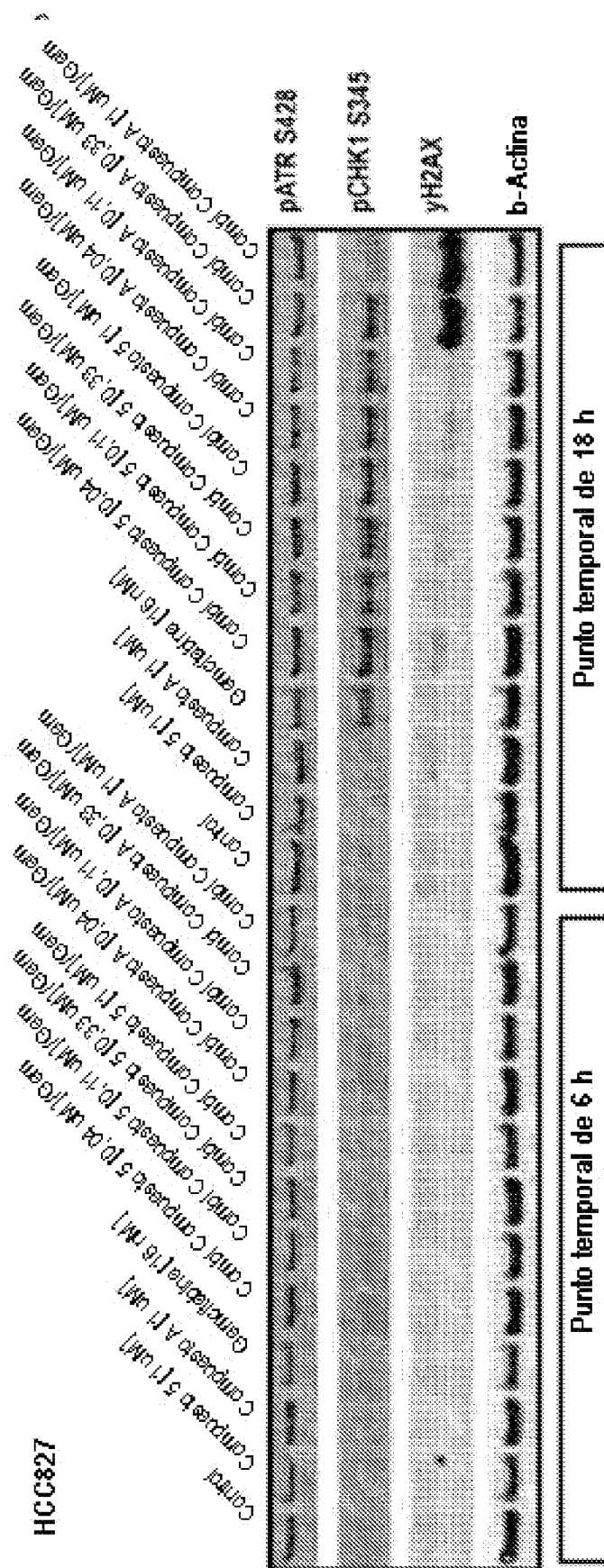
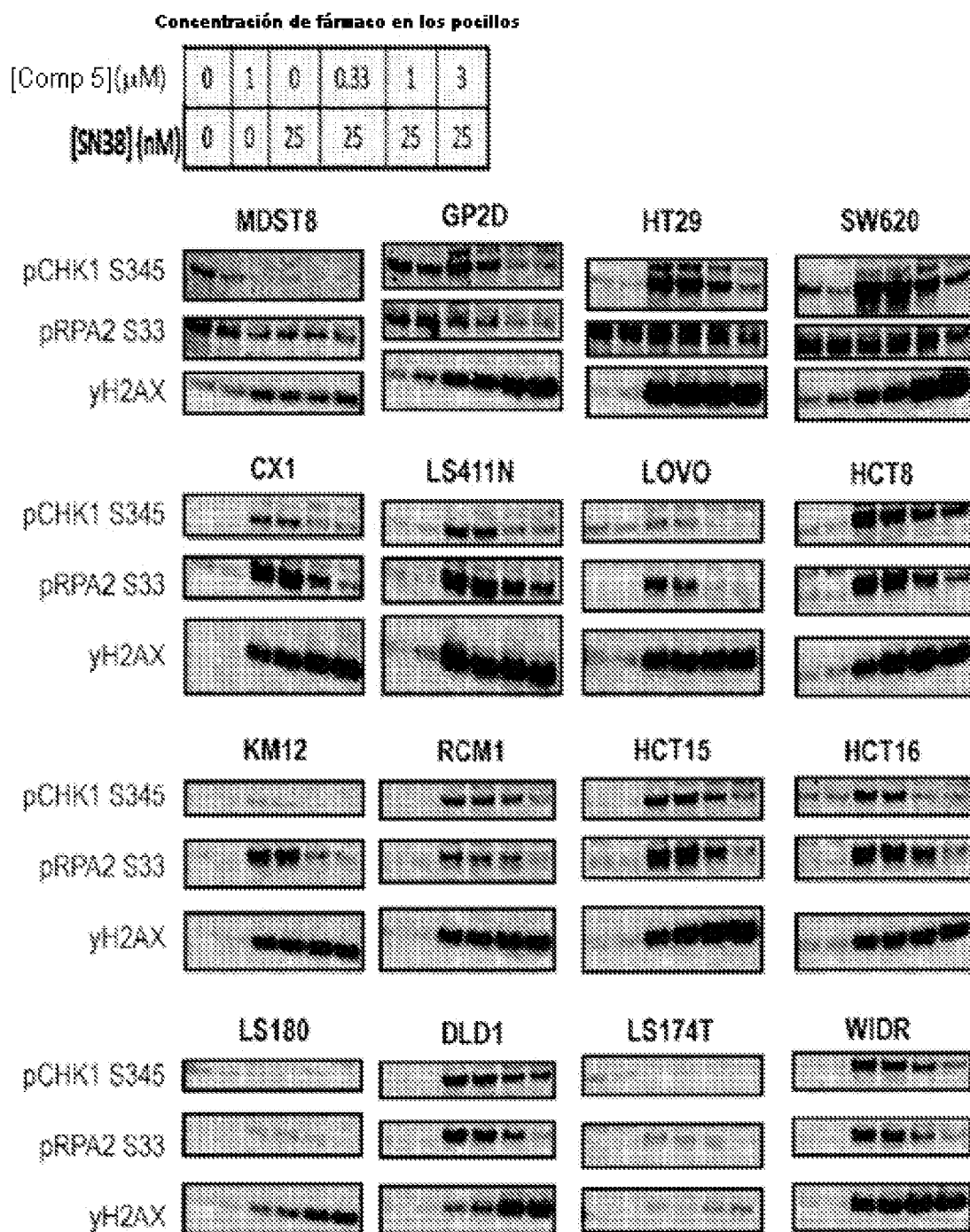


Fig. 47







**Fig. 51**

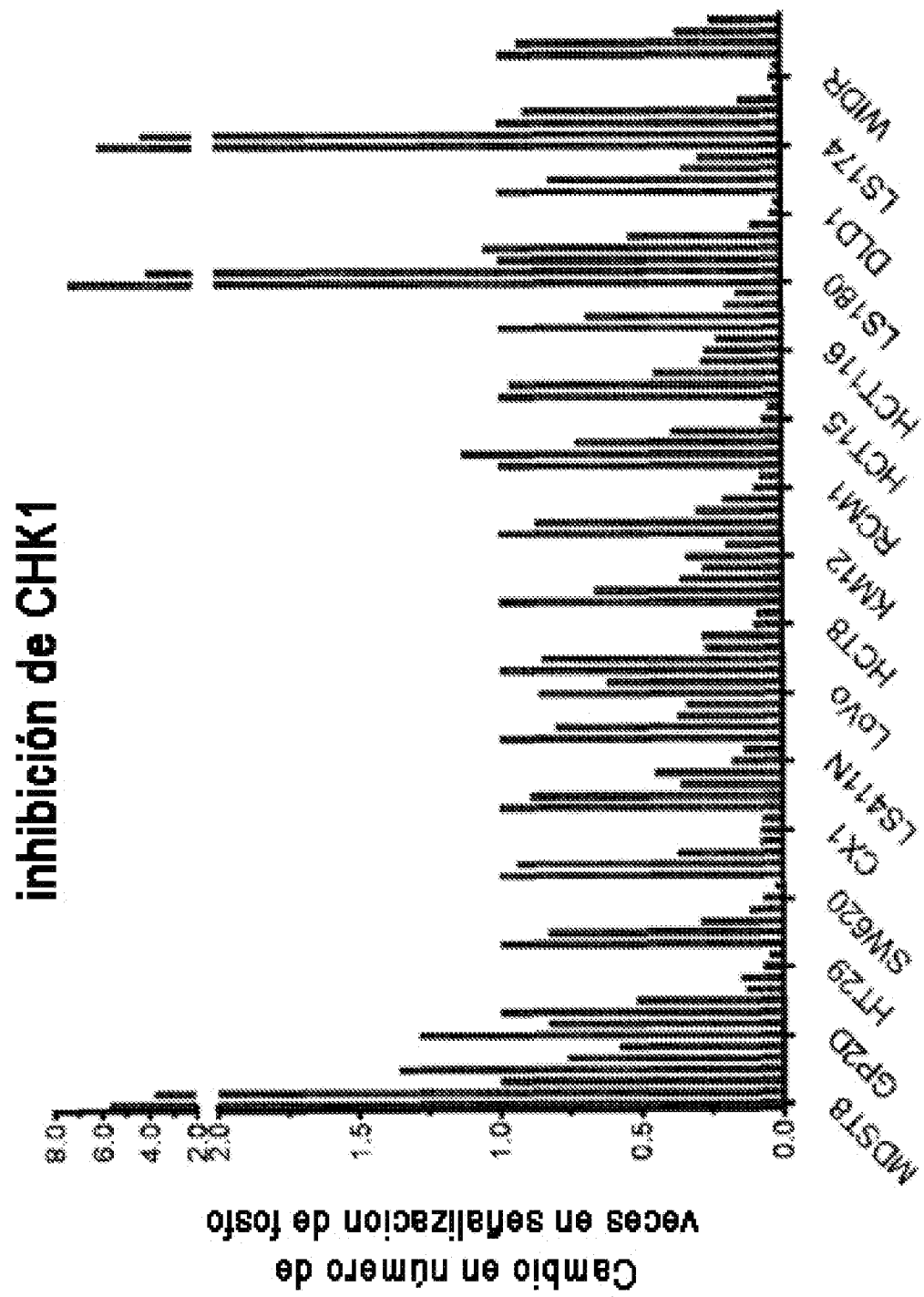
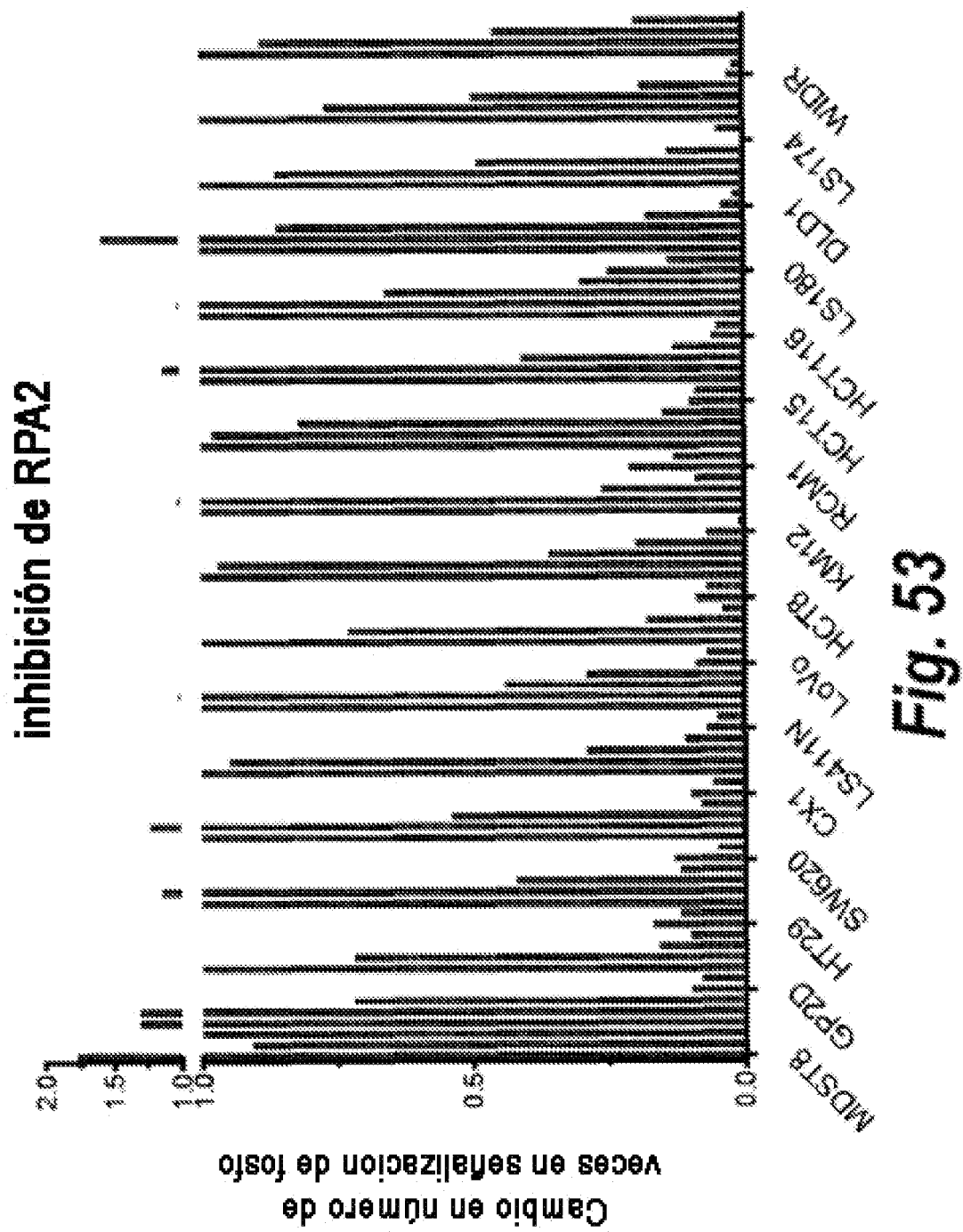


Fig. 52



inhibición de RPA2

